

투명대 존재/부재 햄스터 난자의 동결보존: 1-단계 평형과 2-단계 용해의 효과

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

정구민 · 방명걸 · 김석현 · 신창재 · 김정구 · 문신용 · 이진용 · 장윤석

Cryopreservation of Zona-intact/-free Hamster Oocytes: Effect of 1-Step Equilibration and 2-Step Thawing

K.M. Chung, Ph.D., M.G. Pang, M.S., S.H. Kim, M.D., C.J. Shin, M.D., J.G. Kim, M.D.,
S.Y. Moon, M.D., J.Y. Lee, M.D. and Y.S. Chang, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

= Abstract =

The present experiments were focussed to modify a short slow-cooling protocol used for freezing of early stage embryo(Testart et al., 1986) and also to apply the modified method for the cryopreservation of hamster oocytes with Zona or without. The protocol was modified by changing the 4-step equilibration into 1-step and the 1-step thawing into 2-step. The oocytes were added in 1.5M PROH and 0.1M Sucrose, seeded at -7°C , slow cooled($0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) to -30°C before plunging to -196°C . The oocytes were thawed at $23-25^{\circ}\text{C}$ air(20sec/150sec) and/or $33-35^{\circ}\text{C}$ water(10sec). The survival of the frozen-thawed oocytes was determined by morphologic criteria and their fertilizing ability was also estimated by Sperm Penetration Assay(SPA) system(Chang et al, 1990) using fertile men semen sample.

One-step equilibration showed slightly higher survival rate(83.9% vs. 71.0%) and fertilization rate(83.9% vs. 71.0%) compared with four-step($p>0.05$). And two-step thawing(air & water exposing) of oocytes frozen after 1-step equilibration showed significantly higher survival rate(96.3%) than one-step thawing at air(85.2%) or water(65.0%) only($p<0.05$). Therefore, by the modified method(1-step equilibration & 2-step thawing), Zona-intact(ZI) and Zona-free(ZF) oocytes were frozen and thawed. ZI-oocytes showed significantly higher survival rate(95.4%, 308/323 vs. 67.6%, 240/355) than ZF-oocytes($P<0.01$). But the survival of ZF-oocytes was as high as ZI-oocytes in fourteen of twenty-four replicates. ZI-oocytes was also significantly higher fertilization rate($92.4\pm 8.9\%$ vs. $63.7\pm 18.5\%$) and higher mean number of penetrated sperm(6.2 ± 4.2 vs. 3.9 ± 3.3) than ZF-oocytes, but not higher than control(fresh oocytes; $99.3\pm 2.4\%$, 8.4 ± 4.2)($P<0.001$). Conclusively, this modified method will contribute to freeze effectively the hamster oocytes for simplifying of the logical consideration of performing SPA and also to freeze the human and other animal oocytes.

서 론

Trounson과 Mohr(1983)에 의해 인간 8-세포배를 동결하여 건강한 아기가 태어난 이후

시험관 아기기술에 있어서 수정란(1-4 세포)의 동결보존(Testart et al., 1986)은 다태 임신의 예방과 임신율을 높이기 위한 방법으로 발전하여 왔다. 그러나 인간 수정란의 동결보존은 종교적, 윤리적, 사회적 문제화를 초래하여

수정란 대신에 난자(oocyte)의 동결 보존을 추구하였다. 아울러 난자를 이용한 생명공학기법(체의 성숙과 수정, 핵이식, SPA 등)의 빠른 발전은 난자의 동결보존을 필요로 하고 있다.

그러나 난자의 동결보존은 아직도 만족할 만한 수준에 이르지 못하고 있다. 비록 생쥐(Whittingham et al., 1977), 토끼(Vincent et al., 1989) 및 사람(Chen, 1986)에서 동결 난자에 의해 신생자가 태어났지만, 그 성골율은 매우 낮은 실정이다(Parks & Ruffing, 1992). 난자 동결의 주요 문제점은 세포 크기가 크고, 세포막의 특수성 때문에 세포수(number of cell)와 동해 방지제의 막 투과가 여의치 않아 용해 후 생존율이 낮은 점이다. 그 다음 문제점은 온도 변화와 동해방지제의 유독성으로 인하여 난자의 막구조와 세포질 소기관이 쉽게 손상을 받으므로 용해 후 생존 난자의 수정율과 발생율이 낮은 점이다(Johnson, 1989; Pickering et al., 1990). 이러한 문제점을 극복하기 위하여 난자의 생리와 동결-용해 과정에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다. 그 결과 몇몇 동물에서 동결-용해 후 생존율과 수정율이 현저히 증가하였다(Herrier et al., 1991; Niemann, 1991). 특히, 햄스터 난자는 다른 동물에 비하여 동결-용해 후 생존율과 수정율이 높기 때문에 Sperm Penetration Assay(SPA)에서 동결 보존한 난자의 이용이 가능하게 되었다.

햄스터 난자의 성공적인 동결 방법에 관하여 Mandelbaum 등(1988)은 -40°C 까지 완만 냉각($-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$)한 다음 -196°C 까지 급속동결하고, 공기(상온)에서 용해하였을 때 생존율은 용액과 동해방지제의 종류 및 평형 시간에 따라서 차이가 있었으며, 생존율은 76-95%(평균 81%), 수정율은 66%(fresh oocyte; 52%)로 보고하였다. 한편 Tobback 등(1991)은 -40°C 까지 $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 그 다음 -75°C 까지 $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 속도로 냉각한 다음 -196°C 에 침지하고, 온수(30°C)에서 1분 동안 용해하여, 재수화를 4-단계로 하였을 때 생존율은 93.5%로 보고하였다.

본 연구는 동결보존한 햄스터 난자를 SPA에 효율적으로 이용하기 위하여 기존의 방법보다 간단한 동결법을 개발하고 아울러 용해 후 높은 생존율과 수정율을 얻는데 그 목적이 있다. 특히, 동결-용해 과정에서 평형(equilibration)을 1-단계로 단축하고, 영하 30°C 까지만 완만냉각($-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$)한 다음 액체질소(-196°C)에 침지하였다. 그리고 용해는 공기와 온수

에 노출시키는 2-단계법을 이용하고 재수화는 1-단계로 실시하였다. 이때 난자의 생존성뿐만 아니라, 삼투압 충격(osmotic shock)으로 인한 생리적 장애 정도를 SPA 시스템에서 인간 정자와의 수정 능력으로 평가하였다. 또한 본 연구는 인간과 다른 동물 난자의 동결에 관한 기초 지식을 축적하는데 그 부차적인 목적을 두었다.

재료 및 방법

1. 연구 기간, 장소 및 동물

본 연구는 1990년 3월부터 1991년 3월까지 서울대학교병원 냉동배아은행과 산부인과 연구실에서 수행하였다. 실험동물은 본 대학교 실험동물사육장에서 공급된 12-16 주령의 Golden Hamster 암컷을 사용하였다.

2. 난자(oocytes)의 생산 및 처리

난자는 과배란유도에 의해 생산하였다. 과배란은 PMSG(Sigma, #G-4877)와 HCG(Sigma, #CG-2)를 52시간 간격으로 각각 35IU씩 복강내에 주사하여 유도하였다. 난자는 hCG 주사 후 14-16시간에 난관을 절제하여 입체현미경($20-30\times$)에서 채취하였으며, 이때 난관의 절제와 세척 그리고 난자의 채취는 0.3%(w/v) BSA(Sigma, #A-9647)를 첨가한 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline(D-PBS)(Gibco, #450-1300EA)을 사용하였다. 난자에 부착된 난구세포는 0.1% hyaluronidase가 함유된 PBS(+0.3% BSA)에서 2-3분간 노출시켜 제거하였으며, 난자는 D-PBS(+0.4% BSA)에서 3회 세척 후 배양기의 배양액(Ham's F10+0.4% BSA)으로 옮겼다. 동결-용해 과정에서 난자 투명대의 효과를 알아보기 위한 실험에서는 동결 직전에 0.1% trypsin을 함유한 D-PBS(+0.3% BSA)에서 투명대를 제거하였다.

3. 난자의 평형(equilibration)과 동결 과정(freezing process)

1) 난자의 평형과 동결보존액

난자는 1- 또는 4-단계 평형을 실시하였다. 1-단계는 1.5M 1,2-Propanediol(Sigma, #P-1009)(PROH)과 0.1M Sucrose(Sigma, #S-0389)를 함유한 D-PBS(+0.4% BSA)에 난자를 10분 동안 둬으로써 평형시켰다. 그리고 4-단계는 0.5M, 1.0M, 1.5M PROH 및 1.5M PROH+0.

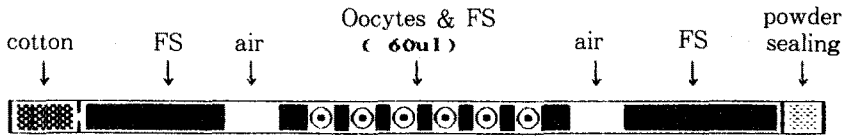


Fig. 1. Loading of oocytes & freezing solution(FS) in a straw.

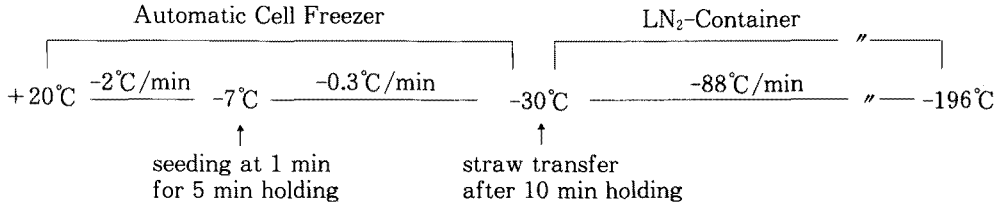


Fig. 2. Cooling program of Hamster oocytes by automatic cell freezer

1M Sucrose를 각각 함유한 D-PBS(+0.4% BSA)에 난자를 각각 5, 5, 10 및 5분 동안 담으로써 평형시켰다. 이때 최종 평형액(D-PBS +0.4% BSA+1.5M PROH+0.1M Sucrose)을 동결보존액으로 이용하였다.

2) 동결용기와 난자의 주입

동결 용기는 0.25ml plastic straw(IMV)를 사용하였고, 평형의 마지막 과정에서 난자를 스트로에 그림 1과 같이 주입하였다. 즉, 용기에 30µl의 동결보존액(FS)을 흡입하고, 약 5mm의 공기층을 형성한 후 난자와 함께 60µl의 FS를 흡입하였다. 그 다음 앞에서와 동일한 방법으로 공기층과 FS(30µl)를 순서대로 흡입하였으며 마지막 부분은 스트로 파우더로 막았다.

3) 자동세포동결기에서 난자의 냉각 과정

난자가 들어 있는 스트로를 동결기(Planner, #Cryo-10)의 챔버 안에 수직으로 장착하여 그림 2와 같은 프로그램에 의해 완만냉각으로 난자를 동결하였다. 즉, 상온(20°C)에서 -7°C까지 1분에 2°C씩 냉각한 다음 -7°C에서 5분간 정체하였다. 영하 7°C에서 1분이 경과 할 때 액체질소에서 냉각된 핀셋으로 식빙(seeding)을 실시하였다. -7°C에서 -30°C까지는 1분에 0.3°C씩 온도를 하강한 다음 -30°C에서 10분 동안 정체하였다. 그 다음 스트로를 동결기에서 액체질소 보존통으로 옮겨 1분에 약 88°C씩 온도를 내리면서 스트로를 액체질소에 넣었다.

4. 동결 난자의 용해 및 재수화(rehydration)

적어도 1주일 이상 액체질소통에서 보존된 스트로를 신속히 꺼내어 공기(23-25°C)에서 20초

동안 노출시킨 다음 온수(33-35°C)로 옮겨서 10초 동안 담으로써 용해(2-단계 용해법)를 실시하였다. 용해 방법의 효과를 알아보기 위한 실험에서는 스트로를 온수(33-35°C)에 직접 넣어 10초간 녹이거나 또는 공기(23-25°C)중에 150초 동안 노출시켜 녹였다. 그 다음 스트로를 알콜솜으로 소독하고 스트로 내의 난자와 동결보존액을 함께 배양접시에 부어 입체현미경(20-40×)에서 난자를 찾았다. 난자를 재수화 용액(D-PBS+0.4% BSA+0.2M Sucrose)에 옮긴 후 8분동안 방치하고, 다시 D-PBS(+0.4% BSA)로 옮겨 재수화를 유도하였다. 그리고 난자를 D-PBS(+0.4% BSA)에서 3회 세척하여 배양액으로 옮겨 10분 이상 배양하여 입체현미경에서 난자의 생존성을 판정하였다. 형태적 소견상 투명대와 할구가 정상적인 난자를 생존한 난자로 간주하였다.

5. 동결-용해 후 수정과 수정능력 확인

용해 후 0.1% trypsin 용액에서 투명대를 제거한 다음 세척하여 배양액(Ham's F-10+0.3% BSA)이 함유된 organ tissue culture dish(Falcon, #3037)에 10±2개씩 넣어 수정능력이 입증된 남성(18명)에서 채취한 정자로 수정시켰다. 정자는 본 연구실의 방법에 의해 cold capacitation 및 swim up 처리하여 배양액 1ml 당 1×10⁶마리의 운동성 정자로 수정시켰다. 수정 후 3.5시간에 난자를 고정, 염색하여 정자 침투 여부를 위상차현미경(1,000×)에서 관찰하였다. 정자 침투는 그림 3과 4와 같이 정자 두부의 팽창(enlargement), 용성 전핵(male pronuclei) 형성 및 해당 정자의 미부가 세포질내에

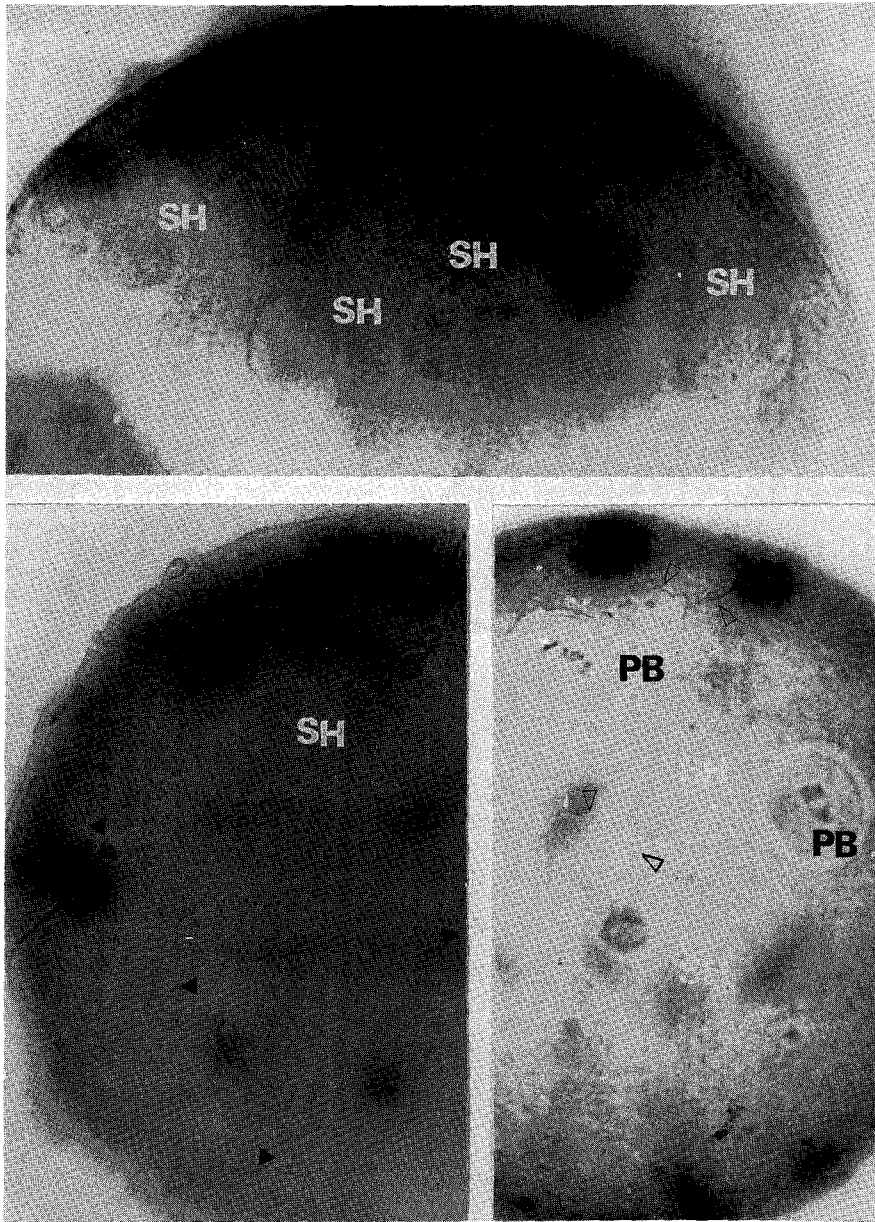


Fig. 3. Human sperm penetrated-enlarged or non-penetrated in/on cytoplasm of frozen-thawed hamster oocytes. Photo. A shows several penetrated-enlarged sperm heads(SH) in a cytoplasm, B shows typical non-penetrated sperm on the cytoplasm(black arrows) compared with SH, and C shows SH connected with tail(open arrows) and two polar body(PB) with some nucleoli.

존재할 때 정자가 난자내로 침투한 것으로 간주하였다(신과 장, 1990; Chang 등, 1990). 정자의 난자 침투 정도는 수정율(적어도 하나의 정자가 침투한 난자의 수/수정된 난자의 총수 \times 100)과 평균 침투 정자수(침투한 총 정자수/수정된 난자의 총 수)로 표시하였다.

6. 통계 분석

실험 결과는 백분율로 표시하였으며, 각 처리간에 통계적 유의성을 확인하기 위하여 χ^2 -test, Fisher exact test 및 paired F-test를 실시하였다.

결 과

1. 1-단계 평형이 동결-융해 후 난자의 생존율에 미치는 효과

냉각 전에 수행하는 평형 과정을 기존 4-단계에서 1-단계로 단축하였을 때 동결-융해 후 난자의 생존율과 SPA 시스템에서 남성 정자

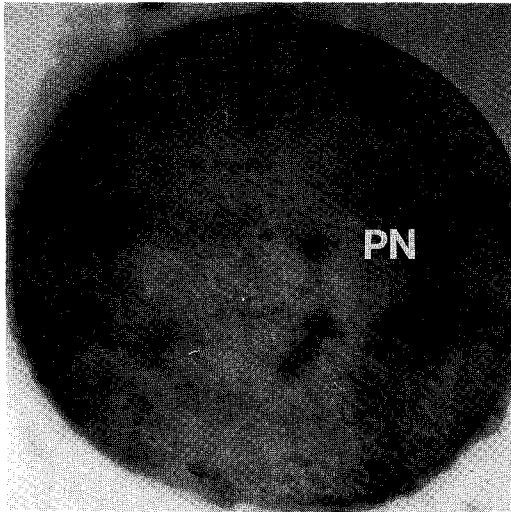


Fig. 4. A male pronucleus(PN) formed at 3.5hour culture following insemination in hamster system.

에 의한 수정율은 Table 1과 같다.

융해 후 난자의 생존율은 각각 96.6%와 95.3%로써 두 방법간에 차이를 보이지 않았다. 그러나 인간 정자에 의해 수정된 난자의 비율(71.0% vs 83.9%)과 난자에 침투한 총 정자수(49/22 vs 70/26) 및 평균 정자수(1.6 vs 2.3)에 있어서 1-단계가 4-단계보다 오히려 높았다. 그러므로 본 실험 결과는 SPA를 위해 햄스터 난자를 동결할 때 1-단계 평형이 기존의 4-단계 평형과 대체 될 수 있음을 의미한다.

2. 2-단계 융해 방법의 효과

1-단계 평형에 의해 동결된 난자를 융해 할 때 스트로를 1-단계와 2-단계로 녹이는 방법을 비교하였다. 이 때 난자의 회수율과 생존율은 Table 2와 같다.

스트로를 물(35°C)에 넣어 10초간 녹였을 때 난자의 생존율은 65.8%, 공기(25°C)에서 150초간 방치하였을 때 생존율은 85.2%로 나타났다. 그러나 공기(25°C)에 20초간 노출시킨 다음 온수에서 10초간 방치 하였을 때 생존율(96.3%)은 앞의 두 방법보다 유의하게 증가하였다($P < 0.05$). 이와 같이 동일한 시기에 동일한 동물로 부터 생산된 난자를 동일한 방법으로 동결한 경우에도 난자의 생존성은 융해 방법에 따라서 현저한 차이가 있었다.

Table 1. The survival and fertilization of hamster oocytes frozen by automatic cell freezer after 1 or 4-step equilibration

Steps of equilibration ⁺	No. & % of oocytes			No. (%) of oocytes fertilized	Mean No. of sperm penetrated
	Frozen	Recovered	Survived		
Four	88	100.0	96.6	22/31(71.0) ^a	49(1.6) ^a
One	85	100.0	95.3	26/31(83.9) ^a	70(2.3) ^a

+ ;Oocytes are rehydrated by 1-step in d-PBS with 0.2M sucrose.

a:In the same column, a superscript art not significant($p > 0.05$).

Table 2. Effect of thawing methods on the survival of hamster oocytes frozen by automatic cell freezer

Thawing methods of frozen straws containing oocytes	No. of oocytes frozen	% of oocytes after thawing	
		Recovered	Survived
Water(35°C, 10sec)	60	93.3	65.0 ^a
Air(25°C, 150sec)	61	100.0	85.2 ^a
Air(25°C, 20sec)			
→ water(35°C, 10sec)	81	98.8	96.3 ^b

a, b: $p < 0.05$.

3. 수정동결법(modified freezing method)에 의한 투명대 존재/부재 난자의 동결-융해 후 생존성

전술한 수정동결법(1-단계 평형, -30°C까지 완만 냉각, -196°C에 보존, 2-단계 융해 및 1-단계 재수화)에 의해 투명대가 존재 또는 부재한 난자를 각각 23 및 24 반복에 걸쳐 동결-융해 하였을 때 난자의 생존율은 Table 3과 같다.

투명대가 존재하는 난자(Zona-intact oocytes) 총 323개를 동결하여 97.2%를 회수하였으며, 동결된 난자 중 95.4%(생존 난자/회수 난자:98.1%, 308/314)가 생존하였다. 반면에 투명대를 제거한 난자(Zona-free oocytes)는 총 355개를 동결하여 85.9%의 회수율과 67.6%의 생존율(생존 난자/회수 난자;78.7%, 240/305)을 보여 Zona-intact oocytes 보다 유의하게 낮은 결과를 초래하였다($P < 0.001$). 이와 같이 Zona-free oocytes의 회수율과 생존율이 낮은 원인은 반복 실험간 심한 변이에 기인하였다. 즉, 24 반복 중 14반복은 회수율(97.9%, 187/191)과 생존율(91.1%)이 Zona-intact oocytes와 거의 비슷하였다. 그러나 7반복은 회수율(81.5%)에서 큰 차이를 보이지 않았지만 생존율(50.4%)에서 낮은 결과를 보였으며, 나머지 3반복은

회수율(46.7%)과 생존율(13.3%)에서 모두 현저히 낮은 결과를 초래하였다.

4. 신선 난자 및 동결 난자의 수정 능력

수정동결법(modified freezing method)에 의해 동결-융해한 난자의 생리기능 소실 유무를 확인하기 위하여 sperm penetration assay(SPA) 시스템에 의해 수정능력이 입증된 남성 정자로 동결 난자의 수정능력을 검정하였다. 이때 대조군은 신선 난자로 하였으며 그 결과는 Table 4와 같다.

투명대가 존재하는 난자를 동결 융해 하였을 때 난자의 수정율은 $92.4 \pm 8.9\%$ 로써 대조군($99.3 \pm 2.4\%$)과 비슷한 경향을 보였지만, 이들 간에는 통계적으로 유의한 차이가 인정되었다($P < 0.001$). 또한 평균 침투 정자수(그림 3)에 있어서도 각각 8.4 ± 4.2 및 6.2 ± 4.2 개로써 두 집단 간에 비슷한 경향을 보였지만 이들간에도 통계적으로 유의한 차이가 있었다($P < 0.001$). 이와 같이 투명대가 존재하는 동결 난자는 신선 난자보다 수정능력에서 다소 떨어졌지만 비슷한 경향치를 보였으며, 동결 난자에 침투한 인간 정자는 응성 전핵(male pronuclei)으로 발달(그림 4)이 가능하였다.

한편, Zona-free oocytes의 동결-융해 후 수

Table 3. The survival of zona-intact and zona-free hamster oocytes frozen by automatic cell freezer

Zona pellusida	Classification		No. of oocytes frozen	% of oocytes after thawing	
	Grades*	Replicates		Recovered	Survived
Intact	A	23	323	97.2 ^a	95.4 ^a
Free	A-C	24	355	85.9 ^a	67.6 ^a
	A	14	191	97.9	91.1
	B	7	119	81.5	50.4
	C	3	45	46.7	13.3

*:Survival rate of oocytes(10-15) in each straw were classified by A(>70%), B(40-69%) and C(<39%).
a:In the same column, means with same superscripts are significant($p < 0.001$).

Table 4. Fertilizing ability of zona-intact and zona-free hamster oocytes frozen by automatic cell freezer and inseminated with fertile human sperm(n=18)

Oocytes	Zona at freezing	No. of oocytes treated	Sperm penetration	
			Rate(%)	Mean No.
Fresh	-	254	99.3 ± 2.4^a	$8.4 \pm 4.2^{a,b}$
Frozen	Intact	192	92.4 ± 8.9^a	$6.2 \pm 4.2^{a,c}$
Frozen	Free	148	63.7 ± 18.5^a	$3.9 \pm 3.3^{b,c}$

a;b;c:means with same superscripts in the same column are significant($P < 0.001$).

정율(63.7 ± 18.5)과 평균 침투 정자수(3.9 ± 3.3)는 Zona-intact oocytes보다 현저히 낮았다 ($P < 0.001$). 이러한 사실은 동결-융해 과정에서 Zona-free oocytes가 받은 생리적 손상은 수정능력에 영향을 미칠수 있음을 의미한다. 따라서 난자의 동결 융해 과정에서 투명대는 형태적으로 판별한 난자의 생존성뿐만 아니라, 수정 능력에도 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

고 찰

생식세포 동결보존의 초점은 동결-융해 과정에서 세포가 겪는 동결보존액의 유해성과 높은 삼투압, 세포 안팎의 빙결정 형성 그리고 약 200°C 의 온도차를 극복하여 생존성을 유지하고 정상적인 개체로 발생시킬수 있도록 하는데 있다.

생존성은 형태적 측면과 생리(기능)적 측면에서 판정 할 수 있다. 형태적 생존성은 현미경 관찰에서 세포막과 투명대가 파괴되지 않아야 하며, 동결 전과 같이 세포의 표면이 팽택을 유지하고 과립의 돌출 빈도가 적어야 한다. 형태적 생존성은 세포 안팎의 빙결정 형성 유무와 빙결정의 크기와 모양을 결정하는 요인들(평형, 식빙, 냉각속도/최종냉각온도, 융해속도, 재수화 등)이 관련될 수 있다. 한편, 생리기능적 생존성은 동결-융해 후 배양하거나 모체로 이식하였을 때 정상적으로 발생하는 것을 의미한다. 생리적 생존성은 세포소기관(cytoplasmic organs)의 기능적 장애를 초래하는 요인들(동해방지제의 유독성과 농도, 냉각 또는 융해 과정에서 형성되는 세포내의 빙결정의 크기와 모양 등)과 생리적 충격 요인들(세포 안팎의 삼투압 차이, 온도차, 광선 등)이 관련될 수 있다.

그러므로 이러한 요인들이 생식세포의 발생 단계와 건강 상태에 적합하게 조합될 때 생존율이 높아지게 된다. 생식세포 중 정자는 이미 오래전 부터 성공적인 동결보존이 가능하였다 (Polge, 1952). 정자의 동결보존은 대부분의 동물과 인간의 인공수정에 효율적으로 이용되고 있다. 이와 같이 정자의 동결보존이 실용화된 배경은 정자(특히 머리 부분)의 크기와 세포수의 함량이 난자에 비하여 현저히 작아서 동결이 용이한데서 기인하였다. 또한 정자는 운동성이 있으므로 과학 장비가 그다지 발달되지 않은 시대에도 동결-융해후 정자의 생존성을

쉽게 관찰할 수 있었기 때문이다.

반면에 난자의 동결보존은 최근까지 활발히 진행되지 않았다. 그 이유는 난자를 이용한 생명공학 기술이 최근에야 개발되었으므로 난자의 동결보존 필요성이 그다지 심각하지 않았기 때문이다. 또 다른 이유로서 난자의 동결보존은 난자의 구조적, 생리적 특수성으로 동결에 많은 어려움이 있었기 때문이다. 따라서 난자 대신에 체내에서 수정, 발달한 수정란의 동결보존이 실용화 되어 왔다. 그러나 최근 체외에서 난자의 성숙과 수정에 관한 기술이 발달하면서 난자 동결보존의 필요성이 높아지게 되었다. 하지만 난자의 동결보존에는 아직도 여러 가지 문제점이 미해결의 상태에 있다. 그 문제점은 난자의 구조적, 생리적 생존성이 낮은 점이다.

구조적인 측면에서 난자는 생식세포 중 가장 큰 세포이다. 또한 막구조의 특이성으로 인해 동해방지제의 세포내 침투가 수정란보다 여의치 못하다. 난자의 이러한 독특한 생리적 특징은 동결-융해 후 난자의 생존성에 결정적인 영향을 미친다. 특히, 생존성에 결정적인 영향을 미치는 세포내의 빙결정 형성(Rall등, 1984)은 상온과 냉각 과정에서 난자의 탈수화 정도와 긴밀한 관계가 있다(Mazur, 1963;Leibo등, 1963). 따라서 이 분야의 연구자들은 난자의 생리적 충격을 최소화하면서 난자의 탈수화를 적절히 유도하기 위하여 상온($20-25^{\circ}\text{C}$)에서 2-6단계에 걸쳐 평형에 이르게한 다음 영하 $30-80^{\circ}\text{C}$ 까지 완만 냉각하여 액체질소에 보존한다. 예를 들면, Whittingham(1977)은 생쥐 난자가 들어있는 M2 배양액(0°C)에 3.0M DMSO를 천천히 첨가(최종 농도;1.5M)하여 15분간 평형시켜 영하 80°C 까지 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 속도로 냉각 후 액체질소(-196°C)에 침지하였다. 그리고 Chen(1986)은 인간 난자가 들어 있는 용액(0°C)에 DMSO를 첨가하여 최종 농도가 1.5M이 되도록 하여 영하 36°C 까지 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 속도로 냉각 후 액체질소에 침지하였다.

햄스터 난자의 동결에 있어서 Mandelbaum등(1988)은 Lassalle등(1985)이 인간 초기배에 이용한 Propanediol(PROH)(1.5M)과 Sucrose(0.1M)을 사용하여 상온에서 4-단계 평형 후 영하 40°C 까지 $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 속도로 냉각하여 액체질소에 침지하였다. 이때 동결보존액에 난자의 노출(평형) 시간은 30-50분이 15-20분 보다 유의하게 높은 생존율(94% vs 76%)을 보였으

며, 동결 난자를 이용한 SPA(Humster) system에서 fertile donor sperm에 의해 대조군(fresh oocytes; 52%)보다 다소 높은 수정율(66%)을 보고하였다. 반면에 Sachs등(1989)은 2-단계 평형(1.5M PROH, 1.5M PROH+0.1M Sucrose) 후 영하 30°C까지 -0.3°C/min 속도로 냉각하여 액체질소에 침지하였다. 이때 90% 이상의 생존율을 보였으며, 평균 침투정자수도 대조군과 차이가 없었다고 보고하였다(2.7개 vs 3.1개). Tobback등(1991)도 완충 효과를 강화한 2-단계 평형(10분 이상 소요) 후 영하 40°C까지 -0.3°C/min, 영하 40°C에서 75°C까지 -2°C/min 속도로 냉각하여 액체질소를 침지하였다. 이들 또한 94%의 생존율을 보고하였다.

이상과 같이 90% 이상의 생존율을 보고한 3편의 연구에서 평형을 적어도 2-단계, 최종냉각온도를 적어도 영하 40°C까지 실시하였다. 본 연구에서는 1-단계 평형하여 영하 30°C까지 냉각 후 액체질소에 침지하였을 때 324개의 난자 중 95.4%가 용해 후 생존하였다. 이러한 사실은 1-단계 평형과 영하 30°C까지의 단축-냉각 프로그램에 의해서도 햄스터 난자는 삼투압 충격(osmotic shock) 또는 세포내 빙결정 형성으로부터 안전한 범위에 있다고 생각된다. 그러므로 본 연구의 「1-단계 평형/영하 30°C 단축-냉각 프로그램/2-단계 용해/1-단계 재수화」는 기존의 다른 프로그램 만큼 햄스터 난자의 동결-용해 후 생존율을 높게 유지할 뿐만 아니라, 동결보존을 더욱 경제적이며 효율적으로 수행할 수 있는 장점이 있다.

한편, 국내에서 김등(1991)에 의해 햄스터 난자를 동결보존 하였을 때 생존율은 61.2-70.1%(1.5M PROH 처리군은 61.2%)로 보고하고 있으며, 이는 본 연구와 앞서 언급한 타 연구자의 결과에 비하여 현저히 낮은 결과이다. 본 연구와 재료 및 방법에서 차이점은 평형의 단계(1-vs 4-step), 최종 동결보존액의 sucrose 첨가 유무, 그리고 용해법(1- vs 2-step)등이 있다. 본 연구에서 단축 프로그램에 의해 동결된 난자는 기존의 1-단계(상온 공기 또는 35-37°C 온수에 노출)보다 2-단계(공기에 노출 후 온수에 노출)로 용해 할 때 더욱 높은 생존율을 보인 점을 고려할 때 용해는 매우 중요한 과정이라고 생각된다. Sach등(1989)도 2-단계 평형 후 영하 30°C까지 냉각하여 동결한 연구에서 2-단계 용해법을 이용한 바 있다. 그러나 Crister등(1986)은 영하 80°C까지 냉각 후 동

결한 경우 자동동결기에서 +8°C/min로 용해한 반면에 Leibo등(1990)은 영하 75°C까지 냉각 후 동결한 경우 37°C 온수에서 3분간 용해를 실시하였다. 또한 Tobback등(1991)도 영하 40°C까지 1차 냉각 후 75°C까지 2차 냉각하여 동결한 경우에 30°C 온수에서 1분간 용해하였다. 이상과 같이 최종냉각온도에 따라서 용해 방법을 달리하고 있으며, 또한 최종냉각온도가 비슷함에도 불구하고 연구자간에 용해 방법을 달리하는 경우도 있다. 이와 같이 각 연구마다 용해 방법이 다른 것은 평형 단계, 냉각속도, 최종냉각온도가 상이한데서 기인한다고 생각한다. Leibo등(1974)에 의하면 용해 속도는 냉각속도와 최종 냉각 온도, 즉 세포의 전도성과 최종 탈수 상태에 따라서 결정된다고 보았다. 이러한 면을 고려할 때 본 연구의 1-단계 평형에 이은 단축 냉각 프로그램에는 2-단계 용해법이 적합한 것으로 사료된다.

한편, 투명대를 제거한 난자(ZF)의 동결보존은 Fleming등(1979)에 의해 시도 되었다. 이들은 1.25M DMSO를 사용하여 분당 0.6-0.8°C씩 영하 50°C까지 냉각 후 이 온도에서 4개월간 보존한 다음 용해하였을 때 약 90%의 생존율을 얻을 수 있었다. 반면에 본 연구는 투명대가 존재하는 난자(ZI)와 마찬가지로 영하 196°C에서 동결보존한 결과 생존율(67.6%)은 투명대가 존재하는 난자보다 현저히 떨어졌다. 그러나 ZF-난자의 경우 24반복 중 14반복의 생존율은 90% 이상의 생존율을 보여 ZI-난자의 생존율과 차이가 없었다. 이러한 사실은 ZF-난자의 성공적인 동결보존 가능성을 시사해주고 있다. 이러한 사실은 ZF-난자에 적합한 동결보존법에 관한 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

본 연구에서 동결-용해 후 난자의 생리적 생존성을 확인하기 위한 방편으로서 수정능이 입증된 남성 정자에 의해 SPA를 실시하였다. 그 결과 ZI-난자의 용해 후 수정율과 평균 침투정자수는 $92.4 \pm 8.9\%$ 와 6.2 ± 4.2 개로 매우 높게 나타났다. 이 성적은 대조군으로 사용한 신선난자의 수정율($99.3 \pm 2.4\%$)과 평균 침투정자수(8.4 ± 4.2 개) 보다 다소 낮았다. Leibo등(1990)은 TYB 용액으로 donor 정자를 처리하여 SPA를 실시한 결과 신선 및 동결 난자의 수정율은 각각 $95.1 \pm 8.2\%$ 와 $89.3 \pm 18.1\%$ 로 보고하였다. 또한 Sachs등(1989)은 Whittingham's medium으로 fertile donor의 정자를 세척하여 SPA

한 결과 신선 및 동결 난자의 평균 침투정자수가 각각 3.1과 2.9개로 보고하였다. Tobback등(1991)도 황소 정자(bull sperm)에 의해 난자의 수정능력을 확인한 결과 신선 및 동결 난자의 수정율(평균 침투정자수)은 각각 91%(9.7)와 87%(5.2)로 보고하였다. 이와 같이 동결 난자는 약 90%의 수정율을 보이지만 신선난자보다 다소 낮은 경향을 보여주고 있다. 이러한 경향은 본 연구와 다른 연구 간에 거의 비슷한 양상을 보여주었다. 따라서 본 연구 결과 동결-융해 난자의 생리적 생존성은 타 연구자의 결과와 대등하다고 간주할 수 있으며, 이는 역으로 본 연구에서 사용한 1-단계 평형과 단축-냉각 프로그램이 타 연구자의 동결법에 비하여 난자의 생리 기능을 저해하지 않았음을 의미한다. 아울러 본 연구팀에 의해 본 연구에서 사용한 동결법으로 동결 보존한 햄스터 난자를 이용하여 SPA에 의해 남성불임 환자군의 수정능력을 시험한 결과 동결 난자와 신선난자 간에는 매우 유의한 상관 관계가 있음을 입증하였다(방등, 1992). 따라서 본 연구의 1-단계 평형에 의한 단축-냉각 프로그램은 SPA를 위한 햄스터 난자의 동결보존에 경제적이고도 유용한 방법으로서의 이용가능성을 제시하였다. 또한 이 동결법은 현재 본 대학에서 인간의 전핵기 1-세포배의 동결보존에도 이용되고 있다.

그러나 투명대를 제거한 난자의 동결보존은 형태적 생존율뿐만 아니라 수정율에서도 신선난자와 ZI-동결 난자보다 낮았으므로 이에 관한 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

본 연구는 수정란의 동결에 사용한 단축완만냉각법(Testart등, 1986)을 효율적으로 수정하고, 또한 그 수정-동결법을 투명대가 존재 또는 부재한 햄스터 난자의 동결보존에 응용하는데 그 목적이 있다. 단축완만냉각법의 수정은 평형을 4-단계에서 1-단계로 단축하고, 융해를 1-단계에서 2-단계로 실시하였다. 난자의 동결은 1.5M PROH과 0.1M Sucrose가 함유된 PBS에 난자를 넣어 영하 7°C에서 식빙하고 영하 30°C까지 0.3°C/min씩 냉각 후 영하 196°C에 침지하였다. 난자의 융해는 공기(23-25°C, 20초)와 온수(34±1°C, 10초)에서 연속적으로 실시하였다. 그 다음 난자의 생존성은 형태적 측

면에서 관찰하였으며, 난자의 생리 기능적 손상 유무는 SPA 시스템에서 수정능력이 있는 남성 정자에 의해 수정능력을 평가하였다.

1-단계 평형은 4-단계 평형보다 다소 높은 난자의 생존율(83.9% vs 71.0%)과 수정율(83.9% vs 71.0%)을 보였다($P>0.05$). 한편, 융해방법의 효과는 동결된 스트로를 온수(33-35°C/10초) 또는 공기(25°C/150초)에서 1-단계로 녹이는 것보다 공기(25°C/20초)에 노출한 다음 온수(33-35°C/10초)에서 녹이는 2-단계 융해법이 유의적으로 높은 생존율(65.0, 85.2 vs 96.3%)을 보였다($P<0.05$). 그러므로 1-단계 평형과 2-단계 융해에 의해 투명대가 존재(Zona-intact, ZI) 또는 부재(Zona-free, ZF)한 난자를 동결, 융해하였을 때 난자의 생존율(95.4%, 308/323 vs 67.6% 240/355)은 투명대가 존재할 때 유의하게 높았다($P<0.001$). 그러나 ZF-난자의 생존율도 24반복 중 14반복에서 ZI-난자의 생존율 만큼 높았다. 또한 ZI-난자는 ZF-난자보다 수정율(92.4±8.9% vs 63.7±18.5%)과 평균 침투정자수(6.2±4.2 vs 3.9±3.3)에 있어서 유의하게 높았지만, ZI-난자는 대조군(신선난자:99.3±2.4%, 8.4±4.2)보다 다소 낮은 비율을 보였다.

결론적으로 본 연구의 수정동결법에 의해 햄스터 난자를 동결-융해한 결과 90% 이상의 회수율, 생존율 및 수정율을 얻을 수 있었으며, 이러한 결과로 미루어 볼 때 이 동결법을 이용하여 sperm penetration assay를 경제적이며 효율적으로 수행할 수 있을 것으로 사려된다.

인 용 문 헌

- Chang YS, Lee JY, Moon SY, Kim JG, Pang MG, Shin CJ: Factors affecting penetration of zona-free hamster ova. *Arch of Androl* 1990, 25, 213.
- Chen C: Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986, 884-886.
- Crister JK, Arneson BW, Ball GD: Cryopreservation of hamster oocytes: effects of vitrification or freezing on human sperm penetration of zona-free hamster oocytes. *Fertil Steril* 1986, 46(2), 277-284.
- Fleming AD, Yanagimachi R, Yanagimachi H: Fertilizability of cryopreserved zona-free hamster ova. *Gamele Res* 1979, 2, 357-366.

- Herrle A, Rath D, Niemann H: Effects of cryoprotectants on fertilization & cleavage of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology* 1991, 35, 212.
- Johnson MH: The effect on fertilization of exposure of mouse oocytes to DMSO: an optimal protocol. *J In Vitro Fert Embryo Trans* 1989, 6, 168-175.
- Lassalle B, Testart J, Renard JP: Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propanediol. *Fertil Steril* 1985, 44, 645-651.
- Leibo SP, Mazur P, Jackowski SC: Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp Cell Res* 1974, 89, 79.
- Leibo SP, McGrath JJ, Cravalho EG: Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology* 1978, 15, 257.
- Leibo SP, Bastias MC, Giamberti TA, Rogers BJ, Meyer TK: The efficacy of cryopreserved hamster ova in the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 1990, 53(5), 906-912.
- Mandelbaum J, Junca AM, Tibi C, Plachot M, Alnot MO, Rim H, Salat-Baroux J, Cohen J: Cryopreservation of immature and mature hamster and human oocyte. In: Hohnes HW Jr, Charlotte Schrader, eds. *In Vitro Fertilization and Other Assisted Reproduction*. The New York Academy of Sciences 1988, 550-561.
- Mazur P: Kinetics of water loss from cells at subzero temperature and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963, 47, 347.
- Niemann H: Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status & research needs. *Theriogenology* 1992, 35, 109-124.
- Parks JE, Ruffing NA: Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology* 1992, 37(1), 59-73.
- 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 oocytes. *Fertil Steril* 1990, 54, 102-108.
- Polge C, Rowson LEA: Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -7°C . *Nature (Lond.)* 1952, 169, 626-627.
- Rall WF, Reid DS, Polge C: Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods. *Cryobiology* 1984, 21, 106.
- Sachs HH, Pink JM, Gwatkin RBL: Hamster oocyte penetration tests with oocytes frozen in propanediol: comparison with non-frozen oocytes. *Gamete Res* 1989, 24, 31-34.
- Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Frydman R: High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 1986, 46, 268-272.
- Tobback C, Hough S, Foote RH: A procedure for cryopreservation of hamster oocytes yielding highly conserved oocytes suitable for sperm penetration tests. *Fertil Steril* 1991, 55(1), 184-188.
- Trounson A, Mohr L: Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983, 305, 707-709.
- Vicent C, Garnier V, Heyman Y, Renard JP: Solvent effects on cytoskeletal organization and in-vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *J Reprod Fert* 1982, 87, 809-820.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P: Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science* 1972, 178, 411.
- Whittingham DG: Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C . *J Reprod Fert* 1977, 49, 89.
- 김재명, 서병희, 이재현, 정길생: 햄스터 난자의 동결보존과 그의 임상적 이용에 관한 연구. 대한불임학회지 1991, 18(1), 18-88.
- 방명걸, 정구민, 김석현, 신창재, 김정구, 문신용, 이진용, 장윤석: 냉동보존된 햄스터 난자를 이용한 인간 정자의 생식력 평가. 대한불임학회지 1992, 19, 153.
- 신창재, 장윤석: 인간 정자의 수정능 부여 및 햄스터 난자 침투에 영향을 주는 인자들에 관한 연구. 대한산부학회지 1990, 33, 954.