

인간 배아의 동결보존에 관한 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

문신용 · 김정훈 · 김석현 · 최영민 · 신창재 · 김정구 · 이진용 · 장윤석

Cryopreservation of Human Embryos for Assisted Reproductive Technology

Shin Yong Moon, M.D., Chung Hoon Kim, M.D., Seok Hyun Kim, M.D.,
Young Min Choi, M.D., Chang Jae Shin, M.D., Jung Gu Kim, M.D.,
Jin Yong Lee, M.D. and Yoon Seok Chang, M.D.

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

= Abstract =

Controlled ovarian hyperstimulation(COH) for in vitro fertilization and embryo transfer(IVF-ET) often results in the production of more embryos than can be efficaciously transferred at one time. However, embryo cryopreservation provides a mechanism by which additional embryos can be stored for later thawing and transfer.

From November, 1990 to October, 1992, we completed 42 transfer cycles of cryopreserved pronucleus(PN) 1-cell embryos using the fixed protocol of hormonal replacement therapy in a physiological manner regardless of individual ovarian function. Artificial endometrial stimulation was performed with only exogenous estradiol and progesterone(E-P) in 36 transfer cycles (Group I) and with gonadotropin-releasing hormone agonist(GnRHa) and exogenous estradiol and progesterone(GEEP) in 6 transfer cycles(Group II). The results were as follows.

1. The Survival rate of total cryopreserved-thawed embryos was 64.9%(198/305) : 64.9% (172/265) in Group I and 65.0%(26/40) in Group II.
2. Total 168 embryos were transferred with an average of 4.7 per ET in Group I and total 26 embryos were transferred with an average of 4.3 per ET in Group II.
3. The pregnancy rate(PR) per cryopreserved-thawed ET and the implantation rate was 33.3%(14/42) and 6.7%(13/194), respectively. The PRs per cryopreserved-thawed ET were 30.6%(11/36) in Group I and 50.0%(3/6) in Group II without significant difference.
4. The take home baby rate was 11.1%(4/36) in Group I and 33.3%(2/6) in Group II.

서 론

체외수정 및 배아의 자궁내이식(체외수정시술, IVF-ET)이 불임 환자의 치료를 위하여 사용되기 시작한 이후 임신율을 높이기 위한 지속적인 연구 개발이 있어 왔다. 과배란유도 후 시술되는 체외수정시술이나 생식세포 난관

*본 연구는 1988년도 서울대학교병원 대단위연구비의 보조로 이루어진 것임.

내이식(GIFT)의 경우 채취된 난자의 체외수정 결과인 수정란, 즉 배아의 수가 1회의 이식에 필요한 적정수를 초과하는 경우 잉여 수정란의 적절한 처리와 보존이 문제가 되어 왔다.

특히 과배란유도시 gonadotropin-releasing hormone agonist(GnRHa)가 도입된 이래 상대적으로 많은 수의 난자를 얻을 수 있게 되었으며, 따라서 체외수정 후 많은 수의 배아를 얻을 수 있게 되었다. 한편 5개 이상의 배

아를 자궁내이식하면 15%-20%에서 다태임신이 초래된다고 보고되고 있다. 따라서 체외 수정시술 치료주기에서 4개 이하의 배아를 이식한 후 잉여 배아를 안전하게 보관하기 위한 배아의 동결보존(cryopreservation)은 임상에서 중요한 과제가 되어오고 있다.

1972년 Whittingham 등이 생쥐 배아의 동결보존 및 융해에 최초로 성공하였으며, 1983년 Trounson 등이 동결보존된 8-세포기의 배아를 이용하여 인간에서 최초로 임신에 성공한 이후 배아의 동결보존 및 이의 임상적 이용에 대한 연구가 계속되고 있다(Cohen et al., 1985; Trounson, 1985; Quinn et al., 1986; Testart et al., 1986).

배아의 동결보존에 관한 임상적 연구의 적응증 및 타당성은 첫째, 환자에게 자궁내이식되는 배아의 수가 4개 이상이어서 다태임신의 위험성이 높은 경우이다. 둘째, 자궁내막의 배아 착상 수용 능력이 상대적으로 높은 시기에 배아를 이식하고자 하는 경우로서 과배란유도 직후에는 estrogen, progesterone이 다량으로 생성 분비되는데 estrogen/progesterone비가 높으면 배아가 자궁내막에 착상하기 어렵다는 보고도 있다. 셋째, 여분의 배아를 동결보존하여 임신이 안되면 후에 다시 자궁내이식 할 수 있으므로 불임 환자들은 임신 기회를 더욱 많이 제공받을 수 있게 되어 경제적, 시간적으로 많은 도움을 받을 수 있다.

많은 연구자들은 동결보존된 배아의 이식에 있어서 동결시 배아의 발생단계가 임신성공율에 영향을 주는 한 요인이라고 주장하여 왔다(Lassalle et al., 1985; Trounson, 1985; Testart et al., 1986; Cohen et al., 1988). 1985년 Lassalle 등이 초기 발생단계에서 배아가 동결되었을 때 융해 후 생존율이 더 높았음을 보고한 이래 초기 발생단계, 특히 전핵기(pro-nucleus stage)의 1-세포기 상태에서 동결된 배아가 융해 후 생존율이 더 높다는 많은 보고들이 있어 왔으며(Testart et al., 1986; Cohen et al., 1988), 저자들의 연구에서도 이와 동일한 결과를 얻은 바 있다(문 등, 1990, unpublished).

동결보존된 배아의 자궁내이식은 일반적으로 자연배란 주기에서 많이 시행되어 왔으며, 난소 기능부전이나 양측 난소가 없어 난자공여 시술을 받는 환자에서는 인공 주기(artificial cycle)에서 시행되어 왔다(Trounson et al.,

1983; Lutjen et al., 1984; Nabot et al., 1986).

1989년 Schmidt 등은 동결보존된 배아의 이식에 있어서, 1989년 Meldrum 등은 난소 기능이 있는 환자에게 난자공여시 GnRH agonist, estrogen, progesterone(GnRH α and exogenous estradiol and progesterone; GEEP)을 투여한 주기의 유용성에 대하여 보고한 바 있으며, 1991년 Jaroudi 등, 1991년 de Ziegler 등, 1992년 Pattinson 등은 estradiol/progesterone을 투여한 주기에서의 동결보존된 배아의 이식에 대하여 보고한 바 있다.

저자들은 시술 주기의 취소율을 감소시키고, 자연배란 주기에서 시행하게 되는 난포 성장의 초음파검사, 혈중 호르몬 측정 등의 불편함을 피하기 위하여 환자 개개인의 난소 기능과는 무관하게 호르몬 대체요법을 이용한 fixed protocol을 사용하였으며, 배아의 동결 및 융해시에는 Testart 등(1983)이 연구 고안 하였던 방법을 수정 개발한 완만동결-급속융해법(slow freezing-rapid thawing)을 사용하여 인간 배아의 동결보존 기간에 따른 융해시 배아의 생존율을 알아보고, 동결보존된 배아의 자궁내이식시 배아를 이식하는 주기에 자궁내막을 준비하는 방법에 따라 임신율과 착상율에 있어서 유의한 차이가 있는지 여부를 규명함으로써 배아 동결보존 방법의 정립 및 발전에 기여하고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

서울대학교병원 산부인과 불임클리닉에서 1990년 11월부터 1992년 10월까지 이전의 체외수정시술, 생식세포 난관내이식 시술주기에서 전핵기 1-세포 배아를 3개 이상 동결보존해 두었던 79명의 환자중 41명의 환자를 대상으로 42주기에서 동결보존된 배아의 융해를 시도하여 인공주기에서 배아의 자궁내이식을 시행하였다.

1. 과배란유도 및 난자채취

GnRH α 의 장기투여법(long protocol), 단기투여법(short protocol) 및 초단기투여법(ultra-short protocol)을 이용하여 과배란유도를 시행하였다(그림 1). Human chorionic gonadotropin(hCG)은 최대 여성난포의 평균 직경이 18mm 이상이거나 평균 직경이 16mm 이상인 난포가 3개 이상있는 경우에 투여하였고, hCG

PROTOCOLS OF GnRH AGONIST

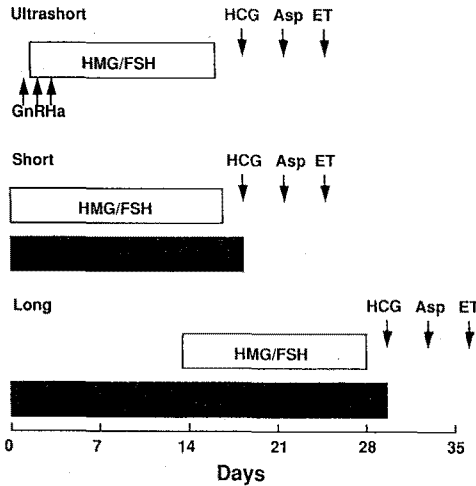


Fig. 1. Schematic representation of GnRH agonist protocols for controlled ovarian hyperstimulation.

투여 35-36시간 후에 질식 초음파(Combison 320, Kretztechnik, Austria)를 이용하여 난포를 흡인하였다.

난포의 흡인 직후 난자의 존재 유무를 확인하고, 획득된 난자를 성숙도에 따라 분류한 후(Veeck et al., 1983) 배양접시에 옮겨서 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 난자의 성숙도에 따라 2-18시간 배양시켰다. 운동성 정자의 수가 5 × 10⁴-10⁵/ml이 되도록 준비된 수정배양액(insemination media, IM) 내에 난자를 14-18시간 노출시킨 후 전핵(pronucleus)이 형성된 것을 관찰하여 난자의 수정 여부를 확인하였다. 전핵이 확인된 수정된 난자중 4-6개만을 성장배양액(growth media, GM)으로 옮겨 계속 배양하였고, 나머지 전핵 상태의 배아는 동결보존하였다.

수정 44-48시간 후 난자의 난할 여부를 확인한 후 자궁내이식을 시도하였는데 이식되는 배아의 수는 최고 4개까지로 하였으며, 나머지 배아는 동결보존하였다.

본 연구에서는 전핵 상태를 지나서 2세포기 이상의 시기에 동결된 배아는 제외하였다.

2. 배아의 동결 및 융해

1) 동결보존액의 제조

인산완충액(phosphate buffered saline, PBS)에 20% 인간 제대혈청(human cord serum)을 첨가하여 기본용액(basic solution)으로 사용하

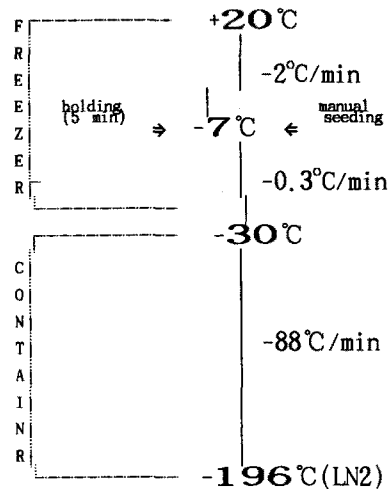


Fig. 2. A cooling program of human pronuclear 1-cell embryos by automatic cell freezer.

였다. 동결보존액(cryoprotectant)은 기본용액에 1.5M 1,2-propanediol(Sigma, Cat. No. P-1009; PROH)과 0.1M sucrose(Sigma, Cat. No. S-0389)를 첨가하여 제조하였다.

2) 동결보존액 내 배아의 평형 및 장진

배아를 동결하기 전에 24-25°C 상온에서 10분 동안 동결보존액에 넣어 평형(equilibration)을 유도하였다. 평형을 유도하는 동안에 배아를 0.25 ml plastic straw 동결 용기에 다음과 같이 장진하였다. 용기에 30 μl의 동결보존액을 흡입하고, 5 mm의 공기층(air)을 형성한 후 난자와 함께 60 μl의 동결보존액을 흡입하였다. 동일한 방법으로 5 mm의 공기층과 30 μl의 동결보존액을 각각 흡입한 다음 마지막 부분은 straw powder로 밀봉하였다.

3) 자동 세포동결기에 의한 배아의 냉각

본 연구에서 사용한 자동 세포동결기(automatic cell freezer; Planner, Model CRYO-10)에 의한 완만냉각 프로그램은 그림 2와 같다.

동결기는 +20°C에서 -7°C까지 1분에 2°C씩(-2°C/min) 냉각한 후 -7°C에서 5분간 정체하였다. 정체 1분 후 과냉각을 방지하기 위하여 액체질소에서 냉각된 핀셋으로 straw에 식빙(seeding)을 실시하였다. 식빙을 실시한 후 -7°C에서 -30°C까지 1분에 0.3°C씩(-0.3°C/min) 온도를 하강하였으며, -30°C에서 10분간 정체함으로써 동결기에서의 냉각을 완료하였다.

냉각된 straw는 canister로 옮겨 동결기에서

액체질소통(liquid nitrogen, LN₂)으로 옮겼다. 이때 straw를 액체질소통으로 침지할 때 1분에 88°C(-88°C/min) 속도로 냉각하였다.

4) 배아의 용해, 재수화 및 배양

배아의 용해는 예정된 배아이식 전날 오후에 실시하였다. 동결된 straw를 액체질소통에서 대기 중으로 옮겨 20초간 노출시킨 후 다시 35°C 항온수조에서 6-7초간 넣어둠으로써 용해를 실시하였다. 용해 후 straw 표면의 물기를 제거한 다음 알코올솜으로 straw를 소독하였다. Straw 내의 배아와 동결보존액을 배양 접시에 부어 해부현미경(×10-×40)하에서 배아를 확인한 후 재수화(rehydration) 용액(basic solution+0.2M sucrose)으로 옮겼다.

이때 배아의 형태를 확인하였으며, 배아의 생존성은 투명대와 세포질이 정상적인 난자를 생존한 난자로 간주하였다. 배아는 재수화 용액에서 8분간 재수화 과정을 거친 후 기본용액으로 옮겨 3회 세척하여 배양액(Ham's F10+7.5% human cord serum)에서 17-18시간 동안 배양한 후 배아가 2-4 세포기 배아로 정상적으로 발달한 것을 확인한 후 자궁내이식을 시행하였다.

3. 배아이식 및 임신의 판정

동결보존된 배아의 이식을 시도하였던 42주기 중 36주기에서는 난소 기능을 억제하지 아니하고 estradiol/progesterone 만을 투여하였고(E-P; 제 1군), 6주기에서는 난소 기능을 억제하기 위하여 GnRHa/estradiol/progesterone을 투여하여(GEEP; 제 2군) 배아이식을 위한 자궁내막의 형성을 인공적으로 유발시켰다.

제 1군의 경우 환자의 월경주기 제 2일부터 제 10일까지는 estradiol valerate(Progynova; Schering, Berlin, Germany)를 하루 2mg, 제 11일부터 제 14일까지는 하루 6mg, 제 15일부터 제 29일까지는 하루 2mg을 경구 투여하였

E₂ valerate

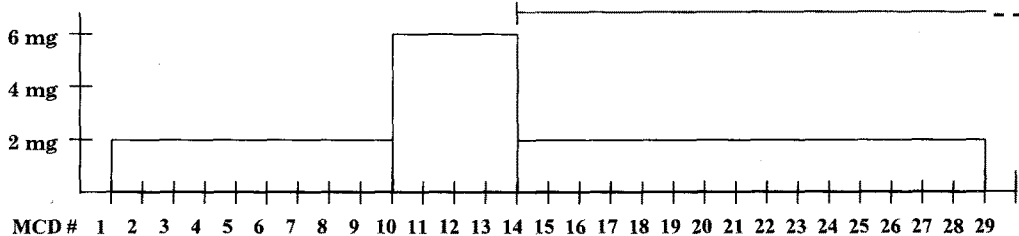


Fig. 3. Time schedule of artificial endometrial stimulation with estrogen and progesterone in Group I (E-P) and Group II (GEEP).

다. 월경주기 제 15일부터는 progesterone in oil(Progest; 삼일제약, Korea)을 하루 100mg씩 근육주사하였다. 제 2군의 경우 월경주기의 황체기 중반부터 GnRHa인 D-Trp-6-LHRH(Decapeptyl; Ferring, Malmo, Sweden)를 피하주사 시작하여 배아이식 전날인 다음번 월경주기 제 17일까지 투여하였다. GnRHa투여 중 월경이 시작되면 estradiol valerate와 progesterone in oil을 투여하게 되는데 투여 방법은 제 1군의 경우와 동일하였다(그림 3).

동결보존되었던 배아의 용해는 월경주기 제 17일에 시행하여 월경주기 제 18일에 배아이식을 시행하였다.

배아이식 후 11일-13일에 혈중 β-hCG를 측정하여 10 mIU/ml이상이면 임신으로 판정하였다. β-hCG의 측정은 hCG-beta-kit(Serono Diagnostics, Switzerland & International)를 이용한 방사면역측정법을 사용하였다. 이 측정의 민감도는 3 mIU/ml이었으며, interassay variance는 6.0%, intraassay variance는 3.1%이었다.

혈중 β-hCG 측정 결과 임신으로 판정되면 1주일 후부터 질식 초음파검사를 이용하여 임신의 확인 및 추적을 하였고, estradiol valerate는 배아이식 후 8주까지, progesterone in oil은 배아이식 후 10주까지 계속 투여하였다.

본 연구에서는 통계학적 분석을 위하여 Student's t-test와 chi-square분석을 이용하였다.

결 과

1. 환자의 특성

자궁내막을 준비하는 방법에 따른 두군간의 환자들의 임상적 특성의 비교에 있어서 환자의 평균 연령은 제 1군(E-P)에서 31.6±3.6세, 제 2군(GEEP)에서 28.8±2.7세로서 통계학으로 유의한 차이가 없었고, 평균 불임기간은

Progesterone in oil 100 mg

제 1군(E-P)에서 5.1 ± 2.9 년, 제 2군(GEEP)에서 5.2 ± 1.7 년으로서 역시 유의한 차이가 없었다. 제 1군의 경우 36명의 환자중 15명(45.7%)이 원발성 불임증이었고, 제 2군의 경우 6명의 환자중 3명(50.0%)이 원발성 불임증이였다(표 1).

2. 동결보존 배아이식 결과

GnRHa를 사용한 난소 기능의 억제과정 없이 estradiol과 progesterone만을 투여하여 배아이식을 위한 자궁내막의 형성을 인공적으로 유발하였던 2명의 환자에서 해당 시술주기가 취소되었는데, 취소된 2주기는 본 연구 대상에서는 제외되었다. 취소된 2주기 중 1주기는 estradiol투여 중 비정상 파탄출혈(abnormal breakthrough bleeding)이 발생하여 취소되었고, 다른 1주기는 난포 발생이 억제되지 않고 초음파검사로 관찰 중 계속 난포의 성장 소견을 보여 취소되었다. 그러나 GnRH-a/estradiol/progesterone을 함께 투여하였던 제 2군에서는 취소된 주기가 없었다.

동결보존된 배아의 융해시 배아 생존율은 64.9%(198/305)이었으며, 제 1군에서는 64.9%

(172/265), 제 2군에서는 65.0%(26/40)로서 유사한 결과를 보였다(표 2).

이식된 배아의 수는 모두 194개로서 배아이식당 평균 배아 수는 4.6개였으며, 제 1군에서는 4.7개(168/36), 제 2군에서는 4.3개(26/6)로서 두 군간에 유의한 차이는 없었다.

제 1군과 제 2군을 모두 합한 배아이식당 임신율은 33.3%(14/42), 착상율은 6.7%(13/194)로 나타났다. 제 1군에서는 배아이식당 임신율은 30.6%(11/36), 착상율은 6.0%(10/168)이었으며 제 2군에서는 각각 50.0%(3/6), 11.5%(3/26)로서 두 군간에 유의한 차이가 없었다.

제 1군의 경우 임신 11예 중 2예는 생화학적 임신(biochemical pregnancy)으로서 배아이식당 임상적 임신율(clinical pregnancy rate)은 25.0%(9/36)이었다. 9예의 임상적 임신 중 4예는 임신 제 6주에서 제 8주사이에 자연유산되어 44.4%의 유산율을 보였고, 1예에서는 우측 난관임신이 발생하여 우측 난관절제술을 시행하였다. 4예는 모두 만삭에 건강한 정상아를 출산하였다. 제 2군의 경우 임신된 3예는 모두 임상적 임신이었는데 이중 1예는 임

Table 1. Characteristics of patients in E-P and GEEP cycles

No.	Group I	Group II	Total
Patients	36	6	43
Age (yr)	31.6 ± 3.6	28.8 ± 2.7	31.2 ± 3.6
Duration of infertility (yr)	5.1 ± 2.9	5.2 ± 1.7	5.1 ± 2.8
Nulligravid (%)	15(41.7%)	3(50.0%)	18(43.9%)
With tubal infertility (%)	26(72.2%)	4(66.6%)	30(73.2%)

Means \pm S.D.

N.S.: None of the differences are statistically significant between E-P(Group I) and GEEP(Group II) cycles.

Table 2. Outcome after cryopreserved-thawed ET in E-P and GEEP cycles

No.	Group I	Group II	Total
Cycles	36	6	42
Survival rate of embryos (%)	64.9%	65.0%	64.9%
No. of embryos transferred*	4.7 ± 1.8	4.3 ± 2.1	4.6 ± 1.9
Pregnancy	11	3	14
PR/ET	30.6%(11/36)	50.0%(3/6)	33.3%(14/42)
Clinical pregnancy	9	3	12
Clinical PR/ET	25.0%(9/36)	50.0%(3/6)	28.6%(12/42)
Take home baby	4	2	6
Take home baby R/ET	11.1%(4/36)	33.3%(2/6)	14.3%(6/42)

Mean \pm S.D., N.S., PR : pregnancy rate.

Table 3. Pregnancy rate per ET according to number of embryos transferred

No. of embryos transferred	Group I	Group II	Total
1	0 (0/2)	0 (0/1)	0 (0/3)
2	66.6 (2/3)	0 (0/1)	50.0% (2/4)
3	0 (0/3)	0 (0/0)	0 (0/3)
4	0 (0/9)	0 (0/0)	0 (0/9)
5	57.1% (4/7)	50.0% (1/2)	55.6% (5/9)
6	50.0% (3/6)	100.0% (1/1)	57.1% (4/7)
7	25.0% (1/4)	100.0% (1/1)	40.0% (2/5)
8	50.0% (1/2)	0 (0/0)	50.0% (1/2)
Total	30.6% (11/36)	50.0% (3/6)	33.3% (14/42)

Table 4. Pregnancy rate per ET according to duration of storage

Duration of storage(Months)	Group I	Group II	Total
≤2	33.3% (5/15)	0 (0/0)	33.3% (5/15)
2-3	25.0% (2/8)	0 (0/1)	22.2% (2/9)
3-4	33.3% (1/3)	100.0% (1/1)	50.0% (2/4)
>4	30.0% (3/10)	50.0% (2/4)	35.7% (5/14)
Total	30.6% (11/36)	50.0% (3/6)	33.3% (14/42)

신 제 7주에 자연유산이 되었고, 나머지 2예는 만삭에 건강한 정상아를 출산하였다. 제 1군에서 9예의 임상적 임신중 다태임신은 1예에서 발생하였는데 쌍태임신이었고, 제 2군에서 3예의 임상적 임신은 모두 단태임신이였다. 따라서 take home baby rate는 제 1군에서 11.1% (4/36), 제 2군에서 33.3% (2/6)이었다.

이식된 배아의 수에 따른 임신율은 표 3과 같다. 즉 배아를 1개 이식하였던 3주기, 3개 이식하였던 3주기, 4개 이식하였던 9주기에서는 임신 예가 없었으며, 배아를 2개 이식하였던 4주기에서는 임신 2예(50.0%), 5개 이식하였던 9주기에서는 임신 5예(55.6%), 6개 이식하였던 7주기에서는 임신 4예(57.1%), 7개 이식하였던 5주기에서는 임신 2예(40.0%), 8개 이식하였던 2주기에서는 임신이 1예(50.0%)로서 자궁내 이식된 배아의 수가 5이상일 때 임신율이 유의하게 높았다.

배아의 동결보존 기간에 따른 임신율은 2개월 이하인 경우 33.3% (5/15), 2-3개월인 경우 22.2% (2/9), 3-4개월인 경우 50.0% (2/4), 4개월 이상인 경우 35.7% (5/14)로서 유의한 차이가 없었다(표 4).

제 1군 36주기 중 12주기에서, 제 2군에 6주기 모두에서 progesterone투여 전날인 월경주기 제 14일에 혈중 estradiol, progesterone, LH를 측정하였는데 제 1군의 경우 12주기 모두에서 LH surge의 소견을 보였으나 제 2군의 경우 6주기 모두에서 LH surge의 소견을 보이지 않았다. 이때 측정된 평균 혈중 농도는 제 1군의 경우 혈중 estradiol은 372.4±61.3 pg/ml, 혈중 LH는 20.1±5.2 mIU/ml, 혈중 progesterone은 12주기 모두에서 0.4 ng/ml이하이었으며, 제 2군의 경우 혈중 estradiol은 331.9±38 pg/ml, 혈중 LH는 1.6±0.6 mIU/ml, 혈중 progesterone은 제 1군의 경우와 동일하게 6주기 모두에서 0.4 ng/ml이하이었다.

고 찰

1983년 Trounson 등이 동결보존된 배아를 이용하여 인간에서 최초로 임신에 성공한 이래 배아의 동결보존에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. 배아의 동결보존 방법의 발달로 체외수정기술이나 생식세포 난관내이식을 시행받는 환자들은 임신 기회를 더욱 많이 제공

받을 수 있게 되었을 뿐만 아니라 경제적, 시간적으로도 많은 도움을 받을 수 있게 되었다. 그러나 동결보존 배아이식시 임신율은 일반적으로 체외수정기술에 비하여 낮은 상태이며, 아직도 해결해야 할 많은 과제를 안고 있다.

동결보존된 배아이식에 있어 성공의 요체는 첫째, 양질의 배아를 많이 얻는 것, 둘째, 배아의 동결 및 융해 과정에서 가능한 한 배아가 동해를 입지 않도록 하는 것, 셋째, 동결보존되었던 배아를 융해하여 자궁내 이식하는 과정에서 배아와 자궁내막 상호간에 시기적 일치성을 갖도록 하는 것 등이다.

GnRHa가 과배란유도에 이용되기 시작한 이래 과배란유도 과정에서 내인성 성선자극호르몬의 분비 억제로 인하여 난포들의 성장을 보다 일치화시킬 수 있으며, 조기의 내인성 LH surge를 방지할 수 있게 되어 양질의 난자를 보다 많이 얻을 수 있게 되어 배아의 동결보존 분야에 있어서도 발전을 가져올 수 있게 되었다.

배아의 동결보존시 동결과정에서 입게되는 동해의 주요인은 세포내의 빙결정 형성과 동결되지 않은 잔류액내에서 용매의 지속적 농도 증가를 유발하는 용액효과(Mazur, 1977; Mazur, 1984; Friedler et al., 1988), 그리고 전해물질의 응고에 의한 완충제 역할의 상실로 인한 급격한 pH의 변화 등으로 이해되며, 융해과정에서의 동해의 주요인은 세포내 빙결정의 재형성과 세포의 지나친 팽윤을 유발하는 삼투효과로 이해되고 있다(Leibo et al., 1974; Mazur, 1980; Friedler et al., 1988).

포유류 및 인간 배아의 동결보존 과정에서 성공율에 영향을 주는 요인들로는 동물의 종, 동결시 배아의 발생단계와 배아의 형태(Cohen et al., 1985; Lassalle et al., 1985), 동결 및 융해 속도(Wilmut, 1972), 동해방지제의 선택(Wilmut, 1972; Testart et al., 1986) 등이 있다. 배아가 동결 및 융해과정에서 가능한 동해를 입지 않도록 하기 위한 노력의 일환으로 배아에 대한 동해방지제의 독성작용(Kasai et al., 1981), 동해방지제의 선택에 따른 효과(Boutron et al., 1979; Rall et al., 1984; Cohen et al., 1985; Lassalle et al., 1985), 동해방지제의 농도에 따른 효과(Kojima et al., 1985) 등에 대하여 연구가 활발히 이루어져 오고 있으나 이에 대한 견해는 연구자들간에 다양하게 보고되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 동해방지제로 PROH를 사용하였는데 PROH는 현재까지 주로 초기 배아의 동결보존에 성공적으로 사용되어 왔다. 1979년 Boutron 등은 PROH용액의 완전한 무정형 상태는 0°C 이하에서도 뛰어난 안정성을 가지며, 이와 같은 성질은 융해시 빙결정의 형성을 제한하게 되므로 glycerol, dimethylsulfoxide(DMSO)에 비하여 우수한 동해방지제라고 보고하였다. 1984년 Renard 등도 토끼의 2-세포기 배아를 이용한 실험에서 PROH가 DMSO보다 독성작용이 적음을 보고하였다. 1985년 Lassalle 등도 PROH는 세포내로 매우 빨리 침투되어 1.5M PROH에 노출된 후 3분 이내에 할구의 퇴축과 재팽윤이 발생하였으며, PROH의 독성작용은 DMSO의 독성작용에 비하여 늦게 나타난다고 보고하면서 동해방지제로 PROH 사용시 수정 후 2일된 인간 배아에서의 생존율이 3일된 배아에서의 생존율보다 유의하게 높았으며, 4-세포기 도달전의 배아가 4-세포기 이후의 배아보다 생존율이 높았음을 보고하였다.

배아의 동결 및 융해 속도에 따라 완만냉각-완만융해, 완만냉각-급속융해, 초급속냉각-급속융해, 유리화현상 등으로 대별될 수 있다. 본 연구에서는 Lassalle 등(1985)과 Testart 등(1986)의 방법을 근간으로 한 완만냉각-급속융해 방법을 사용하였는데 동해방지제가 함유된 동결보존액에서 배아의 팽형을 이루는 과정과 융해시 동해방지제를 제거하고 재수화시키는 과정은 기존의 방법과 차이가 있었다. 즉 이러한 과정은 동해방지제 농도의 급격한 변화로 인한 삼투압 충격을 가능한 완화하기 위하여 여러 단계에 걸쳐 점진적인 농도변화를 이루도록 하였으나 본 연구에서는 예비 실험을 거쳐 동결시와 융해시 모두 1단계로 단순화시켜 시행하였다.

본 연구에서 동결보존되었던 배아의 융해시 생존율은 64.9%로서 다른 연구자들(Lassalle et al., 1985; Mandelbaum et al., 1987; Cohen et al., 1988; Pattinson et al., 1992)의 55%-83%와 유사한 결과를 얻었다. 이는 동결보존액에서 배아의 팽형을 이루는 과정과 융해시 동해방지제를 제거하고 재수화시키는 과정을 본 연구에서와 같이 1단계로 시행한 경우에도 배아에 미치는 삼투압 충격은 심각한 정도는 아닌 것으로 추측된다. 그러나 이러한 가능성을 완전히 배제하기는 힘들 것으로 생각되며, 이

에 대한 더 많은 연구와 자료의 수집, 평가가 필요하리라고 사료된다.

배아이식시 자궁내막의 상태는 배아의 착상에 있어서 매우 중요한 요인으로 작용한다. 동결보존된 인간 배아를 이용하여 최초로 임신에 성공하였던 Trouson 등(1983)을 비롯하여 많은 연구에서 동결보존된 배아의 이식은 자연배란 주기에서 이루어져 왔다(Lassalle et al., 1985; Testart et al., 1986; Cohen et al., 1988). 그러나 이러한 방법은 월경주기가 불규칙하거나 배란이 되지 않는 환자, 황체기 결함이 있는 환자 등에 있어서는 시행하기가 곤란하다. 또한 배아이식을 위하여서는 난포 성장의 초음파검사와 배란전 LH surge시기를 찾는 것이 필요한데 이는 의사와 환자 모두에게 번거롭고, 쉽지 않은 과정인 것이다.

배란 장애가 있는 환자에서 동결보존된 배아를 이식할 수 있는 방법은 첫째, clomiphene citrate, human menopausal gonadotropin (hMG) 등을 사용한 배란유도를 시행하는 방법(Mandelbaum et al., 1987), 둘째, estradiol과 progesterone을 투여하여 인공주기를 만드는 방법 등이다. 이러한 방법은 난소 기능이 정상인 환자에서도 적용될 수 있으며, 난자공여 프로그램에서 널리 사용되어 왔다. 후자의 방법을 난소 기능이 있는 환자에게 적용시 estradiol과 progesterone의 투여와 동시에 일시적인 난소 기능의 억제를 유발하기 위하여 GnRHa를 함께 투여하는 방법이 제시되어 왔는데(Meldrum et al., 1989; Schmidt et al., 1989), 이 경우에 있어서도 자연배란 주기에서의 동결보존된 배아의 이식때 경우와 유사한 성적을 보인다고 보고된 바 있다(Meldrum et al., 1989; Schmidt et al., 1989). 그러나 GnRHa를 사용함으로써 경제적, 시간적 손실이 크며, 이식된 배아가 착상되지 않아 임신에 실패하여 호르몬 치료를 종결하게 되는 경우 자연 배란의 회복이 늦어지는 단점 등이 있을 수 있다. 이러한 이유에서 동결보존된 배아의 이식을 위한 자궁내막의 준비시 GnRHa를 사용하지 않고 estradiol과 progesterone만으로 단순화시킨 호르몬 치료방법을 사용하기도 한다(Jaroudi et al., 1991; de Ziegler et al., 1991; Pattinson et al., 1992). 이 방법은 난소 기능을 상실한 환자에게 난자공여 프로그램시 사용되어 오던 방법으로 동결보존된 배아의 이식시에도 적용되어 왔다. 난소 기능이 있는

환자의 경우에도 적정량의 estradiol을 투여하게 되면 뇌하수체 전엽에서 follicle stimulating hormone(FSH) 분비에 대한 억제효과를 나타내어 난포의 동원, 선택 및 성장을 저하시킬 수 있다.

본 연구에서 estradiol과 progesterone으로 호르몬 치료를 하던 2명의 환자에서 시술주기가 취소되어 연구 대상에서 제외되었는데 이중 1명에서 난포 성장이 억제되지 않고 정상적으로 배란되는 것이 관찰되었다. 따라서 estradiol과 progesterone만으로 단순화시킨 호르몬 치료법이 GnRHa를 함께 투여한 경우에 비하여 경제적, 시간적 장점은 있지만, 난포의 성장을 완전히 막을 수 있는 것은 아니라고 사료된다. de Ziegler 등(1991)은 estradiol을 경피 투여하였던 난소 기능이 있는 모든 환자에서 LH surge가 유발되었음을 보고한 바 있으며, 본 연구에서도 제 1군의 36주기중 estradiol투여 기간 동안 혈중 호르몬을 측정하였던 12주기 모두에서 LH surge가 발생하였다. 그러나 난포의 성장이 억제되어 있는 상태이므로 혈중 LH surge가 혈중 progesterone농도의 증가를 유발하지는 못한 것으로 사료된다. 본 연구 결과에서도 LH surge가 관찰되었던 12주기 모두에서 progesterone투여 전날의 혈중 progesterone 농도는 0.4 ng/ml 이하의 낮은 값을 보였다. 따라서 LH surge가 자궁내막의 배아 수용성(receptivity)에는 영향을 미치지 못할 것으로 사료되며, 자궁내막의 수용성은 투여된 progesterone에 자궁내막이 노출된 기간에 의하여 결정되는 것으로 사료된다.

동결보존된 배아의 이식을 인공 주기에서 시행하는 것이 자연배란 주기에서 시행하는 것에 비하여 시술주기의 취소율이 낮고, 시술 과정을 단순화시킴으로써 번거로움을 피할 수 있는 장점이 있다. 그러나 estradiol과 progesterone을 투여한 인공 주기에서는 자궁내막의 조직학적 형태와 월경주기상의 날짜간에 어느 정도 차이가 발생하게 되며, 특히 자궁내막선(endometrial gland)과 간질(stroma)간에 시기적으로 불일치(asynchrony)가 발생하게 되어 내막간질의 분비기에서의 변화가 내막선에 비하여 다소 선행되는 것으로 알려져 있다(Rosenwaks, 1987; Steingold et al., 1989; Navot et al., 1989). 그러나 이와 같은 자궁내막의 불일치성에도 불구하고 난자공여시 estradiol과 progesterone으로 준비된 인공 주기에서 신선한, 혹

은 동결보존 되었던 배아의 이식시의 임신율과 착상율이 정규 체외수정시술의 경우에 비하여 상대적으로 우수하다는 사실은 잘 알려져 있으며(Rosenwaks, 1987; de Ziegler et al., 1990; Paulson et al., 1990; Navot et al., 1991), 따라서 인공주기에서의 자궁내막 불일치성의 문제는 실제로 배아의 착상과 관련된 자궁내막의 배아 수용성에 있어서는 별다른 영향을 미치지 못할 것으로 사료된다.

인공 주기를 배아이식에 이용하게 되는 경우 GnRHa로 난소 기능을 억제시킨 후 estradiol과 progesterone을 투여하는 방법과 estradiol과 progesterone만을 투여하는 방법간에 배아의 임신율 및 착상율에 있어서 유의한 차이가 없음이 보고되고 있지만(Jaroudi et al., 1991; de Ziegler et al., 1991) 이러한 결과는 모두 동일한 대상군에서 동시에 시술이 이루어져 비교된 결과는 아니며, 본 연구에서도 두 군간에 배아의 임신율 및 착상율에 있어서 유의한 차이는 없었지만 GnRHa를 함께 사용한 제 1군이 다소 높은 임신율과 착상율을 나타내었다. 한편 본 연구에서 estradiol과 progesterone만을 사용하였던 제 1군의 대상 환자 수에 비하여 GnRHa를 함께 사용하였던 제 2군의 대상환자 수가 매우 적었으므로 앞으로 연구 대상환자 수를 확대한 비교 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

서울대학교병원 산부인과에서 1990년 11월부터 1992년 10월까지 이전의 체외수정시술, 생식세포 난관내이식 시술 주기에서 전핵기 1-세포 배아를 3개 이상 동결보존하여 두었던 79명의 환자중 41명의 환자를 대상으로 42주기에서 동결보존된 배아의 용해를 시도하여 estradiol과 progesterone만을 투여하였던 36주기(E-P; 제 1군)와 GnRHa를 동시에 투여하였던 6주기(GEEP; 제 2군)에서 각각 배아의 자궁내이식을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 동결보존된 배아의 용해시 배아 생존율은 64.9%(198/305)이었으며, 제 1군에서는 64.9%(172/265), 제 2군에서는 65.0%(26/40)로서 유사한 성적을 보였다. 이식된 배아의 수는 모두 194개로 배아이식당 평균 배아 수는 4.6개이었으며, 제 1군에서는 4.7개(168/

36), 제 2군에서는 4.3개(26/6)로서 두 군간에 유의한 차이는 없었다.

2. 배아이식당 임신율은 33.3%(14/42), 착상율은 6.7%(13/194)이었다. 제 1군에서는 배아이식당 임신율은 30.6%(11/36), 착상율은 6.0%(10/168), 제 2군에서는 각각 50.0%(3/6), 11.5%(3/26)로서 두 군간에 유의한 차이가 없었다.

3. 배아이식당 임상적 임신율과 take home baby rate는 제 1군에서는 각각 25.0%(9/36), 11.1%(4/36), 제 2군에서는 각각 33.3%(2/6), 33.3%(2/6)이었다.

4. 자궁내이식된 배아의 수에 따른 임신율은 이식된 배아의 수가 5개 이상일 때 유의하게 높았다.

5. 배아의 동결보존 기간에 따른 임신율에는 유의한 차이가 없었다.

6. 제 1군 36주기 중 12주기에서, 제 2군 6주기 모두에서 progesterone투여 전날인 월경주기 제 14일에 측정된 평균 혈중 호르몬 농도는 제 1군의 경우 혈중 estradiol은 372.4 ± 61.3 pg/ml, 혈중 LH는 20.1 ± 5.2 mIU/ml, 혈중 progesterone은 12주기 모두에서 0.4 ng/ml 이하이었으며, 제 2군의 경우 혈중 estradiol은 331.9 ± 38 pg/ml, 혈중 LH는 1.6 ± 0.6 mIU/ml, 혈중 progesterone은 6주기 모두에서 0.4 ng/ml 이하이었다. 따라서 제 1군의 경우 12주기 모두에서 LH surge의 소견을 보였으나 제 2군의 경우 6주기 모두에서 LH surge의 소견을 보이지 않았다.

인 용 문 헌

- 문신용, 김석현, 신창재, 김정구, 이진용, 장윤석: Survival rate of pronuclear stage mouse embryo after cryopreservation. Unpublished, 1990.
- Boutron P, Kaufmann A: Stability of amorphous state in the system water 1-2 propanediol. *Cryobiology* 1979, 16, 557.
- Cohen J, Somons FR, Edwards RG, Fehilly CB, Fishel SB: Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J in Vitro Fertil Embryo Transfer* 1985, 2, 59.
- Cohen J, DeVane GW, Elsner CW, Fehilly CB, Kort HI, Massey JB, Turner Jr. TG:

- Cryopreservation of zygotes and early cleaved human embryos. *Fertil Steril* 1988, 49, 283.
- de Ziegler D, Gagliardi C, Matt D, Steingold K, Sealy J, Weiss G, Schmidt C: Ovarian replacement through non oral route: increase in sex hormone binding globulin (SHBG) when physiological levels of E₂ and P are achieved (Abstr. 1277). Presented at the 70th Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans, Louisiana, June 8 to 11, 1988. Published by the Endocrine Society, in the Program Supplement, p 1279.
- de Ziegler D, Frydman R: Different implantation rates after transfers of cryopreserved embryos originating from donated oocytes or from regular in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990, 54, 682.
- de Ziegler D, Cornel C, Bergeron C, Hazout A, Bouchard P, Frydman R: Controlled preparation of the endometrium with exogenous estradiol and progesterone in women having functioning ovaries. *Fertil Steril* 1991, 56, 851.
- Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ: Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 1988, 49, 743.
- Jaroudi KA, Hamilton CJCM, Willemsen WNP, Sieck UV, Roca G: Artificial endometrial stimulation for frozen embryo replacement. *Fertil Steril* 1991, 55, 835.
- Kasai M, Niwa K, Iritani A: Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1983, 63, 175.
- Kojima T, Soma T, Ofuri N: Effects of rapid addition and dilution of Dimethyl Sulfoxide of the viability of frozen-thawed rabbit morulae. *Cryobiology* 1985, 22, 409.
- 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.
- Leibo SP, Mazur P, Jackowski SC: Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp Cell Res* 1974, 89, 79.
- Lutjen P, Trounson A, Leeton J, Findlay J, Wood C, Renou P: The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. *Nature (Lond)* 1984, 307, 174.
- Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Alvarez S, Debache C, Salat-Baroux J, Cohen J: Human embryo cryopreservation extrinsic and intrinsic parameters of success. *Hum Reprod* 1987, 2, 709.
- Mazur P: The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 1977, 14, 251.
- Mazur P: Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities. *Orig Life* 1980, 10, 137.
- Mazur P: Freezing of living cells: mechanisms and implication. *Am J Physiol* 247 (Cell Physiol) 1984, 16, C125-C142.
- Meldrum DR, Wisot A, Hamilton F, Gutlay-Yeo AL, Marr B, Huynh D: Artificial agonadism and hormone replacement for oocyte donation. *Fertil Steril* 1989, 52, 509.
- Navot D, Laufer N, Kopolovic J, Rabinowitz R, Birkenfeld A, Lewin A, Granat M, Margalioth EJ, Schenker J: Artificially induced endometrial cycles and establishment of pregnancies in the absence of ovaries. *N Engl J Med* 1986, 314, 806.
- Navot D, Anderson TL, Droesh K, Scott RT, Kreiner D, Rosenwaks Z: Hormonal manipulation of endometrial maturation. *J Clin Endocrinol Metab* 1989, 68, 801.
- Navot D, Bergh PA, Williams M, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, Grunfeld L: Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet* 1991, 337, 1375.
- Pattinson HA, Greene CA, Fleetham J, Anderson-Sykes SJ: Exogenous control of the cycle simplifies thawed embryo transfer and results in a pregnancy rate similar to that for natural cycles. *Fertil Steril* 1992, 58, 627.

- Paulson RJ, Sauer MV, Lobo RA: Embryo implantation after human in vitro fertilization: importance of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 1990, 53, 870.
- Quinn P, Kerin JFP: Experience with the cryopreservation of human embryos using the mouse as a model to establish successful techniques. *J in Vitro Fertil Embryo Transfer* 1986, 3, 40.
- Rall WP, Czlonkowska M, Barton S: Cryoprotection of day-4 mouse embryos by methanol. *J Reprod Fertil* 1984, 70, 293.
- Renard JP, Nguyen BX, Garnier V: Two-step freezing of two cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J Reprod Fertil* 1984, 71, 573.
- Rosenwaks Z: Donor eggs: their application in modern reproductive technologies. *Fertil Steril* 1987, 47, 895.
- Salat-Baroux J, Cornet D, Alvarez S, Antoine JM, Tibi C, Mandelbaum J, Plachot M: Pregnancies after replacement of frozen-thawed embryos in a donation program. *Fertil Steril* 1986, 49, 817.
- Schmidt CL, Ziegler D, Gagliardi CL, Mellon RW, Taney FH, Kuhar MJ, Colon JM, Weiss G: Transfer of cryopreserved-thawed embryos: the natural cycle versus controlled preparation of the endometrium with gonadotropin-releasing hormone agonist and exogenous estradiol and progesterone(GEEP). *Fertil Steril* 1989, 52, 609.
- Steingold K, Stumpf P, Kreiner D, Liu HC, Navot D, Rosenwaks Z: Estradiol and progesterone replacement regimens for the induction of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 1989, 52, 756.
- Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Fryman R: High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 1986, 46, 268.
- Trounson AO, Mohr L: Human pregnancy following cryopreservation thawing transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983, 305, 707.
- Trounson A: Preservation of human eggs and embryos. *Fertil Steril* 1985, 46, 1.
- Veeck LL, Wortham JWE, Jr, Witmyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JE, Jones GS, Jones HW, Jr.: Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983, 39, 594.
- Whittingham DG, Leibo B, Mazur P: Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science* 1972, 178, 414.
- Wilmut I: The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Science* 1972, 11, 1071.