

여성의 난소 피질조직의 초자화 냉동보존

차병원 여성의학연구소¹, 포천중문 의과대학교²

이경아^{1,2} · 이숙현¹ · 하상덕¹ · 윤세진¹ · 고정재^{1,2} · 이우식^{1,2}
윤태기^{1,2} · 차광열^{1,2}

Cryopreservation of the Human Adult Ovarian Cortical Tissues by Vitrification

K.A. Lee^{1,2}, S.H. Lee¹, S.D. Ha¹, S.J. Yoon¹, J.J. Ko^{1,2}, W.S. Lee^{1,2},
T.K. Yoon^{1,2} and K.Y. Cha^{1,2}

*Infertility Medical Center¹, CHA General Hospital, College of Medicine,
Pochon CHA University², Seoul, 135-081, Korea*

= Abstract =

The present study was conducted to evaluate whether vitrification could be used for ovarian tissue preservation. The important issue here is that the vitrification is very simple, easy, and economical compared to the conventional cryopreserving method that using automatic freezing instrument. Human ovarian cortical tissues were cryopreserved by vitrification with 5.5 M ethylene glycol and 1.0 M sucrose as cryoprotectant. Three points of temperature (4°C, room temperature, and 37°C) and two points of duration (5 or 10 minutes) for cryoprotectant treatment were examined to determine the best condition for vitrification of the human ovarian cortical tissues. After thawing, viability of the isolated primordial follicles was examined by dye-exclusion method. Histological appearance of tissues before and after the cryopreservation was evaluated. There was no toxic effect of the 5.5 M ethylene glycol on the primordial follicles. However, when the tissues were treated with cryoprotectant at 37°C for 10 minutes and exposed to liquid nitrogen, it seems likely that there is certain deleterious effects on the viability of the primordial follicles. The highest viability of the primordial follicles was obtained with the treatment of cryoprotectant at room temperature for 10 minutes. Follicles and oocytes survived after freezing and thawing had the similar normal shapes as was seen in the specimens before cryopreservation. It would be useful to apply vitrification in establishing ovarian tissue banking for clinical purposes.

Key Words: Vitrification, Human adult ovarian cortical tissue, Viability

서 론

여성의 생식세포나 난소조직, 혹은 난소 그 자체를 생체 밖에서 오랫동안 보관할 수 있는 방법이 개발된다면, 암 치료를 위해 방사선치료나 화학

학치료를 받아야 하는 결혼적령기 또는 더 어린 나이의 여성을 위해 더 없이 유용한 방법이 될 것이다. 또한 이러한 방법으로 저장 보관되는 생식세포나 난소조직은 윤리적인 기준에 합당하는 범위 내에서 불임여성의 치료에도 긴요하게 사용되어질 수도 있을 것이다. 따라서 여성의 생식세

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

포 및 난소조직을 보관할 수 있는 방법의 개발이 꼭 필요하다고 할 수 있겠다.

현재까지 난자 또는 수정이 일어난 초기배아의 냉동보존을 위해 다양한 냉동보관 방법이 개발되어 왔으나 초기배아의 냉동보존은 윤리적인 문제로 어려움이 있고, 난자의 냉동보존은 난자의 염색체 및 방추사의 비정상이 높은 비율로 나타나는 등의 어려움이 있어서 임상에의 실질적인 적용이 이루어지지 못하고 있는 상태이다 (Park *et al.*, 1997). 성숙 난자 혹은 미성숙 난자를 냉동보존할 때 녹인 후의 생존율이 낮고 또한 세포질 내에서 여러 가지 비정상적인 현상이 많이 나타남으로서 냉동보존의 성공률이 낮다. 이에 최근 들어서 난자보다 크기도 작고 물질대사도 적게 일어나며 그 갯수도 월등히 많은 primordial follicles (원시난포)의 냉동보존에 더 많은 관심이 기울여지고 있다. 실제로 생쥐의 난소조직을 냉동보존 하였다가 해동한 후, 다른 개체에 이식하여 산자를 얻은 첫 보고는 1960년 Parrot에 의해서였다 (Parrot, 1960). 그 후 1993년 Carrol과 Gosden은 생쥐의 원시난포를 분리하여 dimethylsulphoxide (DMSO)를 이용하여 냉동보존 하였다가 다른 개체에 이식하여 산자를 얻는데 성공하였다 (Carroll and Gosden, 1993). 양에서도 똑같은 방법으로 DMSO를 이용하여 난소조직을 냉동보존 하였다가 다른 개체에 이식하여 임신한 개체를 얻는데 성공하였다 (Gosden *et al.*, 1994). 앞에서 인용한 바, 양과 같은 대동물에서의 성공은 사람의 난소조직을 가지고도 이와 같은 연구가 가능할 수 있음을 시사해 주고 있다.

사람의 경우에는, 연구에 필요한 난소조직을 얻기가 매우 어렵고, 얻어진 난소조직 내에 존재하는 원시난포의 갯수 및 그 분포가 매우 불규칙하여 많은 연구가 이루어지지 못하고 있다. 1996년 Newton 등은 DMSO, ethylene glycol (EG), propylene glycol, glycerol 등 4종류의 cryoprotectant (항동해제)를 사용하여 사람의 난소조직을 냉동보관 하였다가 severe combined immunodeficiency (SCID) 생쥐에 그 조직을 이식하여 생존율 및 난포의 발달을 관찰하였다 (Newton *et al.*, 1996). 이들 중 glycerol을 제외한 나머지 항동해제가 비슷한 결과를 보였다. 같은 해에 Hovatta 등도 DMSO와 propandiol-sucrose를 항동해제로 이용하여 냉동보관 하였을 때 해동 후의 난소조직 및 난포, 난자에 형태학적 차이가 없음을 보고하였다 (Hova-

ta *et al.*, 1996). 위의 실험들은 고가의 장비를 필요로 하며, 냉동하는데 장시간이 소요된다는 단점이 있다. 만약 더 간편하고 용이하며, 저렴한 방법이 개발된다면, 임상에의 접목이 더욱 용이할 것이다. 따라서 본 연구는 사람의 난소조직을 매우 간단하고 용이한 vitrification (초자화 냉동보존법)으로 냉동보존하였다가 해동한 후의 조직적 변화와 원시난포의 생존율을 관찰하여 임상에 사용할 수 있는지의 여부를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 난소조직과 cortex 조각들의 준비

난소조직은 차병원을 내원한 환자중 부인과적 수술을 받은 환자로부터 적출된 난소에서 회수하였다. 회수된 난소조직은 Leibovitz's L-15 배양액 (Gibco, USA)에 1% FBS (Fetal Bovine Serum), 50 U Penicillin/ml, 50 µg Streptomycin/ml을 첨가한 배양액으로 여러 번 세척해 주었다. 그 후 난소조직에서 수질부분 (stroma)을 제거하고 많은 원시난포를 포함하고 있는 피질부분 (cortex)을 약 1 mm 두께로 잘라 내고, 해부현미경 아래에서 초자화 냉동보존에 적합한 크기인 2×2 mm로 잘라서 동결 준비를 하였다. 이 모든 과정은 위에서 언급한 Leibovitz's L-15 배양액에서 이루어졌다.

2. 초자화 냉동보존 (Vitrification)

초자화 냉동보존에 사용한 항동해제는 Martino 등 (Martino *et al.*, 1996)이 사용한 바 있었던 EG5.5를 기본으로 만들어 사용하였다. EG5.5는 20 mM HEPES가 첨가된 Waymouth 752/1 media (Gibco, USA)에 5.5 M EG (Ethylene Glycol)과 1 M Sucrose, 10% FBS를 첨가한 것으로, 0.22 µm filter로 여과하여 사용하였다. 항동해제는 사용하기 전에 각 온도로 prewarming시켜 사용하였다. 피질조각들이 항동해제에 노출된 온도 및 시간의 영향을 알아보기 위해 2×2 mm크기로 자른 피질조각들을 각각 5분 또는 10분 동안 4℃, room temperature (RT), 37℃로 유지시킨 항동해제에 노출시킨 후, 전자현미경용 grid 위에 조직을 올려서 항동해제를 제거하고 곧바로 액체질소에서 동결시켜 보존하였다.

3. 해동과정

동결된 난소 피질조각들을 해동하기 위해 액

체질소에서 꺼낸 grid를 0.5 M sucrose용액에서 30초간 녹인 후 피질 조각들만 다시 0.5 M sucrose 용액으로 옮겨서 10분 동안 처리해 주었다. 그 후 0.25 M, 0.125 M sucrose용액으로 옮기며 각각 10분씩 처리해 주었고, 마지막에 Waymouth 752/1 배양액에 5분씩 두 번 처리해 주었다. 해동에 사용된 용액의 제조는 Martino 등 (Martino *et al.*, 1996)에 의한 방법을 이용하였는데 각 sucrose용액은 10% FBS와 20 mM HEPES가 첨가된 Waymouth 752/1 배양액 (Gibco, USA)에 희석하여 제조하였고, 해동시 용액의 온도는 37°C로 유지시켜 주었다.

4. 조직학적 분석

관찰할 조직은 10% formalin에서 고정하고, 에탄올로 탈수시킨 후 paraffin wax에 embedding하였다. 각 조직들은 5 µm 두께로 잘라서 슬라이드를 만들었고, 10개의 section당 하나의 조직을 슬라이드에 얹어서 같은 원시난포가 각각의 슬라이드에 두 번 나타나지 않도록 하였다. 준비된 슬라이드는 hematoxylene과 eosine으로 염색하여 광학 현미경으로 상태를 관찰하였다.

5. 생존율 분석

원시난포를 조직으로부터 분리해 내기 위하여

해동 후 조직들을 잘게 자른 후 8 U/ml DNase I (Sigma, USA)과 1 mg/ml collagenase type 1A가 들어 있는 배양액에서 온도는 37°C를 유지시키며 2시간 동안 반응시켰다. 그 후에 Leibovitz 배양액으로 두 번 세척한 후, 효소처리로 느슨해진 조직으로부터 원시난포를 27계이지 바늘을 이용하여 분리하였다. 분리된 원시난포는 0.4% trypan blue용액으로 3분 동안 처리하여 생존율을 분석하였다. Trypan blue가 전혀 들어가지 않은 난포만을 살아있는 것으로 계산하였다.

6. 통계처리

항동해제의 독성 및 노출 시간과 온도의 영향에 대한 통계는 살아있는 원시난포의 백분율을 ANOVA로 분석하였다. 유의차에 대한 수준은 p 값이 0.05보다 작은 경우에 유의성이 있다고 분석하였다.

결 과

Fig. 1의 사진은 조직을 해동하고 효소를 처리한 후 조직으로부터 여러 가지 크기의 난포를 분리하여 낸 후, trypan blue를 처리하기 전 (A)과 후 (B)의 난포의 사진이다. 이 난포들을 각각의 크기별로 나누어 보았을 때, 50 µm 이하의 크기를

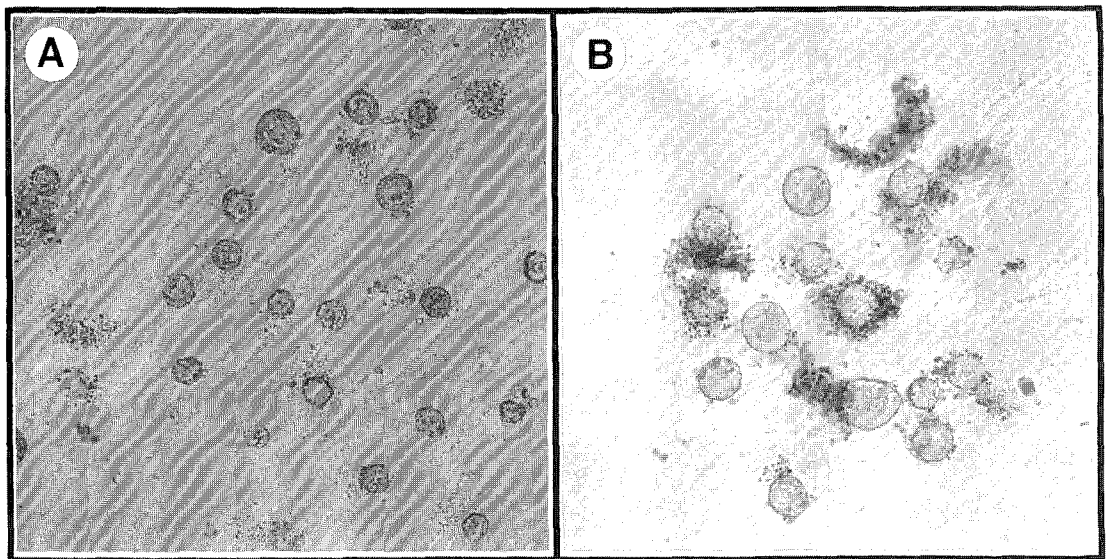


Fig. 1. Isolated early stage follicles at various sizes before (A) and after (B) 0.4% trypan blue treatment for viability assessment.

갖는 원시난포의 생존율을 정리한 것이 Fig. 2의 그래프이다. 사진 B에서 난포 주위에 남아 있는 somatic cells이 대부분이 염색이 되는 것과는 대조적으로 그 안의 원시난포는 염색되지 않는 것을 볼 수 있었다. 사진에서는 구별이 어려워 보이지만, 결의 somatic cells이 염색된 것인지 난포의 내

부가 염색이 된 것인지는, 현미경 아래에서 구별이 가능하였다.

Fig. 2는 solution control (회색막대)과 초자화 냉동보존 (빗금친 막대), 두 군간의 생존율을 비교하여 나타낸 그림이다. Solution control군은 본 실험에 사용한 EG5.5의 독성여부를 알아보기 위하

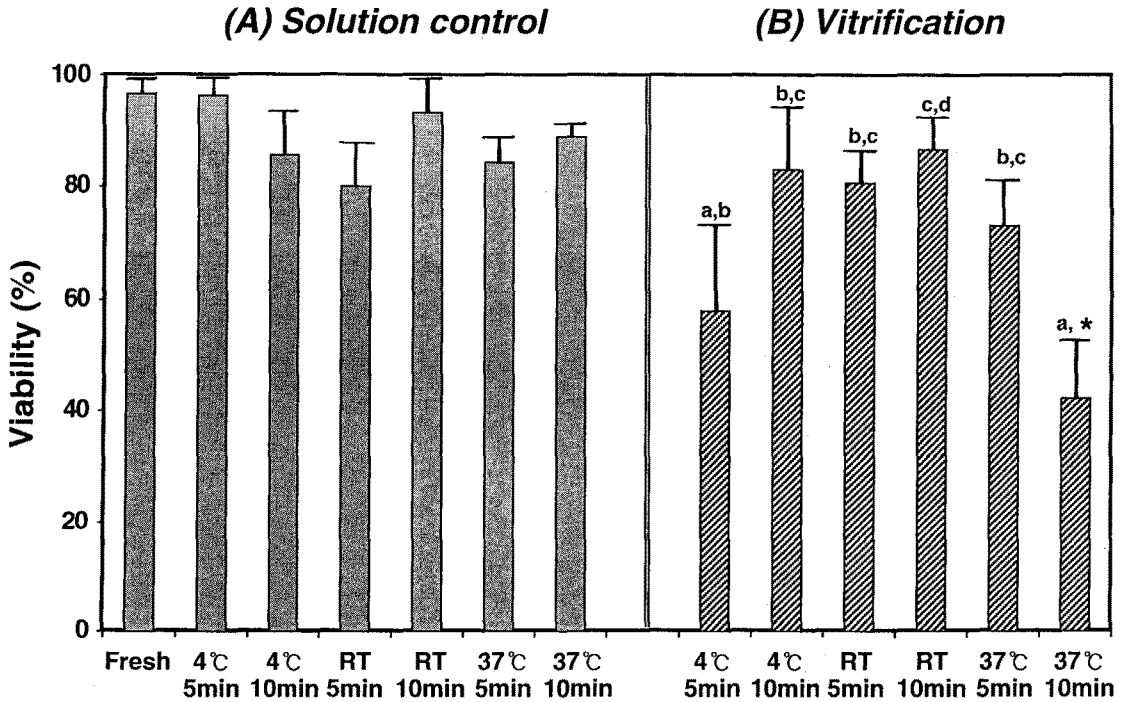


Fig. 2. Survival rates of the human primordial follicles after vitrification with different equilibration protocols. Data represent means \pm SEM from 3 experiments. Different letters (a, b, c, and d) indicate significant differences between different protocols ($p < 0.05$). Asterisk indicate significant differences between solution control and vitrification groups. RT: room temperature.

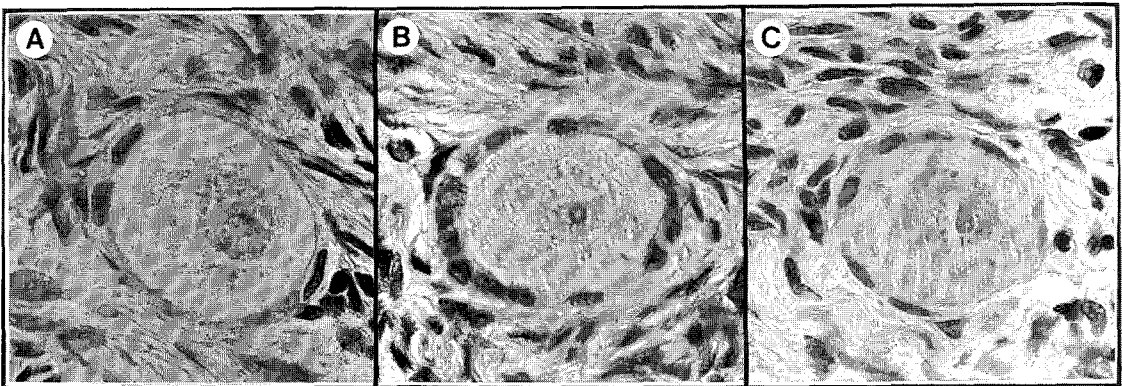


Fig. 3. Typical microphotographs of the human primordial follicles before (A) and after (B, and C) cryoprotectant treatment. B: solution control (4°C, 10 minutes), C: vitrification (37°C, 5 minutes).

여 실제로 초자화 냉동보존군과 똑같이 각 온도 및 시간에서 EG5.5를 처리한 후, 액체질소에 넣는 과정만은 제외하고 바로 해동과정으로 처리한 것이다. Fig. 1에서 볼 수 있는 바와 같이 solution control의 경우, 어느 온도, 어느 시간에서나 생존율이 80% 이상을 나타내었고, 이는 아무런 처리를 하지 않고 생존율을 측정한 경우, 즉 fresh군의 생존율 ($96.7 \pm 1.3\%$)과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 초자화 냉동보존을 한 경우, 항동해제를 처리한 온도 및 시간에 따라서 생존율에 차이를 보였다. 가장 높은 생존율을 보인 군은 room temperature에서 10분간 처리한 경우 ($86.8 \pm 9.2\%$)였고, 그 다음으로 4℃에서 10분, room temperature에서 5분, 37℃에서 5분간 처리한 경우의 차례로 높은 생존율을 보였다 (각 차례대로, $83.1 \pm 12.4\%$, $80.9 \pm 0.1\%$, $73.3 \pm 9.7\%$). 그러나 4℃에서 5분이나 37℃에서 10분 처리한 경우에는 전의 다른 군들에 비하여 낮은 생존율을 보였으며, 37℃에서 10분 처리한 경우에 생존율이 가장 낮았고 ($42.5 \pm 9.5\%$), 이때의 생존율은 solution control의 것보다도 통계적으로 유의하게 떨어지는 것이었다 (Fig. 2의 별표).

Fig. 3은 fresh (A), solution control (B), 초자화 냉동보존 (C) 등 각 군의 대표적인 조직학사진을 보여주고 있다. 핵, 세포막, 난모세포를 둘러싸고 있는 pregranulosa cells, 주위 조직의 형태 등이 세 군간에 큰 차이를 보이지 않았다.

고찰 및 결론

본 연구는 초자화 냉동보존법을 이용하여 여성의 난소조직을 냉동보존 할 때 요구되는 적당한 항동해제의 처리 온도 및 시간을 찾아내기 위하여 시행되었다. 본 연구에서 얻은 중요한 결과로는 1) 난자나 수정란 또는 분할하고 있는 초기배 뿐 만 아니라 난소의 피질조직도 초자화 냉동보존법을 이용하여 냉동보존할 수 있다. 2) 이때 피질조직에 존재하는 대부분의 원시난포가 높은 생존율로 보존될 수 있었다. 3) 항동해제 EG5.5는 원시난포에 독성이 없었다. 4) 항동해제로 EG5.5를 사용할 경우, 가장 좋은 처리 온도와 시간은 room temperature에서 10분이었다.

원시난포를 포함한 발생 초기의 난포를 동결하는 일은 그크기가 매우 작고 (150~200 μm 이하), 대사율이 낮으며, 이러한 난포가 난소조직

안에 많은 숫자로 존재하기 때문에, 그 크기가 크고, 숫자에 제한이 많은 난자나 수정란, 초기배 등을 동결하는 것에 비하여 큰 이점이 있을 것으로 사료된다 (Gosden, 1992). 난소조직을 동결보존 하였다가 이를 조직 이식하여 산자를 낳게 한 연구가 생쥐 (Gunasena *et al.*, 1997; Sztain *et al.*, 1998)와 양 (Gosden *et al.*, 1994) 등에서 보고되어 있다. 이때에 사용된 난소조직의 동결방법은 slow freezing이었다. 특히 사람의 생리에 가깝다고 할 수 있는 양에서의 성공은 이와 같은 연구가 사람에서도 가능하리라는 희망을 갖게 하였다. 이후 여성의 난소조직 동결에 관한 연구가 활기를 띠고 시작되었다.

여성의 난소조직을 냉동보존하려는 시도는 아직 많지 않은 실험실에서 진행되어, 몇몇 보고가 되어 있을 뿐인데, 대부분 난자에서와 마찬가지로 1.5 M의 DMSO, PROH, glycerol, ethylene glycol 등의 항동해제를 사용하고 cryo-freezer를 이용한 slow freezing 방법을 사용하였다 (Hovatta *et al.*, 1996; Newton *et al.*, 1996; Oktay *et al.*, 1997, 1998). 본 연구에서 사용한 초자화 냉동보존방법 (vitrification)은 slow freezing에 비하여 그 과정이 매우 간편하고 경제적이어서 이 방법을 사용하였을 때 생식세포 즉, 난포나 그 안에 존재하는 난자에 상해를 주지 않는다는 안정성이 확인이 된다면 임상에 적용하였을 때에 slow freezing 법에 비하여 많은 이점이 있다고 할 수 있겠다. 따라서 본 연구에서는 여성의 난소조직을 초자화 냉동보존방법으로 동결하였을 때 얻어지는 생존율을 검사하였으며, 여러 가지 조건 중에서 가장 좋은 동결조건을 찾으려고 시행되었다.

1997년 Oktay 등은 1.5 M ethylene glycol을 사용한 slow freezing 방법으로 여성의 난소조직을 냉동보존 하였다가, fresh한 조직과 냉동보존되었던 조직으로부터 분리한 직경 30~50 μm인 원시난포의 생존율이 각각 $71.6 \pm 2.4\%$, $71.5 \pm 4.7\%$ 임을 보고하였다 (Oktay *et al.*, 1997). 이들이 사용한 난포의 분리법과 본 연구에서 사용한 방법은 동일한 방법이었다. 이에 비교하여 본다면, 본 실험에서 얻은 결과는 매우 만족한 것이라고 할 수 있겠다. 즉 fresh군의 생존율 ($96.7 \pm 3.7\%$)과 모든 군에서 80% 이상으로 관찰된 solution control군의 생존율 (range: 80.2~96.3%)은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 초자화 냉동보존을 한 경우, 가장 낮은 생존율을 보인 37℃에서 10분

처리군의 생존율 ($42.5 \pm 9.5\%$)과 4°C 에서 5분 처리군의 생존율 ($57.8 \pm 16.0\%$)을 제외하고는 항동해제를 처리한 온도 및 시간에 따라서 생존율은 다소의 차이는 보였지만 모두 73.3%가 넘는 높은 생존율 (range: 73.3~86.8%)을 보여주었다. 이 결과는 fresh나 solution control의 결과와 통계적으로도 유의한 차이가 없었다. 37°C 에서 10분 처리군의 생존율 ($42.5 \pm 9.5\%$)이 가장 낮았던 것으로 미루어 이렇게 높은 온도에서는 항동해제의 조직으로의 침투속도가 매우 빠르기 때문에 10분의 처리시간이 너무 길어 오히려 원시난포의 생존에 나쁜 영향을 나타낸 것으로 보인다. 반면에 4°C 의 경우에는 항동해제가 충분히 조직을 침투하기에는 5분 처리시간이 짧았기 때문에 원시난포의 생존율이 떨어진 것으로 생각된다. 본 연구에서 사용한 EG5.5는 1996년 Martino 등이 소의 난자를 냉동보존 하는데 사용하였던 항동해제로서 (Martino *et al.*, 1996), 이번 연구에서 사람의 난소조직, 특히 원시난포에도 안전하게 사용될 수 있다는 것을 알 수 있었다.

결론적으로, 본 실험의 결과는 앞으로 여성의 난소조직을 동결보존함에 있어서 초자화 냉동보존 방법을 사용할 때 가장 적당한 동결조건을 제시하여 줌으로써 임상예의 이용에 한 걸음 다가갈 수 있게 하여 주었다고 사료된다. 그러나 아직까지 난포내 난자의 생존율과 실제로 이와 같이 동결되었던 난포 및 난자의 체외 배양시 성장정도 및 양상, 여기서 파생된 난자의 수정능력과 초기배로의 정상적인 발달 등에 대한 안전성 여부를 밝히는데 더욱 정밀한 분석이 필요하다고 본다. 다음에 이어질 연구는 이와 같은 방법을 사용하였을 때 조직에서 일어나는 세포내 변화를 조금 더 정밀하게 분석하고 확인하는 단계가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG: Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Hum Reprod* 1995, 10, 2334-2338.
- Carroll J, Gosden RG: Transplantation of frozen-thawed mouse primordial follicles. *Hum Reprod* 1993, 8, 1163-1167.
- Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R: Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C . *Hum Reprod* 1994, 9, 597-603.
- Gosden RG: Transplantation of fetal germ cells. *J Assist Reprod Genetics* 1992, 9, 118-123.
- Gunasena KT, Villines PM, Critse ES, Critse JK: Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 1997, 12, 101-106.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP: Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996, 54, 1059-1069.
- Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R: Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 1996, 11, 1487-1491.
- Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG: Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 1998, 13, 1133-1138.
- Oktay K, Nugent D, Newton H, Salha O, Chatterjee P, Gosden RG: Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril* 1997, 67, 481-486.
- Park SE, Son WY, Lee SH, Lee KA, Ko JJ, Cha KY: Chromosome and spindle configurations of the human oocytes matured in vitro following cryopreservation at germinal vesicle (GV) stage. *Fertil Steril* 1997, 68, 920-926.
- Parrott DMV: The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J Reprod Fertil* 1960, 1, 230-241.
- Sztein J, Sweet H, Farley J, Mobraaten L: Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: New approach in gamete banking. *Biol Reprod* 1998, 58, 1071-1074.