

세포의 부피등의 물리적 특성, 둘째, 냉동보존 방법 즉 동결보존액의 종류와 냉동-해빙의 방법, 셋째, 종에 따른 배아의 특이성, 배아의 질 및 발생시기가 있다.

본 연구는 생쥐 배아를 각 발생단계( 1-세포기, 2-세포기, 4-세포기, 상실기, 포배기 )별로 냉동보존한 후 배아 발생에 미치는 영향을 알아내고자 하였으며 다음과 같은 목적으로 시도되었다.

첫째, 각각의 발생단계의 배아를 냉동하지 않은 대조군은 배양기에서 체외발생시키고, 냉동-해빙된 배아 역시 체외발생시켜 두 군의 발생을 및 부화율을 비교하여 그 차이를 규명하고자 하였다. 둘째, 각 발생단계별로 냉동-해빙이후 배아의 회수율, 생존율, 발생율, 부화율을 비교하여 냉동보존에 가장 이상적인 배아 발생단계를 알아내고자 하였다. 셋째, 초기 발생단계의 배아에서 적절한 동결보존액을 알아내고자 2-세포기와 4-세포기의 배아는 DMSO와 PROH를 사용하여 실험하므로써, 두가지 동결보존액의 효과를 비교하였다. 마지막으로 이와 같은 실험의 결과로 가장 높은 발생율 및 부화율을 얻을 수 있는 배아의 발생시기와 보존방법을 알아내어 이를 인간 배아의 냉동보존에 적용하고자 본 연구를 시행하였다.

생쥐 제1대 잡종(C57BL x CBA)을 과배란 유도 후 획득된 난자를 체외수정하여 1-세포기, 2-세포기, 4-세포기, 상실배, 포배기 배아를 각 발생단계별로 모아 각각의 시기에 냉동보존하였다. 이들 배아를 해빙하여 회수율, 생존율을 구하고 배양하여 24시간마다 관찰하여 발생율 및 부화율을 구하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 1-세포기 배아의 체외발생은 2-세포기까지 92.5%, 4-세포기는 87.5%, 상실배는 79.2%, 포배기는 70.0%의 비율로 발생하였다.

2. 1-세포기 배아의 냉동보존후 배아발생은 대조군에 비하여 부화율이 유의하게 낮았다.

3. 2-세포기 배아의 냉동보존후 결과는 동결보존액으로 PROH나 DMSO 모두 대조군에 비하여 유의하게 낮은 부화율을 보였으나, PROH와 DMSO를 비교하면 PROH를 사용한 경우가 유의하게 높은 부화율을 나타내었다.

4. 4-세포기 배아의 부화율은 PROH를 동결보존액으로 사용한 경우에 대조군과 비교하여 유의하게 낮았으나, DMSO를 사용한 경우는 부화율이 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다. 4-세포기 배아의 동결보존액으로는 DMSO가 PROH에 비해 유리하였다.

5. 상실배 시기의 냉동보존후 배아발생은 부화율에 있어 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다.

6. 중기-포배기 및 팽윤-포배기 시기에 냉동보존후 부화율은 대조군과 비교하여 유의하게 낮은 경향을 보였다.

7. 각 세포의 발생시기별로 비교하여 보면 생존율(포배기 배아의 경우 재팽윤의 비율)과 발생율은 포배기 시기가 다른 발생단계에 비해 유의하게 낮았으며, 부화율은 1-세포기와 포배기 배아가 다른 단계에 비해 유의하게 낮았다. 즉 2-세포기, 4-세포기 배아와 상실배가 부화율이 높았으며 이들을 체외에서 발생시켰을 경우 각각의 발생단계에 도달되는 비율로 곱하면 가장 높은 부화율의 획득은 4-세포기 배아였다.

이상의 결과로 보아 냉동보존하기에 가장 이상적인 생쥐 배아의 발생시기는 4-세포기 배아로 생각되며, 이 시기의 동결보존액으로는 DMSO가 적합하게 나타났다.

## - 9 -

### 동결보존시 생쥐전핵배아의 시기에 따른 생존율과 발생율의 비교

서울 의대 산부인과

김희선, 정경남, 류 범용, 오선경,  
서창석, 김석현, 최영민, 신창재,  
김정구, 문신용, 이진용

체외수정 및 배아이식에 있어서 과배란 유도방법의 발달로 많은 수의 난자 및 배아를 얻게됨에 따라 이식에 필요한 적정수의 배아를 제외한 잉여 배아에 대한 동결보존 방법이 활발하게 연구개발되어져 왔다.

최근 인간의 체외수정 및 배아이식에 있어서 잉여배아의 동결보존은 분열시기의 배아보다는 전핵시기의 배아를 동결보존하는 것이 보다 안정적이고, 임신율도 높은 것으로 보고되고 있다. 그러나 전핵시기는 전핵의 이능 및 융합등 세포학적으로 불안정한 시기이며 이 시기에는 세포질 내 세포골격의 재배열이 왕성하게 일어나는 것으로 보고되

## 인간 포배기 배아의 냉동보존과 그 생존율 및 임상결과에 관한 연구

마리아 산부인과

조현진, 윤산현, 윤혜균, 윤혜진,  
허용수, 이석원,  
마충철, 박세필, 이원돈, 임진호

본 연구는 체외수정과 체외배양으로 획득된 인간의 포배기 배아를 냉동보존하였다가 정상주기의 자궁에 이식하므로써 생존율, 착상률 및 임신률을 조사하기 위하여 실시하였다.

과배란주기로부터 채취된 난자를 YS배양액 (glucose free)에 20% hFF(v/v)를 첨가하고 정자와 함께 배양하면서 체외수정을 유도하였다. 포배기 배아의 발생을 유도하기 위하여 수정된 난자를 20% hFF가 첨가된 YS배양액에서 cumulus cell layer와 48시간동안 공동배양하였으며 8-16 세포기 부터는 배아를 20% hFF와 1mM glutamine이 첨가된 YS 배양액에서 cumulus cell layer와 48-72 시간동안 공동배양하였다. 난자채취 5일째에 최상의 quality를 지닌 포배기 배아를 최대 3개까지 이식하고, 잉여 포배기 배아(≥ early expanding blastocysts; non-expanding blastocysts는 24시간 동안 추가배양한 후)는 20% hFF와 0.55M glycerol 이 첨가된 D-PBS용액에 10분간 침지시켰다가 20% hFF, 1M glycerol 및 0.2M sucrose가 첨가된 D-PBS 용액에 10분간 침지시킨 후 자동세포 동결기(Planner, Cryo-10 series III)에 의한 완만냉각방법(-7℃까지 -2℃/min, -38℃까지 -0.3℃/min, -196℃ LN<sub>2</sub>)으로 동결하였다. 포배기 배아의 용해는 20% hFF가 첨가된 D-PBS용액에 glycerol과 sucrose를 각각 0.55M과 0.4M, 0.44M과 0.2M, 0.33M과 0.2M, 0.22M과 0.2M, 0.11M과 0.2M, 0.00M과 0.2M로 첨가하고 차례로 각각 5분, 6분, 7분, 7분, 6분, 2분씩 노출시켜 rehydration 과정을 거치면서 실시하였다(Menezo 등, 1992). 포배기 배아의 생존여부는 20% hFF와 1mM glutamine이 첨가된 YS배양액에서 약 18시간동안 배양한 후 blastocoel이 건강하게 형성되는 것으로 판정하였

고 있다.

본 연구는 생쥐를 이용하여 전핵이 처음 형성되어 2세포기로 분열하기 직전까지 상태가 다른 전핵시기를 동결 및 해빙하여 그 생존율과 발생율을 비교함으로써 동결에 가장 적합한 전핵배아의 시기를 알아보려고 시행하였다.

생쥐 제 1대잡종 ( C57BL ♀ × CBA ♂ )으로 과배란 유도된 생후 6-8주 암컷과 생후 12주된 생식력이 확인된 숫컷을 이용하여 체외수정과정을 통해 전핵배아를 획득하였다. 수정 6시간 후 전핵이 확인된 배아를 골라 이들을 계속 배양하면서 수정 후 전핵이 처음 보이기 시작하는 6시간, 두개의 전핵이 뚜렷하면서 세포질의 양끝에 멀리 떨어져 있는 9시간, 두개의 전핵이 뚜렷하면서 근접한 12시간, 두개의 전핵이 융합하는 15시간에 각각 동결을 시행하였다. 배아의 동결은 PROH와 sucrose를 이용한 완만동결법으로 시행하였으며 용해는 급속해빙으로써 3단계의 용해액을 이용하여 시행하였다.

### 본 연구의 결과는 다음과 같다.

1. 수정 후 6시간, 9시간, 12시간, 15시간에 동결을 시행하여 용해하였을 때 회수율은 모두 100%를 나타냈고 생존율은 각각 95.36%, 88.73%, 75.17%, 62.42%로 나타났다.
  2. 생존된 배아를 24시간동안 배양하였을 때 2세포기까지의 발생율은 대조군이 100%, 6시간은 93.75%, 9시간은 97.62%, 12시간은 88.07%이고 15시간은 98.98%로 나타났다.
  3. 생존된 배아를 48시간동안 배양하였을 때 4세포기까지의 발생율은 대조군이 99.30%, 6시간은 61.11%, 9시간은 76.98%, 12시간은 66.97%이고 15시간은 79.59%이었다.
  4. 생존된 배아 중 배양 96시간에 포배기로 발생한 비율은 대조군이 95.77%, 6시간은 43.75%, 9시간은 73.01%, 12시간은 70.04%이고 15시간은 90.82%였으며 48시간 더 배양했을 때 완전히 탈각한 배아율은 각각 61.27%, 25.69%, 43.05%, 42.20%, 60.20%로 나타났다.
- 이상의 결과 생쥐전핵배아의 동결보존시기는 생존율과 발생율을 비교하여 볼때 전핵이 처음형성되어 보이기 시작하는시기 (수정 후 6시간)와 전핵이 소실되어 2세포기로 분열하기 직전의 시기 (수정 후 15시간)보다는 뚜렷한 두개의 전핵이 보이면서 이동하는 시기 (수정 후 9시간, 12시간)가 유용할 것으로 사료된다.