

존액: Basic solution + 1.5 M PROH + 0.1 M sucrose - 10 min 용해액: 1단계 - Basic solution + 1.0 M PROH + 0.2 M sucrose - 5 min, 2단계 - Basic solution + 0.5 M PROH + 0.2 M sucrose - 5 min, 3단계 - Basic solution + 0.2 M sucrose - 5 min, 4단계 - Basic solution - 5 min 동결 보존액에 10분간 처리하는 동안 배아를 0.25 ml plastic straw에 장진하여 sealing powder로 밀봉하고 자동 세포동결기 (automatic cell freezer; Planer, Model, Model CRYO-10)에서 완만 동결을 시행하였다. 냉각이 완료된 straw는 carrier로 액체 질소통으로 옮겨 서서히 침지하여 -196℃에서 보관하였다. 용해는 액체 질소통에서 꺼낸 straw를 대기 중에 노출시켜 표면의 물기를 제거하고 알콜 거즈로 소독한 후 straw 내의 배아와 동결 보존액을 배양 접시에 부어 해부현미경하에서 배아를 확인한 후 용해액에 처리하여 배양하였다.

**Results:** 1990년부터 1991년까지 전핵 시기 배아의 동결을 시행한 후 2년 이내에 용해한 배아는 90.5% (390/431)의 회수율과 60.8% (237/390)의 생존율을 보였고, 10년 후에 용해한 배아는 80.8% (257/318)의 회수율과 51.4% (132/257)의 생존율을 보였다. 2000년에서 2002년까지 전핵 시기 배아의 동결을 시행한 후 2년 이내에 용해한 배아는 100% (409/409)의 회수율과 86.3% (353/409)의 생존율을 보였다. 한편, 1990년부터 1991년까지 2~4세포기의 초기 배아의 동결을 시행한 후 2년 이내에 용해한 배아는 95.3% (82/86)의 회수율과 56.1% (46/82)의 생존율을 보인 반면, 10년 후에 용해한 배아는 89.3% (158/177)의 회수율과 12.0% (19/158)의 낮은 생존율을 보였다.

**Conclusions:** 전핵 시기의 배아보다 난할이 진행중인 배아가 동결 보존 기간이 길어짐에 따라 생존율이 낮아지는 것으로 미루어 전핵 시기의 배아가 동결 보존 기간에 대해 더욱 안정적인 것으로 보여진다. 1990년부터 1991년까지 동결 보존한 전핵 시기 배아의 생존율 (60.8%)보다 2000년부터 2002년까지의 동결 보존한 배아의 생존율 (86.3%)이 높은 것은 동결 보존액과 용해액의 성분 변화와 용해 단계, 회수된 난자의 수, 동결 시간 등 여러 요인의 변화에 의한 것으로 사료된다. 본 연구 결과 전핵 시기의 배아를 장기간 보존하였을 경우 동결 보존 기간이 배아의 생존율에 영향을 미치지 않았음을 확인할 수 있었고, 난할이 진행된 배아보다는 전핵 시기의 배아가 장기간 보존하였을 때 더욱 안정적인임을 알 수 있었다.

## P-14 액체 질소를 통한 Virus 전달을 방지하기 위한 인간 성숙난자의 유리화동결법 개발에 관한 연구

포천중문의과대학교 차병원 여성 의학연구소

박성은 · 박은아 · 이우식 · 권 황 · 최동희 · 윤내영 · 고정재  
윤태기 · 차광렬 · 정형민

**Background & Objectives:** 난자의 동결 보존시 동결방법의 선택은 효과적인 난자은행의 개발에 있어 필수불가결한 요소이다. 이전의 연구에서 생쥐의 난자를 ethylene glycol (EG) 항동제로 이용하여 Grid에서 유리화동결 시켰을 때 일반적인 완만동결법보다 동결용해 후 생존율과 배발달율이 높은 것으로 관찰되었다. 그러나 Grid를 이용한 유리화동결법은 항동해제와 난자가 액체 질소에 직접 노출되는 단점이 있다. 이에 액체 질소를 통한 virus 감염을 막기 위해 pulled straw를 이용한 유리화동결법의 효율성을 알아보려고 본 실험을 시행하였다.

**Method:** 시험관 아기 시술 환자로 부터 채취된 난자들 중 수정에 실패한 난자들을 연구 목적에 따

라 각각 3군으로 분류하였다. 1군; 대조군, 2군; Grid를 이용하여 유리화동결 시킨군, 3군; pulled straw를 이용하여 동결시킨 군으로 이들 3군의 염색체와 방추사의 이상성을 핵형분석방법과 면역세포염색법으로 비교하였다. 동결군은 난자를 D-PBS에 EG가 첨가된 항동해제에 2분 30초간 노출시켰으며 그 후 5.5 M EG에 1.0 M sucrose가 첨가된 항동해제에 20초간 노출시킨 후 Grid에 난자를 부착시켰다. 핀셋을 이용하여 난자가 부착된 Grid를 직접 액체 질소에 침지한 후 제작한 Grid carrier에 넣어 동결시켰다. Pulled straw를 사용한 방법은 0.25 ml의 straw를 열판을 이용하여 pulled straw를 만든 후 난자를 앞에 서술한 2단계로 처리한 후 5 µl 항동해제, 공기, 중간에 1~2 µl 항동해제와 난자, 공기, 끝으로 5 µl 항동해제 순서로 pulled straw에 채워 넣은 후 직접 액체 질소에 침지하였다. 용해 방법은 Grid에 동결한 군은 1.0 M, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M sucrose에서 단계적으로 2분 30초간 노출시키고 PBS로 세척하였으며, pulled straw에 동결한 군은 액체 질소에서 꺼낸 후 10초간 공기 중에 노출시켰으며 물속에서 10초간 해동한 후 Grid와 동일한 방법으로 용해하였다.

**Results:** 2군과 3군의 생존율은 각각 83.8%와 87%로 두군 사이에 유의적 차이가 나타나지 않았다. 염색체 이상성은 두군이 각각 35.7%와 33.3%로 유의적 차이가 없었으며, 방추사의 이상성도 2군 38%, 3군 38.5% 유의적 차이가 없었다.

**Conclusions:** 본 연구 결과 Grid와 straw를 이용한 유리화동결법은 생존율, 염색체 이상성, 방추사의 이상성에 유의적 차이가 없었으므로, pulled straw를 이용한 유리화동결법이 액체 질소로부터의 virus 감염을 막을 수 있는 대체 방안으로 사용될 수 있는 것으로 사료된다.

This work was supported by a grant from the INTERDISCIPLINARY RESEARCH PROGRAM of the KOSEF (1999-2-205-002-5).

## P-15 Artificial shrinking하여 Vitrification법으로 냉동 보존되었던 인간 포배기배아의 생존률, 착상률 및 임신율에 관한 연구

프라우메디병원 불임연구실

정재돈 · 정범식<sup>1</sup> · 이문희<sup>2</sup>

**Background & Objectives:** 생쥐 포배기배아의 동결에서 artificial shrinking이 효과가 있음을 확인한 후 본 연구에서는 인간 포배기배아의 동결에 적용하였다. 과배란유도에 의해 획득된 배아 중 이식 후 남은 잉여배아를 artificial shrinking시켜 냉동보존 하였다가 용해 후 배아의 생존율, 이식 후 착상률 및 임신율을 조사하고자 실시하였다.

**Method:** 2002년 5월부터 2003년 5월까지 artificial shrinking하여 vitrification method로 동결하였다가 용해하여 배아 이식한 환자 20명 중 21 case를 대상으로 조사되었으며, 최소 1개 이상의 양질배아를 가지는 환자들이었다. 또한 배아이식이 여유치 않았던 1명을 제외하면 모두 1~2번의 시험관아기 시술에서 실패했었던 환자들이었다. 동결은 micromanipulator를 이용하여 인위적으로 shrinking을 유도한 다음 PBS + 10% glycerol + 20% hFF, PBS + 10% glycerol + 20% hFF + 20% ethylene glycol, PBS + 25% glycerol + 25% ethylene glycol + 20% hFF에 각각 5분씩 침지시킨 후 0.25 ml straw에 장착한 다음 액체