

## 유리화 동결된 인간난자의 체외발생능

정형민<sup>†</sup> · 홍승욱 · 김종욱<sup>1</sup> · 임정묵 · 엄기봉 · 정미경 · 박은아 · 고정재 · 윤태기 · 박 찬 · 차광렬  
포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소

### *In Vitro* Developmental Competence of Vitrified Human Oocytes

H. M. Chung<sup>†</sup>, S. W. H., J. U. Kim<sup>1</sup>, J. M. Lim, K. B. Oum, M. K. Chung, E. A. Park, J. J. Ko,  
T. K. Yoon, C. Park and K. Y. Cha

College of Medicine, Pochon CHA University, Infertility Medical Center of  
CHA General Hospital, 135-081, Republic of Korea

### SUMMARY

These studies were undertaken to evaluate morphological normality and developmental competence *in vitro* of human oocytes following vitrification using ethylene glycol and electron microscopic grid. Human immature oocytes retrieved from natural and stimulated cycles was vitrified at 0 or 48 h and 0, 8 to 15 or 24 to 28 h after maturation culture, respectively. In oocytes retrieved from unstimulated cycle, no significant differences were found in morphological normality (56 to 63%) and fertilization (31 to 37%) rates between the times of vitrification. In stimulated patients, however, more oocytes were morphologically normal when vitrified at 24 to 28 h than when vitrified at 0 or 8 to 15 h after maturation culture.

Regardless of the hormonal stimulation, high cleavage rates (83 to 100%) were obtained in all treatment groups but did not differ significantly. Twenty to 43% of cleaved oocytes developed to the blastocyst stage at 6 days after IVF.

These results suggest that vitrified oocytes from unstimulated and stimulated cycles could develop to the blastocyst stage, regardless of the stages of vitrification.

(Key words : human, oocyte, vitrification, electron microscopic grid, *in vitro* culture)

### 서 론

인간 난자의 동결보존에 관한 연구는 1986년 Chen에 의해 최초로 동결-융해된 난자를 이용한 시험관아기의 출생이 보고된 이래 많은 연구가 이루어져 왔으나(Van Uem 등, 1987; De Fried 등,

1998) 현재까지 인간 난자를 동결보존할 경우 분만까지의 효율은 1% 미만인 것으로 보고되고 있어 이 분야의 연구는 다른 생식보조기법에 비해 상당히 연구의 진척이 뒤떨어져 있다. 실제 지금까지의 냉동보존 난자를 이용하여 분만까지 보고된 예는 10여건에 불과하다(Tucker 등, 1996, 1998; Porcu 등, 1997, 1999; Mandelbaum 등, 1998). 그러나 난

\*본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(과제번호 1999-2-205-002-5)지원으로 수행되었음.

<sup>1</sup>포천중문의과대학교 구미차병원 산부인과(Department of OB & GYN, Gumi CHA General Hospital, Pochon CHA University)

<sup>†</sup>Correspondence

자의 동결보존이 가능해진다면 이는 임상적으로 매우 응용 가능성이 높다. 즉, 배아동결시 문제가 되고 있는 윤리적, 법적 문제점을 극복할 수 있을 뿐만 아니라 난소기능의 상실이 예견되는 환자, 불가피하게 정액채취가 불가능하여 채취한 난자를 폐기해야 할 경우 등에도 난자동결보존은 효과적으로 응용될 수 있고 정자은행(semen bank)과 마찬가지로 난자은행(ovum bank)의 설립이 가능해져 장기적으로 가족계획이나 타인에게의 공여에도 이용될 수 있다(Cha 등, 1997). 뿐만 아니라 동물산업에 있어서도 희귀동물 또는 멸종위기의 동물의 종족보존 수단으로서 또한 고부가가치 동물의 유전자보존 수단으로서도 이용될 수 있다. 지금까지의 난자동결에 관한 연구는 주로 배아의 동결보존에 이용되고 있는 완만동결 및 급속융해법을 응용한 것으로 동결-융해시 생존율의 저하와 세포소기관의 변형 등이 큰 것으로 알려져 있다(Al-Hasani 등, 1987; Santhanathan 등, 1989; Schalkoff 등, 1989; Pickering 등, 1990; Albertini, 1995; Son 등, 1996; Park 등, 1997). 최근, 동물의 난자를 이용하여 새로운 동결보존 방법에 대한 시도가 있었는데, 특히 Lim 등(1992)은 우난포란을 이용하여 각종 동결보호제의 세포내 투과성 및 동결-융해후의 생존성 등에 대한 연구가 이루어졌으며, Martino 등(1996)은 미성숙 우난포란을 이용하여 열전도율이 매우 높은 electron microscopic grid를 이용한 유리화 동결을 시도하여 매우 높은 생존율과 발생율을 보고하였다. 이에 본 연구에서는 자연주기 또는 다배란 유도를 위해 호르몬 자극을 받은 난소에서 채취된 인간 미성숙난자를 이용하여 유리화 동결법을 실시하여 난자 유리화 동결보존 임상적 응용 가능성을 알아보기 위해 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구대상

본 연구는 포천중문의대 차병원 여성의학연구소에서 실시하였다. 연구실시전 연구소 연구위원회의 사전승인하에 실시하였다. 난자의 채취는 자연주기의 경우 난소절제술 또는 제왕절개술을 시행하였던 환자 66명으로부터 총 53개의 미성숙 난자를 채취

하여 이용하였는데 이들 환자의 평균연령은 33.2세였다. 다배란 주기에서의 난자채취는 GnRH long protocol과 gonadotropin을 이용하여 난소자극을 받아 intracytoplasmic sperm injection(ICSI)을 위해 난자채취를 시행한 불임환자중 채취난자의 수가 20개 이상이면서 미성숙난자가 채취되었던 50명의 환자로부터 50개의 난자를 기증받아 실시하였다. 모든 난자의 채취에 앞서 반드시 환자 및 보호자에게 본 연구내용을 설명한 후 동의를 받아 실시하였다.

### 2. 난자의 채취 및 체외성숙

채취된 난자는 해부현미경(Wild, Swiss)하에서 관찰하여 난세포질이 균일하고 치밀하게 결합된 난구세포를 갖는 미성숙 난자만을 이용하였다. 이들 난자는 무작위로 3개군으로 나누어 실험에 이용하였는데 첫째 미성숙 상태로 채취 즉시 유리화 난자동결을 실시한 군으로 둘째는 중간성숙 난자로서 체외성숙용 배양액하에서 8~15시간동안 체외성숙을 유도한 과배란 유도주기에서 채취한 난자, 마지막으로 체외성숙 배양액에서 자연주기에서 채취한 난자의 경우 48시간 배양한 것을 과배란 주기에서 채취한 난자의 경우 24~28시간동안 체외성숙을 유도하였던 체외성숙난자로 나누어 실험에 이용하였다. 난자의 성숙 정도를 정확히 알아보기 위해서 모든 난자는 0.1% hyaluronidase 용액(Sigma Chem. Co., USA)이 함유된 배양액을 사용하여 난구세포를 제거하여 성숙정도를 확인하였다. 체외성숙을 위한 배양액은 TCM 199 배양액(GIBCO BRL, USA)에 10 IU/ml의 PMSG(pregnant mare's serum gonadotropin; Sigma Chem. Co., USA) 및 hCG(human chorionic gonadotropin; Sigma Chem. Co., USA)와 20% FBS(fetal bovine serum; GIBCO BRL, USA)를 첨가한 배양액을 사용하였다.

### 3. 유리화 난자동결 및 융해

먼저 성숙단계에 따라 난자를 분류한 다음 이를 5.5 M ethylene glycol(GIBCO BRL, USA)과 1.0 M sucrose(Sigma Chem Co., USA)와 10% FBS가 함유된 DPBS(Dubelcco's Phosphate Buffered

Salne; GIBCO BRL, USA)용액(이하 EG5.5 동결용액)에 pasteur pipette을 사용하여 20초간 침지하였다. 이후 즉시 멸균 여과지 위에 있는 electron microscopic cooper grid(400 mesh; Gilder, USA) 상에 난자를 올려놓은 다음 pincet을 사용하여 grid를 살짝 눌러 난자가 grid상에 부착하고 잉여의 EG5.5 동결용액이 제거되도록 하였다. 이어 난자가 부착된 grid를  $-196^{\circ}\text{C}$ 의  $\text{LN}_2$ 에 침지함으로써 유리화동결을 실시하였다. 이때 EG5.5 동결용액에 침지부터  $\text{LN}_2$  침지까지 30초를 넘지 않도록 하였다. 유리화 동결된 난자는 최소 7일에서 최장 31일간 보관하였다.

유리화 동결된 난자의 용해는  $37^{\circ}\text{C}$ 의 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M이 함유된 각각의 DPBS용액에 난자가 부착된 cooper grid를 pincet을 사용하여 순차적으로 1분간씩 침지함으로써 해동을 실시하였다. 해동 후 난자가 부착된 grid는 10% FBS가 함유된 DPBS 용액으로 옮긴 다음 pasture pipette을 사용하여 조심스럽게 난자를 회수하였다. 회수된 난자는 신선 배양액으로 3회 세척한 다음 체외성숙용 배양액으로 옮겨 실험에 공시하였다. 용해 1시간후에 난자를 관찰하여 형태학적으로 정상적인 모양을 갖는 난자를 생존한 것으로 판정하였다.

#### 4. 체외성숙, 체외수정 및 체외발생유도

유리화 동결-해동된 인간난자는 성숙단계에 따라 체외성숙을 유도한 다음 체외수정에 이용하였다. 생존난자의 수정을 위해서는 생식능력이 인정된 공여 정액을 사용하여 세포질내 정자직접주입법(ICSI)을 실시하였다. ICSI 실시 후 16~18시간째에 난자를 관찰하여 두 개의 전핵을 갖는 난자수를

조사하여 수정율을 계산하였고 수정된 모든 난자는 3회 신선배양액으로 세척한 다음 Vero cell monolayer가 형성된 배양액에서 5~6일간 추가로 배양하였다. 전핵기 배아는 24시간째에 관찰하여 난할 여부를 관찰하였으며 배양 5~6일후에 배반포로의 발생율을 관찰하였다.

#### 5. 통계분석

본 연구를 통해 얻어진 모든 결과는 SAS 통계프로그램을 이용한 PROC-GLM 방법에 의해 통계분석을 실시하였다. 통계학적 유의성 검정기준은  $P=0.05$  이하로 하였다.

## 결 과

### 1. 자연주기 및 과배란 주기에서 채취된 인간난자의 유리화동결-해동된 난자의 생존율과 체외성숙 및 수정율

자연주기에서 채취된 미성숙난자 53개중 형태학적 정상을 나타낸 난자는 46개였다. 이중 30개의 난자는 채취 즉시 미성숙 상태에서, 16개의 난자는 체외성숙용 배양액에서 48시간 배양하여 체외성숙이 이루어진 난자를 유리화 동결을 실시하였다. 해동한 결과 용해 후 형태학적 정상성을 보여 생존한 것으로 판단된 난자는 각각 19개와 9개로서 생존율은 63.3%와 56.3%였다. 한편, 과배란 주기에서 채취되었던 50개의 난자 중 형태학적 정상이었던 난자 43개를 미성숙 상태에서 17개, 8~15시간 체외성숙을 유도한 난자 14개 및 48시간동안 체외성숙을 유도한 12개의 난자를 유리화동결후 해동한 결과 생존된 난자는 각각 11개(64.7%), 9개(64.3%) 및 12

Table 1. Survival and *in vitro* maturation of vitrified and thawed human oocytes

Sources of oocytes	Hours of culture for IVM	No. of oocytes vitrified	No (%). of oocytes survived after thawing
Natural cycle	0	30	19 (63.3)
	48	16	9 (56.3)
Stimulated cycle	0	17	11 (64.7) <sup>a</sup>
	8~15	14	9 (64.3) <sup>a</sup>
	24~28	12	12 (100) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> :  $P < 0.05$

IVM : *In vitro* maturation

Table 2. Maturation, fertilization and *in vitro* development of vitrified human oocytes

Sources of oocytes	No. of oocytes survived after thawing	No (%) of oocytes matured	No (%) of 2-PN oocytes after ICSI	No(%). of embryos developed to	
				Cleaved	Blastocyst
Natural cycle	19	12 (63.2)	7 (53.8)	7 (100)	3 (42.9)
	9	—	5 (55.6)	5 (100)	2 (40.0)
Stimulated cycle	11	9 (81.8)	6 (66.7)	5 (83.3)	2 (40.0)
	9	9 (100)	5 (55.6)	5 (100)	1 (20.0)
	12	—	10 (83.3)	10 (100)	4 (40.0)

ICSI : Intracytoplasmic sperm injection

개(100%)로 나타나 체외성숙된 난자의 생존율이 유의하게 높게 나타났다(Table 1). 이들 생존 난자 중 미성숙 또는 중간성숙 난자를 체외성숙시킨 결과 자연주기의 경우 생존된 19개중 12개(63.2%)가 제 1극체의 방출이 일어나 체외성숙되었음을 확인할 수 있었고 과배란주기의 경우 미성숙 난자 11개와 중간성숙 난자 9개중 성숙이 일어난 난자는 각각 9개(81.8%)와 9개(100%)로서 자연주기에서 채취된 난자에 비해 높은 체외성숙율을 나타내었다. 이들 유리화 동결-융해후 생존과 체외성숙이 이루어진 난자를 ICSI 방법에 의해 수정을 유도한 결과 자연주기에서 채취된 난자의 경우 미성숙단계에서 동결한 난자에서 7개(58.3%)가 체외성숙 후 동결한 난자에서 5개(55.6%)가 정상적인 수정이 이루어졌다. 과배란 주기의 경우 미성숙 단계에서 동결한 난자에서 6개(66.7%), 중간성숙 단계에서 동결한 난자에서 5개(55.6%) 그리고 체외성숙된 난자에서 10개(83.3%)의 난자가 정상수정 되었다(Table 2).

## 2. 체외수정된 유리화 동결난자의 체외발생능

체외수정이 이루어진 유리화 동결난자를 *vero cell monolayer*가 형성된 배양액에서 5~6일간 배양한 결과 자연주기난자의 경우 미성숙단계에서 유리화 동결된 난자의 경우 난할은 7개(100%)가 이루어졌고 이중 3개(42.9%)의 난자가 배반포까지 발생하였다. 체외성숙 후 동결한 난자의 경우 난할과 배반포로의 발생은 각각 5개(100%)와 2개(40.0%)였다. 한편, 과배란 주기에서 채취된 난자의 경우 미성숙단계에서 동결하였던 난자에서의 난할율은 83.3%(5/6)였으며 배반포로 발생된 배아는 2개(40.0%)였다. 중간성숙단계 및 체외성숙된 난자를

동결하여 수정된 난자의 난할율은 공히 100%(5/5, 10/10)로서 모두 난할이 이루어졌으며 이중 배반포까지 발생한 것은 각각 1개(20.0%)와 4개(40.0%)였다(Table 2). Table 2에서 보는 바와 같이 체외수정된 난자의 대부분이 2-세포기 이상 난할이 이루어졌으며 배반포로의 발달율도 20%~42.9%로서 비교적 높은 발생율을 나타내었다.

## 고 찰

성공적인 난자동결은 인간 생식보조기법에서 생명의 시초가 되는 수정란을 동결보존하는 과정에서 문제시되는 윤리 및 법적문제를 해결할 수 있는 대안이 될 뿐만 아니라 부득이한 사정 등으로 정자의 채취가 불가능하여 채취한 난자의 수정이 불가능할 경우, 암치료를 위해 화학요법이나 방사선치료 등으로 또는 조기폐경의 위험 등으로 난소기능의 상실이 예견되는 여성에게 자신의 생식세포를 동결보존하여 후에 이용될 수 있고 나아가 타인에게 공여도 가능하게 할 수 있다. 뿐만 아니라 동물산업에 있어서도 희귀동물이나 멸종위기의 동물의 생식세포의 보존과 유전자원의 보존이라는 측면에서 그 의의는 매우 크다고 하겠다(Cha 등, 1997, 1998; Mandelbaum 등, 1998).

그러나 난자의 경우 외부온도나 동결보호제에 대해 매우 민감하여 상대적으로 크기가 매우 작은 정자나 체세포분열을 하는 수정란에 비해 동결시 세포손상이 매우 크고 열색체이상의 빈도가 매우 크게 나타나는 것으로 보고되고 있다(Al-Hasani 등, 1987; Carroll 등, 1988, 1990; Schalkoff 등 1989; Van der Elst 등, 1993; Son 등, 1996; Park 등,

1997). 실제 인간 난자동결보존에 의한 임신성공율은 현재로서는 1% 미만으로 알려져 있다.

본 연구는 인간난자를 포함한 포유동물 난자의 효과적인 동결보존기술을 개발하기 위해 유리화동결보존법과 운반체로서 금속인 electron microscopic copper grid(EM grid)를 이용한 동결법을 개발하기 위해 실시하였다. 연구에 사용된 인간 난자는 자연주기에서 채취되어지는 미성숙난자와 다배란유도 후 시험관아기 과정에서 채취되는 미성숙난자를 대상으로 하였다. 유리화 동결의 효율성을 검토하기 위해 미성숙난자는 무작위로 채취 당시의 미성숙 상태의 난자, 채취후 8~15시간 정도 체외성숙 배양액에서 성숙을 유도하여 난핵막 붕괴(germinal vesicle breakdown; GVBD) 또는 감수분열중기-I(metaphase I; MI)에 있는 난자, 그리고 자연주기의 경우 48시간 혹은 다배란 유도의 경우 24~28시간동안 체외성숙을 유도하여 체외성숙이 이루어진 난자(metaphase-II; MII)로 구분하여 실험에 이용하였다. 유리화 동결은 먼저 난자를 5.5M ethylene glycol과 1.0M sucrose이 함유된 DPBS에 20초간 노출한 다음 즉시 400 mesh의 EM grid상에 올려 부착하고 LN<sub>2</sub>에 침지하는 방법을 이용하였다. 이 방법은 고농도의 동결보호제를 사용함으로써 순간적으로 난자의 세포질내에 동결보호제의 침투를 유도한 다음 열전도율을 극대화하기 위한 금속판을 동결용기로 사용함으로써 LN<sub>2</sub>에 침지하여 동결할 경우 세포질내에 빙결정의 형성이 나타나지 않게 하는 방법이다. 이러한 유리화 동결 방법으로 성숙단계에 따라 난자를 유리화동결 및 융해를 실시한 결과 융해후 생존율은 자연주기에서 채취된 미성숙난자의 경우 채취 즉시 동결한 미성숙난자의 경우 63.3% 그리고 체외성숙을 유도한 다음 동결한 경우 56.3%로서 차이가 없었다. 다배란 유도시 채취된 난자의 경우 미성숙 난자의 경우 64.7%, GVBD 또는 MI의 경우 64.3% 그리고 체외성숙이 유도된 난자의 경우 100%의 생존율을 나타내 체외성숙을 유도한 난자의 경우 미성숙 또는 중간성숙에 비해 유의적으로 높은 생존율을 나타냄을 알 수 있었다. 이러한 이유에 대해서는 구체적인 검토가 필요하겠지만 미성숙 또는 중간성숙과정 중인 난자의 경우 난자의 선별이 이루어지지 않은 반면

체외성숙이 이루어진 난자의 경우 이미 체외성숙 배양을 통해 일부의 난자가 선별되었기 때문인 것으로 사료된다. 한편, 유리화 동결 및 융해후 생존된 난자의 체외발생능을 알아보기 위해 체외성숙, 수정 및 발생을 유도한 결과 자연주기에서 채취된 미성숙난자의 경우 63.2%의 성숙율을, 다배란주기의 경우 미성숙 난자의 경우 81.8%, 중간성숙단계의 난자의 경우 100%의 체외성숙율을 나타내어 자연주기보다는 다배란주기에서 채취된 난자의 체외성숙율이 양호함을 알 수 있었다. 이들 체외수정이 이루어진 난자의 수정을 위해 생식능력이 확인된 공여정자를 사용한 ICSI를 시행한 결과 음성전핵과 자성전핵이 관찰되어 정상적인 수정란으로 판정된 난자의 비율은 자연주기의 경우 미성숙 상태에서 동결한 경우 53.8%, 체외성숙 유도 후 동결융해한 경우 55.6%로서 두 군간의 차이는 인정되지 않았다. 다배란 주기의 경우 성숙 난자의 경우 66.7%, 중간성숙 단계의 난자의 경우 55.6%, 그리고 체외성숙 난자의 경우 83.3%로서 체외성숙난자의 수정율이 높은 경향을 나타내었으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다. 이들 체외수정란을 5~6일간 추가로 배양하면서 난할율과 배반포까지의 체외발생율을 조사한 결과 난할율에 있어서는 자연주기 또는 다배란 주기로부터 얻어진 난자 모두에서 83.3~100%의 높은 난할율을 나타내었다. 배반포로의 발생에 있어서는 자연주기의 난자의 경우 미성숙(42.9%)과 체외성숙 난자(40.0%) 그리고 다배란주기의 경우 미성숙(40.0%), 중간성숙 단계(20.0%) 및 체외성숙 난자(40.0%) 모두 비교적 양호한 발생율을 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 본 연구에서 사용한 EG5.5 유리화 동결용액과 EM grid를 이용한 유리화 동결법은 비교적 높은 생존율과 체외발생능을 나타내는 동결보존법이라고 할 수 있겠다. 본 연구에서는 난자의 성숙도를 정확하게 알아보기 위해 동결 전 0.1% hyaluronidase 용액을 이용하여 난구세포를 제거하여 사용하였다. 그러나 일부의 연구보고에 의하면 난자 동결보존시 난구세포의 부착 여부에 따라 융해후 생존율에 영향을 미친다는 보고(Imoedemhe 와 Sigue, 1992)가 있어 유리화 동결보존에 있어서도 난구세포의 부착 여부에 따른 검토가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 또

한 그동안 난자동결보존의 연구에서 문제가 되어온 용해후 난세포의 염색체이상에 대한 연구와 발생이 이루어진 배반포의 염색체 이상 등과 같은 세포조직학적 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다. 다만 Son 등(1996)과 Park 등(1997)은 인간 미성숙 난자를 완만동결 및 급속용해 방법으로 동결보존할 경우 생존된 난자의 염색체이상 비율이 78%이고 이들 난자는 수정율이 매우 낮고 난할율이 매우 저조하다는 보고하였는데 본 연구에서 얻어진 결과와 대비해 볼 때 생존율과 이후의 체외성숙, 수정 및 발생율이 매우 높은 것으로 보아 염색체이상 등과 같은 세포유전학적 이상율은 높지 않을 것으로 사료된다.

이상의 연구결과는 인간 미성숙난자를 이용하여 유리화동결후 생존성과 체외발생능을 조사한 최초의 보고로 사료되며 현재의 방법을 좀더 개선할 수 있다면 인간의 불임치료의 수단뿐만 아니라 동물산업에서의 희귀동물이나 멸종위기의 동물의 종족보존수단으로서 그리고 고부가가치 동물의 유전자 보존 방법으로서 이용될 수 있을 것이라 사료된다.

## 참고문헌

- Albertini DF. 1995. The cytoskeleton as a target for chill injury in mammalian cumulus oocyte complexes. *Cryobiology*, 32:551-552.
- Al-Hasani S, Diedrich K, van der Ven H, Reincke A, Hartje M and Krebs D. 1987. Cryopreservation of human oocytes. *Hum. Reprod.*, 2:695-700.
- Carroll J, Kaye PL and Cummins JM. 1988. The effect of cryopreservation on functional correlates of embryo quality. *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer*, 5:85-90.
- Carroll J, Depypere H and Matthews CD. 1990. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 90:547-553.
- Cha KY. 1997. Oocyte freezing/Egg banking. 38th Annual Postgraduate Program, Course IV. 21st century ART: Embracing change. American Society for Reproductive Medicine. pp.17-33.
- Cha KY, Chung HM, Oum KB, Lim JM, Park SE and Ko JJ. 1998. Human oocyte freezing. (In) *Serono Symposium USA*, Springer-Verlag, NY. (in press).
- Chen C. 1986. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*, 1:884-6.
- Imoedemhe DG and Sigue AB. 1992. Survival of human oocytes cryopreserved with or without the cumulus in 1,2-propanediol. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 9:323-327.
- Lim JM, Fukui Y and Ono H. 1992. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 37:351-361.
- Mandelbaum J, Belaisch-Allart J, Junca AM, Antoine JM, Plachot M, Alvarez S, Alnot MO and Slat-Baroux J. 1998. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *Hum. Reprod (Suppl.)*, 13:161-174.
- Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.*, 54:1059-69.
- Park SE, Lee KA, Son WY, Ko JJ, Lee SH and Cha KY. 1997. Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured *in vitro* after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertil. Steril.*, 68:920-6.
- Pickering SJ, Braude PR and Johnson MH. 1991. Cryoprotection of human oocytes: inappropriate exposure to DMSO reduces fertilization rates. *Hum. Reprod.*, 6:142-143.
- Polak de Fried E, Notrica J, Rubinstein M, Marazzi A and Gonzalez MG. 1998. Pregnancy after human donor oocyte cryopreservat-

- ion and thawing in association with intracytoplasmic sperm injection in a patient with ovarian failure. *Fertil. Steril.*, 69:555-7.
- Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O and Flamigni C. 1997. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil. Steril.*, 68:724-6.
- Porcu E. 1999. Freezing of oocytes. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 11:297-300.
- Sathananthan AH, Ng SC, Trounson AO, Bongso A, Ratnam SS, Ho J, Mok H and Lee MN. 1988. The effects of ultrarapid freezing on meiotic and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete Res.*, 21:385-401.
- Schalkoff ME, Oskowitz SP and Powers RD. 1989. Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryopreservatives. *Biol. Reprod.*, 40:379-393.
- Son WY, Park SE, Lee KA, Lee WS, Ko JJ and Yoon TK. 1996. Effects of 1,2-propanediol and freezing-thawing on the *in vitro* developmental capacity of human immature oocytes. *Fertil. Steril.*, 66:995-9.
- Tucker M, Wright G, Morton P, Shanguo L, Massey J and Kort H. 1996. Preliminary experience with human oocyte cryopreservation using 1,2-propanediol and sucrose. *Hum. Reprod.*, 11:1513-5.
- Tucker MJ, Wright G, Mortin PC and Massey JB. 1998. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent *in vitro* maturation. *Fertil. Steril.*, 70:578-9.
- Van Uem JFHM, Siebzehnruhl ER, Schuh B, Koch R, Trotnov S and Lang N. 1987. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet*, i:752-53.

---

(접수일 : 2000. 2. 23 / 채택일자 : 2000. 4. 4)