

120 h after culturing in the RECM + EAA + Vt medium. Developmental speed of rat embryos to the blastocyst stage was faster about one day than other treatment. These results suggested that the addition of vitamins and essential amino acids to the chemically defined medium enhanced rat embryo development following round spermatid injection.

- 7 -

Cryopreservation of Mouse IVF Zygotes by Vitrification

*Maria Infertility Medical Institute, Seoul,
Maria OB/GYN¹, Seoul
College of Animal Husbandry², Kon-Kuk
University*

**Kim Myo Kyung, Lee Hyeon Sook,
Uhm Sang Jun, Kim Eun Young,
Yoon San Hyun¹, Park Sepill, Chung
Kil Saeng² and Lim Jin Ho¹**

Vitrification has been focused as a simple and rapid alternative to the conventional freezing methods for the cryopreservation of mammalian embryos. This study was carried out to determine the optimal condition for successful vitrification of mouse zygotes, 1-cell embryos, using EFS40 which contained 40% (v/v) ethylene glycol (EG), 30% (w/v) ficoll and 0.3 M sucrose in DPBS. Mouse IVF zygotes were vitrified by two freezing methods. The survival rates of 1-cell zygotes were assessed as cleavage to the 2-cell stage and development into the hatching blastocysts at 5 day. In the one-step method, embryos were directly exposed to the vitrification solution at 25°C for 1 min. Survival and development rates of zygotes were 85.5% and 31.9%. In the two-step method, embryos were equilibrated with a dilute 20% EG for 1, 3, 5 min. before 1 min. exposure to EFS40,

respectively. However, the rates of development (17.7, 3.3, 0%) were lower than that of one-step method. The highest survival rate (95.9%) was obtained by one-step method which exposes embryos in EFS40 for 30 sec. and 63.8% of 2-cell developed into hatching blastocysts. In the cell number of Total and ICM using differential labelling technique, there are no significant differences in the cell number of Total and ICM between blastocysts developed in vitrified-thawed embryos (63.2 ± 16.9 , 13.5 ± 4.0) and control blastocysts (54.0 ± 15.2 , 12.3 ± 4.6). Therefore, these results show that mouse zygotes can be successfully cryopreserved by this proposed vitrification method.

- 8 -

냉동 보존후 생쥐 배아의 발생에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실¹,
서울대학교 의과대학 산부인과학교실²

이경순¹, 문신용², 안정자¹

최근 불임 환자의 치료로써 보조생식술이 보편화됨에 따라 임신율을 높이기 위한 연구가 이루어지고 있다. 특히 성선자극호르몬 방출호르몬 유도체(gonadotropin-releasing hormone agonist, 이하 GnRHa로 약함)를 사용하여 과배란 유도를 시행한 후 많은 수의 난자를 얻는 것이 가능하여졌고, 질식초음파를 이용하여 다수의 난자를 채취할 수 있게 되었다. 이에 따라 다수의 배아를 자궁내에 이식하여 다태임신의 빈도가 높아져 조기진통, 조산 등의 태아 및 모체측의 합병증이 의학적인 문제로 대두되고 있다. 이에 체외수정시술시 이식에 필요한 배아가 적정수를 초과하는 경우 배아의 보존이 문제가 되고 있어 이의 해결책으로 배아의 냉동보존이 이용되고 있다.

냉동보존후의 배아는 냉동 및 해빙의 과정을 거치는 동안 손상을 받아 배아 발생 및 임신율에 영향을 받게된다. 냉동보존 후 배아의 생존률에 영향을 주는 인자로는 첫째, 배아 세포막의 투과성 및

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