

Albumin was identified as spermatozoa motion stimulator in group I by using gel HPLC, SDS PAGE. The spermatozoa motion stimulators in the group III were presumably progesterone and estradiol by the methods of RIA, IR. In order to determine the effect of steroids, hFF was treated with dextran coated charcoal. The sperm motility were higher in charcoal untreated hFF than charcoal treated hFF.

In summary, hFF had positive effect on sperm motility, especially by its components such as albumin, progesterone, and estradiol. The inclusion of hFF to culture medium significantly improved motility scores of sperm samples maintained in vitro for extended time periods.

P-54 유리화동결법 (Vitrification)에 의한 인간 배반포 동결 용해 후 임신과 분만 성공에 관한 연구

차광렬 포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소

최동희 · 정형민 · 한세열 · 이학천 · 조용선 · 박은아
노민경 · 심상우 · 윤태기 ·

인간의 체외수정 프로그램에서 얻어지는 잉여 수정란을 동결보존한 후 해동하여 이식하는 치료법은 대부분의 불임치료기관에서 널리 이용되고 있다. 최근 배양 media의 개발 및 배양기술의 발달로 체외에서 인간 배반포난의 획득률이 증가하고 있는 추세이다. 인간 배반포난의 동결보존을 위해서는 종래에는 glycerol을 동결보호제로 이용한 slow freezing 방법이 주로 이용되었다. 한편, 유리화동결법 (vitrification)에 의한 배반포난의 동결보존법은 slow freezing 방법에 비해 여러 가지 장점을 가지고 있다. 본 연구는 본원에서 최근 개발된 유리화동결방법을 인간 배반포난의 동결보존에 적용하였을 때 임신성공 등 임상결과를 알아보려고 시행되었다. 불임여성에서 GnRH agonist와 gonadotropin으로 과배란유도하여 회수된 난자를 체외수정 후 fresh embryo transfer하였고 잉여의 수정란은 배반포난에 이르기까지 체외배양하였다. 배반포난을 1.5 M ethylene glycol (EG) 용액에서 2.5분간 처리한 후 5.5 M EG + 1 M sucrose 용액에 20분간 노출시켰고 electron microscope grid에 옮긴 후 액체질소에 침지함으로써 유리화동결을 실시하였다. 동결된 수정란의 용해를 위해서는 1 M, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M sucrose 용액에 수정란을 2.5분씩 순차적으로 노출시킨 후 배양액으로 옮겨 3~4시간 배양하여 배반포난의 reexpansion 유무를 확인하였다. 용해 후 형태학적으로 정상인 배반포난만을 수정 4~5일 후, 또는 artificial cycle 18~19일째의 분비기 자궁내막을 가진 환자에게 이식하였다. 1998년 10월부터 1999년 7월까지 20명의 환자에서 배아이식을 실시하였다. 환자들의 평균연령 및 불임기간은 각각 30.8 ± 2.9 세, 4.5 ± 3.1 년이었고 불임의 원인은 난관성불임 10예, 남성불임 4예, 원인불명 2예, 자궁내막증 1예, 그리고 복합원인이 3예이었다. 총 68개의 배반포난을 용해하여 48개가 생존하였고 (생존율 70.6%), 이중 38개의 배반포난을 이식하였다. 환자 당 이식된 평균 배반포난의 수는 1.9 ± 0.9 개였다. 20명의 환자 중 5명에서 clinical pregnancy를 얻었고 유산이나 자궁외 임신 예는 없었다. 임신 5예는 3태임신 1예, 쌍태임신 3예, 단태임신 1예로서 배아이식 당 임신율은 25.0% (5/20), 착상율은 26.3% (10/38)을 나타냈다. 임신된 환자 중 2명은 임신 38~39주에 건강한 남아 쌍둥이를 분만하였고, 나머지 3명은 각각 임신 35주, 22주, 19주로 태아 상태는 정상이다. 이상의 결과로 보아 동결보호제로 ethylene glycol을 사용하고 electron microscope

grid를 이용하여 전도율을 높인 본원에서 개발된 vitrification 법에 의한 초급속 동결법은 인간 배반포난의 동결보존에 효과적으로 이용될 수 있다고 사료된다.

P-55 소 배반포 동결융해란의 포배강 내 아미노산 농도

한경대학교 동물생명자원학과, 중앙대학교¹

박용습* · 정연길 · 노상호 · 이호준 · 최은주
김창근¹ · 정영채¹ · 윤종택

본 연구는 체외수정 소 배반포란을 신선란과 동결란으로 구분하여 포배강 내 아미노산 농도를 측정하여 포배강 내의 아미노산 이용도를 알아보기 위하여 실시하였다.

도출된 한우 난소로부터 흡입, 채취한 난자를 선별하여 TCM-199에 10% FBS를 첨가한 배지에서 24시간 동안 체외성숙시킨 후 30~42시간 동안 수정용 TALP 배양액을 이용, 체외수정하였으며 수정 후 난자는 4-well dish에서 난관상피세포와 공배양하거나 6~10개씩 30 μ l의 배양액 (배양용 TALP) 미소적에 분주하여 7~10일간 배양하였다. 배양 후 확장배반포로 발육한 수정란을 선별하여 10% glycerol 동결배지를 사용, -5 $^{\circ}$ C에서 식빙한 후 -30 $^{\circ}$ C까지 -0.5 $^{\circ}$ C/min 속도로 냉각하여 액체질소에 침지하였다. 융해는 0.3 M의 sucrose가 함유된 PBS배지에 6%, 3%, 0% glycerol이 첨가된 융해배지에 각각 5분간 정치하여 다단계 융해하였다. 아미노산 분석은 Biochrom 20 (Pharmacia Biotech, England)을 사용하여 실시하였다. 배반포를 동결-융해한 후 1% NEAA + 2% EAA 첨가한 mTALP 배양액 내에서 12시간 배양, 재확장 여부로 생존성을 판정한 후 확장된 배반포 만을 선별하여 포배강 내 아미노산 농도측정에 공여하였다. 아미노산농도측정을 위해 BSA를 PVA로 대체한 TALP 배양액으로 20 μ l의 미소적을 만들고 각각의 미소적에 배양액과 15~30개의 난자를 10 μ l 첨가하여 최종 volume을 30 μ l로 조정 한 후, 미세조작기를 이용하여 포배강 내의 액을 흡입하여 배지와 회석하여 분석하였다.

공배양 및 단순배양체계에서 생산된 체외수정란의 동결·융해 후 생존성은 각각 52% (39/75) 및 21.5% (17/79)로 나타나 공배양유래 배반포가 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.0001$). 신선란에서는 포배강 내의 아미노산이 methionine, leucine, glutamine, arginine, isoleucine 등 11종의 필수 아미노산 및 glutamate, aspartate, alanine, proline 등 7종의 비필수 아미노산이 검출되었다. 동결융해한 포배강 내 아미노산은 tyrosine, phenylalanine, cysteine, threonine 등 10종의 필수아미노산 및 glycine, serine, asparagine, alanine 등 4종의 비필수 아미노산이 검출되었다. 본 실험의 결과로 보아 단순배양체계 유래의 수정란보다 공배양 유래 수정란의 동결성이 좋은 것으로 사료되며, 신선란과 동결·융해란은 각기 다른 아미노산을 대사활성에 이용하고 있음이 시사되었다.