

to cells cultured on feeders, hES cells maintained under feeder-free conditions expressed Oct4, alkaline phosphatase, surface marker (SSEA-4).

Conclusions: The established hES cells derived from frozen-thawed blastocysts can be maintained on feeder-free condition without loss of human cell characterization.

P-10 체외수정된 생쥐 배아에서 배아줄기세포의 확립

서울대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 의학연구원 인구의학연구소²

박용빈² · 김희선² · 오선경^{1,2} · 천대우^{1,2} · 서창석^{1,2} · 김석현^{1,2}
최영민^{1,2} · 김정구¹ · 문신용^{1,2} · 이진용¹

목 적: 본 실험에서는 체외수정으로 얻은 생쥐 배아를 이용하여 ES 세포주를 확립하기 위한 조건을 알아보기 위한 연구의 일환으로 첫째, 내세포피 분리 방법과 발생 단계에 따른 내세포피의 획득률과 ES 세포주의 확립률을 조사하고, 둘째, 배아로부터 ES 세포 확립에 이르기까지의 형태학적 관찰과 셋째, 확립된 ES 세포의 미분화 특성을 조사하여, 향후 불임치료가 끝난 환자로부터 기증받은 잉여의 배아로부터 ES 세포를 확립하는데 필요한 기초 자료를 얻고자 한다.

대상 및 방법: 6주령 F1 hybrid (C57BL♀ x CBA♂)를 과배란 유도하여 체외수정시킨 후 수정이 확인된 2세포기 배아를 일정 시간 동안 체외배양하여 적정 발생 단계 (expanded blastocyst, hatched blastocyst)에 도달한 배반포만을 골라 투명대를 제거하고, immunosurgery 혹은 전체 배아를 배양한 후 내세포피를 분리하여 배양하였다.

분리한 내세포피를 trypsin-EDTA로 처리하여 작은 조각으로 만든 후, DMEM (high glucose, 15% FBS)를 배양액으로 사용하여, STO feeder layer로 미리 처리한 배양접시에서 배양하였다. ES-like cell clump가 형성된 균을 계속 계대배양하여 ES-like 세포주를 확립하고, ES-like 세포주로 확립되기까지의 cell clump의 모양을 위상차 현미경으로 관찰하였다. 또한, 확립된 ES-like 세포주의 특성을 알아보기 위하여 미분화된 세포의 표지자로 알려진 alkaline phosphatase의 활성을 조직화학적 방법으로 측정하고, transcription factor인 Oct-4의 발현 여부를 RT-PCR로 확인하였다.

결 과: Immunosurgery 혹은 전체 배아를 배양하여 내세포피의 분리, 배양한 결과, 두 경우 모두 내세포피가 크게 성장하였으나 immunosurgery에 의한 경우는 이틀간 배양에도 이미 원시내배엽과 외배엽으로 분화가 이루어져서, 작은 조각을 내어 다시 배양하면 ES-like cell clump가 형성되지 않고 세포의 분화가 이루어졌으나, 전체 배아를 배양하여 내세포피를 성장시킨 경우에는 내세포피의 분화가 이루어지지 않은 상태에서 성장이 일어나 이를 작은 조각을 내어 다시 배양하면 ES-like cell clump가 형성됨을 관찰할 수 있었다. 따라서 이후 실험은 전체 배아를 배양하여 내세포피를 분리, 배양하였다.

발생시기에 따라서는 expanded blastocyst가 hatched blastocyst 보다 내세포피의 성장 (89% vs 59%)이 더 잘 되었으며, ES-like cell clump의 생성 (11% vs 0%)도 더 높은 것으로 나타났다. 또한 이렇게 확립된 ES-like cell에서 미분화된 pluripotent 세포의 특성인 alkaline phosphatase의 활성과 Oct-4 mRNA의 발현이 모두 양성으로 나타났다. 반면에 분화가 일어난 ES-like cell에서는 alkaline phosphatase의 활성이 나타나지 않았으며, 내배엽유사세포 (endodermal-like cell), 신경유사세포 (neuron-like cell), 근유사다핵세포 (muscle-like syncytium)과 같은 다양한 형태의 세포로 분화되었음을 관찰하였다.

결 론: 본 실험의 결과, 체외수정하여 얻은 생쥐 배아로부터 ES-like 세포주를 확립하였으며, 특히

expanded blastocyst 시기에서만 ES-like 세포주가 확립됨을 알 수 있었다. 그러나 ES-like 세포주의 확립 성공률은 그다지 높지 않았으며, 이러한 이유는 배아의 체외배양 조건이 체내와 동일하지 않았기 때문이라고 생각된다. 따라서 체외배양 조건을 개선하는 연구가 활발히 이루어져야만이 향후 사람을 비롯한 많은 실험동물에서 체외수정하여 얻은 배아로부터 ES-like 세포주를 확립하는 것이 수월하게 이루어질 것이다.

P-11 Creation of Viable Oocyte using Diploid Somatic Cell-derived Nuclear Transfer Technique

마리아 기초의학연구소/마리아 생명공학연구소, ¹마리아 병원
박세필 · 김은영 · 길광수 · 허영태 · 윤지연 · 박세영 · 임진호¹

Objective: In this study, we tried to create bovine normal haploid oocyte by modified nuclear transfer technique and to produce blastocyst from these reconstructed oocytes after *IVF*.

Materials and Methods: Bovine female adult fibroblast cells arrested in G0/G1 of cell cycle using trichostatin-A were introduced into *in vitro* matured and enucleated recipient oocytes. Reconstructed eggs were activated by chemical method and cultured to permit extrusion of polar body for 18 h. Some of these eggs were stained with Hoechst to observe chromatin morphology in hourly intervals until 18 h of culture. Also, 8-cell embryos recovered at 60 h after *IVF* were examined their chromosome number using G-banding technique. And remainder were developed to blastocyst stage after *IVF*.

Results: Forty three (46.2%) of 93 donor cell and recipient oocyte units were fused. In the fused oocytes, *in vitro* survival, cleavage and development to morula and blastocyst stage were 86.0%, 53.5% and 20.9%, respectively. We confirmed that transition from premature chromosome condensation (PCC) to prophase was observed after 8 h. Especially, extruded polar bodies in reconstructed eggs observed at 18 h after fusion using Hoechst staining. Normal chromosome number was observed with blastomere of 8-cell embryos.

Conclusions: This result indicated that viable oocyte can be created using diploid somatic cell-derived nuclear transfer technique and that it may offer the pregnancy opportunity to infertile women who do not produce their own oocytes in human IVF-ET program.

P-12 수정된 배아의 전핵 상태가 배아 발달 및 임신율에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 의학연구원 인구의학연구소²
성기철² · 김희선² · 오선경^{1,2} · 천대우^{1,2} · 천은경¹ · 서창석^{1,2} · 김석현^{1,2}
최영민^{1,2} · 김정구¹ · 문신용^{1,2} · 이진용¹

목 적: 수정된 배아의 전핵 상태가 배아 발달에 미치는 영향을 알아보고 배아의 발달을 예측하여 임신과의 관계를 알아보고자 하였다.