

P-2 Establishment of Bovine Ovum Bank: I. Full Term
Development of Vitrified Hanwoo (Korean Cattle)
In Vitro Matured Oocytes by Minimum Volume
Cooling (MVC) Method

마리아 기초의학연구소/생명공학연구소, ¹농협중앙회 가축개량사업소,
²건국대학교, ³마리아병원

김은영 · 김덕임¹ · 이문걸¹ · 이종우¹ · 이금실 · 박세영 · 박은미 · 윤지연
허영태 · 조현정 · 길광수 · 박세필 · 정길생² · 임진호³

Objective: This study was to test whether Hanwoo *in vitro* matured oocytes can be successfully cryopreserved by a new vitrification procedure using MVC method.

Materials and Methods: For the vitrification, oocytes were pretreated in 10% ethylene glycol (EG10) for 5~10 min, exposed in EG30 for 30 sec, each oocytes were individually put on the inner wall of 0.25 ml straw, and then straws were directly plunged into LN₂. Thawing was taken by 4-step procedures [1.0 M sucrose (MS), 0.5 MS, 0.25 MS, and 0.125 MS] at 37°C.

Results: *In vitro* developmental capacity (survival, cleavage (≥2-cell) and blastocyst rates) in vitrified group was no significant difference compared to that in other treatment groups (exposed; 100.0, 74.4, 32.3% and control; 100.0, 78.3, 36.3%); high mean percentage of oocytes (91.2%) was survived, 69.4% of them were cleaved and 27.9% of cleaved embryos were developed to blastocyst. Especially, after transfer of *in vitro* developed embryos in vitrified group, four of six recipient animals were found to pregnant and three of them were ongoing pregnant by manual palpation at 250 days after transfer. Among them, two healthy female calves (23 kg and 25 kg) were born.

Conclusion: This result demonstrates that MVC method is very appropriate freezing method for the Hanwoo *in vitro* matured oocytes and that ovum bank can be maintained efficiently by MVC cryopreservation method.

P-3 인간 포배기 배아의 유리화 동결 · 융해
및 임신 · 분만 2례

민병열 산부인과

김시영 · 임준교 · 이민희 · 민병열

인간 수정란의 배양 기술 발달은 인간 포배기 배아의 획득율을 증가시키고 있다. 지금까지 인간 포배기 배아의 동결은 glycerol을 동결 보호제로한 slow freezing 방법이 주를 이루어왔으나, 유리화 동결법의 장점과 그 발달로 인해 동결 방법에 변화가 있어 왔다. 이에 본원에서 Human IVF-ET 후 잉여 배아의 동결에 독성이 낮으며, 높은 생존율이 보고된 ethylene glycol을 기본 동결 보호제로한 EFS 40 (40% ethylene glycol, 18% ficoll, 0.3 M sucrose)과 electron microscope grid를 이용하여 유리화 동결법을 시

행하였고, 용해 후 임신 및 분만된 2례를 보고한다.

증례 1은 30세의 여성으로 양측 난관 폐쇄에 의한 불임 기간 4년의 환자였고, 증례 2는 34세의 여성으로 남성 인자 및 배란 장애에 의한 불임 기간 6년의 환자였으며 ICSI를 시행하였다. IVF-ET 후 3일까지 P1 배양액에서 배양된 증례 1과 2의 배아 각각 10개, 11개를 난구 세포와 함께 20% 난포액이 첨가된 YS 배양액에서 2~3일간 추가 배양하여 5개 (증례 1)와 6개 (증례 2)의 포배기 배아를 획득하였고, 이를 유리화 동결하였다. 유리화 동결은 20% FBS가 첨가된 PBS를 기본 배양액으로 1.5 M ethylene glycol에서 2.5분, EFS 40에서 20~30초간 노출시킨 후 electron microscope grid에 옮겨 액체 질소에 침지하였다. 동결된 포배기 배아의 용해는 증례 1과 2의 포배기 배아 각각 5개와 3개를 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M sucrose가 첨가된 PBS 용액에서 각각 2.5분씩 노출함으로써 용해하였다. 용해 후 난구 세포와 6시간 공 배양을 실시하여 다시 팽창된 포배기 배아만을 이식하였다. 증례 1은 hMG만을 투여한 배란 주기에 맞추어 3개의 포배기 배아를 이식하였고, 증례 2는 Estradiol valerate로 준비된 주기에 3 개의 포배기 배아를 이식하였다.

증례 1은 임신 19주에 양수천자를 시행하여 정상 핵형임을 확인하였고, 2001년 2월 임신 39주에 3.43 kg의 건강한 여아를 제왕 절개 분만하였으며, 증례 2는 분만 예정일 2001년 12월 16일로 현재 임신 진행 중이다.

이상의 결과는 EFS 40과 electron microscope grid를 이용하여 인간 포배기 배아의 유리화 동결 보존 및 용해 후 이식하여 정상적으로 발생하는 것을 확인하였으며, 이러한 EFS 40과 electron microscope grid를 이용한 유리화 동결법이 인간 포배기 배아의 동결 보존에 효과적으로 이용될 수 있으리라 사료된다.

P-4 2-cell Block 전후의 생쥐 초기 배아의 Ca^{2+} -channel 분포에 관한 연구

성신여자대학교

강 문 주 · 배 인 하

목 적: Ca^{2+} 은 생쥐의 2-cell block 현상과 밀접한 관계가 있는데 생쥐 난자에서 초기 2-세포기 배와 후기 2-세포기 배에서의 Ca^{2+} 요구성이 다른 것은 배 내의 Ca^{2+} -channel의 변화가 있는 것이 아닌가 하는 추정이 가능하다. Ca^{2+} -channel은 크게 (1) voltage-dependent Ca^{2+} -channel (2) ligand-gated Ca^{2+} -channel (3) Ca^{2+} -leak channel 등의 세 종류가 알려져 있고 세포의 분화에 따라 이들 channel들의 종류도 변화하고 있다고 알려져 있다. 여포난자성숙, 수정, 밀집화 및 부화 과정에 Ca^{2+} -influx가 일어나고 있으나 발생 단계에 따라 어떤 type의 Ca^{2+} -channel이 관여하고 있고 어떻게 변하고 있는지 또 몇 가지 type의 Ca^{2+} -channel 등이 공존하고 있는지에 대한 연구는 거의 이루어지고 있지 않다.

본 실험에서는 생쥐 초기 2-세포기 배를 수집하여 2-cell block 현상이 나타난 배와 2-cell block이 극복 (overcome)된 배, Ni^{2+} 에 의해 2-cell block이 극복된 배의 Ca^{2+} -channel의 변화를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법: Swiss albino인 ICR 계통의 생후 6~8주된 암컷은 5 IU의 PMSG와 hCG를 주사하여 과배란을 유도시키고 생후 12주 이상 되어 생식력이 있는 수컷과 합사하여 hCG 주사 후 32시간에 초기 2-세포기 배를, hCG 주사 후 36시간에 4-세포기 배를 얻었다. 2-cell block 극복은 Ni^{2+} 50 μ l를 이용하였다. 각 처리군의 배들은 면역세포화학적 방법 (immunocytochemical method)으로 관찰하였다.