

도와 동결 속도를 달리한 두개의 완만동결방법을 비교하여 보다 효과적인 완만동결방법을 알아보고자 하였다.

**Method:** ICR 생쥐 암컷에 PMSG와 HCG를 48시간 간격으로 주사하여 과배란을 유도하여 2-세포기 배아를 채취하였다. 채취된 배아는 초기 포배기 단계까지 GIII sequential media (Vitrolife, Sweden AB, Sweden)에서 48시간 동안 체외배양하였다. 배양된 초기 포배기 배아를 두 군으로 나누어 Group-I은 기존의 완만동결방법으로 동결하였다 (20℃에서 동결 시작하여 -6℃까지 -2℃/분의 속도로 냉각하고 식빙 후 -35℃까지 -0.3℃/분 그리고 -140℃까지 -30℃/분의 속도로 냉각). Group-II는 -6℃에서 동결을 시작하여 2분 후에 식빙하고 -40℃까지 -0.5℃/분의 속도로 냉각하는 변형된 완만동결방법으로 동결하였다. 동결액으로는 두 군에서 모두 Blastocyst slow-freezing kit (Vitrolife, Sweden AB, Sweden)를 사용하였다. 두 군 모두에서 급속 용해 후 24시간 뒤에 두 군간의 부화율을 비교하였고, 용해 후 0시간과 24시간 경과 후에 differential staining을 실시하여 두 군간의 전체 세포수와 내세포괴 (inner cell mass, ICM)와 영양배엽 (trophectoderm, TE)의 비율 차이를 조사해 보았다.

**Results:** 용해 후 두 군간의 생존률은 차이가 나지 않았으나 24시간 뒤의 부화율은 Group-I에서 44.2%, Group-II에서 67.6%로 변형된 완만동결법에서 통계적으로 유의하게 높게 나타났다 (p=0.0224). 전체 세포수는 동결, 용해 과정을 거치지 않은 대조군이 0시간 때 33.8개, 24시간 때 100.7개이었던 반면 Group-I은 33.5개, 89.0개, Group-II는 28.6개, 88.1개로 동결 용해를 거친 포배기 배아에서 24시간 때의 전체 세포수가 대조군에 비해 적게 나타났다. ICM과 TE의 비율 차이는 대조군은 17.9%, Group-I은 16.9%, Group-II는 19.1%로 통계적 유의성은 없었으나 변형된 완만동결법으로 동결한 포배기 배아에서 ICM의 발달률이 기존의 완만동결법으로 동결한 포배기 배아보다 높게 나타났다.

**Conclusions:** 저온에서의 동결 시작 온도와 빠른 동결 속도를 사용한 변형된 완만동결법에서 생쥐 포배기 배아의 부화율이 더 높게 나타났다. 그리고 통계적 유의성은 없었으나 두 완만동결법 간의 ICM과 TE의 비율 차이가 변형된 완만동결법에서 더 높게 관찰되었다. 따라서 변형된 완만동결법이 기존의 완만동결법보다 생쥐의 초기 포배기 배아의 동결에 더 효과적임을 알 수 있었다.

## P-17      마우스 성숙난자의 유리화 동결 중 Cytoskeleton Stabilizer, Taxol의 처리 후 배발달률과 산자의 생산

박성은<sup>1,3</sup> · 이숙환<sup>2,3</sup> · 정혜진<sup>1,3</sup> · 조정현<sup>2</sup> · 권 황<sup>2</sup>  
김수희<sup>2</sup> · 윤태기<sup>2,3</sup> · 차광열<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CHA Research Institute 보건복지부지정 생식의학 및 불임유전체 연구센터,  
<sup>2</sup>포천중문의과대학교 산부인과, <sup>3</sup>보건복지부지정 생식의학 및 불임유전체 연구센터

**Background & Objectives:** 유리화 동결법은 동결 중 ice crystal의 형성이 이루어지지 않으므로 난자의 세포질의 손상을 줄일 수 있는 장점이 있는 것으로 보고되었다. 그러나 여러 연구자들은 성숙난자의 유리화 동결 보존시 염색체와 방추사의 이상성이 증가됨을 보고하였다. 이에 유리화 동결 중 세포골격계를 안정화 시킬 수 있다면 동결 중 성숙난자의 방추사를 보호하여 동결 용해 후의 난자의 생존률과 배발달률을 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 난자의 유리화 동결 시 세포골격계의 stabilizer인 Taxol™을 항동해제에 첨가하여 동결 용해 후 생존률과 배발달률을 증진

시킬 수 있는지 알아보고자 본 실험을 시행하였다.

**Method:** 암컷 ICR 생쥐를 과배란 유도하여 난관팽대부로부터 성숙난자를 회수하였다. 회수된 성숙난자는 연구의 목적에 따라 Taxol 처리군과 Taxol 비처리군으로 분류하여 유리화동결시켰다. 동결방법은 grid를 이용한 변형시킨 Martino 방법을 이용하였다. 용해 후 수정을 유도하였으며 수정란은 P-1 배양액에 배양하며 48, 72, 84, 96시간에 배발달률을 관찰하였다. 발달된 배반포는 자궁에 이식시키고 분만시까지 관리를 통해 산자 생산을 유도하였다.

**Results:** 배발달률은 Taxol 비첨가군의 경우 4세포기 44.7% (132/295), 8세포기 31.8% (94/295), 상실배 24.7% (73/295), 그리고 배반포 20.3% (60/295)였고, Taxol 첨가군은 4세포기 69.7% (191/274), 8세포기 64.2% (176/274), 상실배 54.3% (149/338), 그리고 배반포까지 발달률은 49.2% (135/274)로 모든 배발달 단계에서 두 군간의 유의성이 관찰되었다. 동결 용해한 난자를 체외수정 후 발달시켜 얻은 배반포를 대리모에 이식한 결과 Taxol 비처리군에서 56개의 배반포를 7마리의 대리모에 8개씩 이식한 결과 3마리의 대리모가 임신되어 21마리의 산자가 태어났으며, Taxol 처리군의 경우 72개의 배반포를 9마리의 대리모에 8개씩 이식한 결과 4마리의 대리모에서 26마리의 산자가 태어나 임신율과 착상률 모두 두 군간에 차이가 없었다.

**Conclusions:** 본 연구 결과 grid를 이용한 유리화 동결 시 마우스 성숙난자의 생존율을 증가시킬 수 있었으며, 항동해제에 Taxol을 첨가하여 동결 용해 후 수정시킨 난자들이 비처리군에 비해 배발달률이 증가되었고, 배반포를 대리모에 이식한 결과 건강한 산자가 분만되었다. 따라서 마우스를 이용한 이들 동결 방법을 임상적으로 이용한다면 난자 공여가 필요한 환자를 위한 난자은행의 설립에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

---

**Acknowledgement:** 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (과제고유번호: 01-PJ10-PG6-01GN13-0002).

## P-18 Human Fetal Liver-Derived Stem Cells Support Culture of Human ES Cells In Vitro

Rhee YH, Park KH, Lee SH, Lee DR, Yoon TK, Cha KY, Chung HM

*Cell and Gene Therapy Research Institute, College of Medicine,  
Pochon CHA University, Seoul, South Korea*

**Background & Objectives:** Embryonic stem (ES) cells are continuous proliferating stem cell lines of embryonic origin first isolated from the inner cell mass (ICM) of mouse blastocysts 20 years ago. The distinguishing features of these ES cells are their capacity to be maintained in an undifferentiated state infinitely in culture and their potential to develop into every cell of the body. Prolonged propagation of human embryonic stem (ES) cells is currently achieved by co-culture with primary or immortalized mouse embryonic fibroblast (MEF) cells. In order to replace the heterologous with homologous co-culture systems, an attempt was made using mononuclear cells derived from human fetal liver. Human Fetal Liver Derived Stem Cells can be maintained for the prolonged period of time. They showed the characteristics of mesen-