

인간 포배기 배아의 초자화 동결에 관한 연구
I. 동결액과 발생단계가 초자화 동결한 포배기 배아의
생존율에 미치는 영향

김수희 · 이상원 · 이주희 · 강상민 · 이승민 · 이성구 · 윤혜균* · 윤산현* ·
박세필* · 송해범** · 임진호*
대구마리아 산부인과

Study on the Vitrification of Human Blastocysts
I. Effect of Cryo-Solution and Developmental Stage on
the Survival Rate of Vitrified Blastocysts

S. H. Kim, S. W. Lee, J. H. Lee, S. M. Kang, S. M. Lee, S. K. Lee, H. G. Yoon*,
S. H. Yoon*, S. P. Park*, H. B. Song** and J. H. Lim*

Taegu-Maria Ob./Gyn.

SUMMARY

This study was conducted to investigate the effects of vitrification solution and developmental stage on the survival rate of vitrified-thawed human blastocyst embryos.

Human blastocyst embryos were cryopreserved by vitrification using EFS and GE solution, and their survival rates were examined after thawing and further culture. EFS solution was consisted of 40% ethylene glycol, 18% Ficoll 70 and 0.3 M sucrose. GE solution was consisted of 25% glycerol and 25% ethylene glycol. Embryos were exposed to EFS and GE solution by 2 steps and 3 steps, respectively, and plunged into liquid nitrogen after loading into 0.25ml plastic straws. Blastocysts were classified into 4 groups in accordance with their developmental stage: into 1) EEB, 2) MEB and 3) EdB, of blastocysts developed on day 5, and 4) 6d-Bla(the blastocysts which formed on day 6). The blastocysts at each stage were vitrified by GE solution and cryopreserved in LN₂. After thawing them, we examined their survival rates, respectively.

The results of this study were as follows:

1. The survival rate of blastocysts vitrified by GE solution was 64.4%, significantly higher than that(5.7%) vitrified by EFS solution(P<0.001).
2. When the blastocysts were vitrified by GE solution according to each developmental stage, the survival rates of EEB, MEB, EdB and 6d-Bla were 65.9%, 65.9%, 73.2% and 58.1%, respectively.

* 서울마리아 산부인과(Seoul-Maria Ob. /Gyn. & Maria Infertility Medical Institute)

** 대구대학교 축산학과(Department of Animal Science, Taegu University, Korea)

In conclusion, the cryopreservation of human blastocysts by vitrification is likely to have a marked advantage in terms of cost, work and time as compared to the conventional slow freezing in IVF-ET programs.

(Key words : vitrification, human blastocyst embryos, EFS, GE solution)

서 론

동결-융해된 배아의 이식에 의한 인간의 임신이 처음으로 보고(Trounson과 Mohr, 1983)된 이래, 배아의 생존율과 임신율을 높이기 위한 여러 가지 동결 보존법이 계속해서 연구되고 있다(Cohen 등, 1985; Menezo 등, 1992; Kaufmann 등, 1995). 배아의 동결보존은 다태 임신을 감소시키고 채취당 임신율을 향상시키며 과배란 유도시 소요되는 경비와 시간을 절약할 수 있는 장점 등이 있으며, 최근 몇 년 동안 Human IVF programs에서 중요한 역할을 해 오고 있다(Kahn 등, 1993; Van Voorhis 등, 1995). 대부분의 Human IVF centers에서 채택되고 있는 동결방법인 완만 동결방법은 동결과정이 완료되는데 2~3시간이 소요되고, 많은 양의 액체 절소가 소비되며, 동결 진행 과정 동안 동결기를 잘 다루는 연구원의 지속적인 주의를 필요로 하는 등 단점이 있다. 이런 단점을 보완하고 그 과정을 간단히 하려는 노력이 많이 시도되어 왔는데 특히 초자화 동결은 기존의 자동 세포 동결기를 이용한 완만 동결법과는 달리 빙결정의 형성이 없으므로 융해 후 세포의 생존성 및 발달에 매우 효과적이며, 그 과정이 간편하고 경제적이어서 최근에 연구가 활발히 진행되고 있다(Kasai 등, 1990; Yang 등, 1992; Mahmoudzadeh 등, 1994; Ohta 등, 1996; Vanderzwalmen 등, 1997).

Rall과 Fahy(1985)가 생쥐 배아를 이용하여 초자화 동결의 성공을 처음으로 보고한 이후 초자화 동결한 생쥐 배아의 이식으로 산자 생산이 보고(Rall 등, 1987)되면서 초자화 동결의 효과가 증명된 이래 계속적인 연구가 이루어졌으며, 최근 자료에서는 완만 동결방법보다 오히려 초자화 동결에 의한 초급속 동결방법이 체외에서 생산된 가축 배아의 생존율에 더 효과적이라고 보고되고 있다(Leibo와 Loskutoff, 1993; Mahmoudzadeh 등, 1994; Polard와 Leibo, 1994).

초자화 동결은 빙결정의 형성을 방지하기 위해서 고농도의 동결 보호제의 첨가가 필수적이며 고농도의 동결 보호제의 독성을 줄이기 위해서는 매우 빠른 속도로 동결이 이루어져야 한다(Fahy 등, 1984). 동결 보호제의 종류와 혼합액은 생존율에 중요한 영향을 미치는데 최근에 ethylene glycol, ficoll, sucrose의 혼합액(EFS ; Kasai 등, 1990)과 glycerol, ethylene glycol의 혼합액(GE ; Yang 등, 1992)의 사용이 성공적이었다. EFS는 Kasai 등(1990)이 생쥐의 초자화 동결에 처음으로 사용한 이래 토끼(Kasai 등, 1992), 생쥐(Zhu 등, 1993), 소(Tachikawa 등, 1993; Mahmoudzadeh 등, 1995)등에서 성공적인 초자화 동결이 보고되었다. 또한 GE는 소 포배기 배아의 초자화 동결에서 높은 생존율이 보고된 바 있다(Yang 등, 1992; Saito 등, 1994). 최근에 인간 8세포기 배아의 초자화 동결로 인한 정상적인 임신과 분만이 보고(Ohta 등, 1996; Takahashi 등, 1997)된 바 있으며 포배기 배아의 초자화 동결로 인한 임신도 보고(Vanderzwalmen 등, 1997)된 바 있으나 아직까지 인간 배아의 초자화 동결에 대한 연구는 초기 단계이며 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 인간 포배기 배아를 동결액과 발생단계에 따라 초자화동결 후 생존율을 조사함으로써 가장 효과적인 포배기 배아의 초자화 동결법을 개발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시배아

초자화 동결 실험에 공시한 배아는 Human IVF programs에서 얻어진 다정자 침입이 일어난 수정란을 4~5일동안 난구세포와 공배양하여 발생된 포배기배아(이하 '포배'라 함)와 IVF-ET 후 질이 나쁜 잉여 수정란을 2~3일동안 난구세포와 공배양하여 발생된 포배로 하였다.

2. 과배란 유도 및 난자채취

과배란은 GnRH-agonist(Buserelin)의 장·단기 투여 하에, FSH/hMG를 이용하여 유도하였으며, 직경이 17~18mm 이상인 난포가 2개 이상 확인될 경우에 10,000 IU의 hCG를 투여하여 성숙을 유도하였다. 난자는 hCG 투여 후 36~38시간 후에 질식 초음파를 이용하여 난포를 흡인하여 채취하였으며, 채취된 난자는 성숙도에 따라 분류한 후 10% hFF (human Follicular Fluid)를 첨가한 YS 배양액(허 등, 1996)으로 옮겨서 수정능력을 획득할 때까지 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

3. 배양액

체외배양에 사용한 YS 배양액은 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 20 mM NaHCO₃ 및 5 mM KHCO₃가 혼합되고 0.2 mM taurine, 1 mM glutamine 및 0.1 mM EDTA가 첨가되었다. 또한 3 mM sodium lactate, 0.4 mM sodium pyruvate 및 10ml antibiotics antimycotic solution이 첨가되었으며 MEM수준의 non-essential amino acids와 vitamins 및 RPMI1640의 1/2 수준의 amino acids가 첨가되었다(허 등, 1996). 수정용 배양액은 10% hFF, 성장용 배양액은 20% hFF를 YS 배양액에 첨가하여 사용하였다.

4. 수정 및 수정란의 배양

수정은 성숙이 완료된 난자가 있는 YS 수정 배양액에 1×10⁵ cells/ml 고향력 정자를 첨가하여 유도하였고 수정을 실시한 14~18시간 후에 자성전핵, 응성전핵 및 제 2극체가 형성된 정상적인 수정란을 선별하여 난구세포가 배양된 미세 소적으로 옮긴 후 24시간마다 YS 성장 배양액을 교환하면서 4~5일동안 수정란을 배양하였다.

5. 초자화 동결액 및 융해액

모든 처리는 20% hFF가 첨가된 D-PBS를 기본 용액으로 하였으며, 초자화 동결에는 EFS와 GE 용액을 제조하여 사용하였다. EFS 동결액은 40% (v/v) ethylene glycol(E), 18%(w/v) Ficoll 70 (MW 70,000; Sigma Co. U.S.A.) 및 0.3 M su-

crose로 혼합하여 제조하였으며, GE 동결액은 25%(v/v) glycerol(G)과 25%(v/v) ethylene glycol(E)을 혼합하여 제조하였다.

한편, 융해액은 기본 용액에 0.25 M sucrose를 첨가하여 제조하였다. 모든 용액은 제조 후 0.22μm filter로 여과하여 4°C에서 보관하였고, 사용하기 30분전에 실온에서 평형시킨 후 사용하였다.

6. 초자화 동결 및 융해 방법

동결과 융해는 실온에서 실시하였다. EFS용액과 GE용액에서 각각 0.25ml plastic straw 내로 2~3개의 포배를 흡입하고 straw의 cotton plug 방향을 약 5cm 가량 액체질소에 침지하였다가 5초 후 완전히 액체질소에 넣어 동결 보관하였다. 포배를 EFS 용액과 GE용액에서 평형한 후, straw에 흡입하고 액체질소에 완전히 침지할 때까지 걸리는 시간은 1분 이내로 하였다. 동결된 포배의 융해는 straw를 액체질소에서 꺼내어 공기 중에 5초간 노출하였다가 20~24°C 물에 10초간 노출함으로써 실시되었다.

EFS용액을 이용한 초자화 동결은 Mahmoudzadeh 등(1995)의 방법을 약간 변형하여 2단계로 실시하였다. 1단계로 E20용액에서 3분간 평형한 후 2단계로 EFS용액으로 옮겨서 Fig. 1a와 같이 straw에 포배를 흡입하고 straw를 액체질소에 침지하였다. EFS용액을 이용한 초자화 동결된 포배의 융해는 0.25 M sucrose 용액(0.8ml)을 담아둔 4well dish에 융해된 straw의 내용물을 배출하여 1분간 평형한 후, 신선한 0.25 M sucrose 용액과 PBS 용액에서 각각 5분간 동결 보호제를 제거함으로써 실시하였다.

GE용액을 이용한 초자화 동결은 Yang 등(1992)의 방법을 약간 변형하여 3단계로 실시하였다. 1단계로 G10용액에서 5분간, 2단계로 G10E20용액에서 5분간 평형을 실시한 후 3단계로 GE용액으로 옮겨서 Fig. 1b와 같이 straw에 포배를 흡입하고 액체질소에 침지하였다. GE용액을 이용한 초자화 동결된 포배의 융해는 빈 dish에 straw의 내용물을 배출한 후, 0.25M sucrose 용액과 PBS 용액에서 각각 5분간 동결 보호제를 제거함으로써 실시하였다.



* left to right(unit:mm): Heat Sealing & Sealing Powder, 0.5M Sucrose, Air, EFS, Air, EFS(**embryo column), Air, EFS, Air, 0.5M Sucrose, Cotton Plug & Heat Sealing

Fig. 1a. Configuration of 0.25ml straw loaded EFS solution before vitrification.



* left to right(unit:mm): Heat Sealing & Sealing Powder, GE, Air, GE(**embryo column), Air, GE, Air, 0.5M Sucrose, Air, 0.5M Sucrose, Cotton Plug & Heat Sealing

Fig. 1b. Configuration of 0.25ml straw loaded GE solution before vitrification.

7. 초자화 동결-융해한 포배의 생존율

동결-융해한 포배는 동결 보호제의 제거 후 20% hFF가 첨가된 YS 성장 배양액으로 2~3회 세척한 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 난구세포와 18시간 공배양을 실시하여 다시 팽창된 포배만을 정상적으로 생존한 것으로 간주하였고, 생존율은 회수된 포배들 중 생존한 포배로 판정하였다.

1) 동결액에 따른 생존율의 비교

EFS용액과 GE용액을 이용하여 포배를 각각 초자화 동결-융해한 후 동결액에 따른 생존율의 차이를 관찰하였다.

2) 발생단계에 따른 생존율의 비교

포배의 발생시기와 팽윤 정도에 따라 배양 5일째의 배아를 초기 팽윤포배(early expanding blastocyst: EEB), 중기 팽윤포배(middle expanding blastocyst: MEB) 및 완전 팽윤포배(fully expanded blastocyst: EdB)로 구분하고, 배양 6일째의 배아를 6일-포배(6-day blastocyst: 6d-Bla)로 분류하여 GE용액으로 초자화 동결-융해한 후 포배의 각 발생단계에 따른 생존율의 차이를 관찰하였다.

8. 통계적 분석

통계적 유의성 검정은 SAS(statistical analysis system)를 이용한 chi-square test에 의해서 분석

하였고, P<0.05 일 때 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 동결액에 따른 초자화 동결-융해한 후 포배의 생존율

EFS용액과 GE용액으로 초자화 동결-융해한 후 관찰된 포배의 생존율은 Table 1에서 보는 바와 같다. EFS군의 생존율은 5.7%로 낮은 반면, GE군의 생존율은 64.4%로 높게 나타나서 고도의 유의차를 보였다(P<0.001). Fig. 2는 GE용액으로 포배를 초자화 동결-융해하는 과정에서 관찰하였던 포배의 상태를 나타낸 것으로서 초자화 동결했다가 융해한 포배는 동결전의 포배와 형태적으로 큰 차이가 없는 것으로 관찰되었다.

Table 1. The survival rates of human blastocysts vitrified by EFS and GE solution

Vitrification solution*	No. (%) of embryos		
	Vitrified	Recovered	Survived
EFS	38	35	2(5.7) ^a
GE	46	45	29(64.4) ^b

* EFS : 40% ethylene glycol + 18% ficoll + 0.3M sucrose

GE : 25% glycerol + 25% ethylene glycol

^{a,b} Values with superscripts were high significantly different(P<0.001).

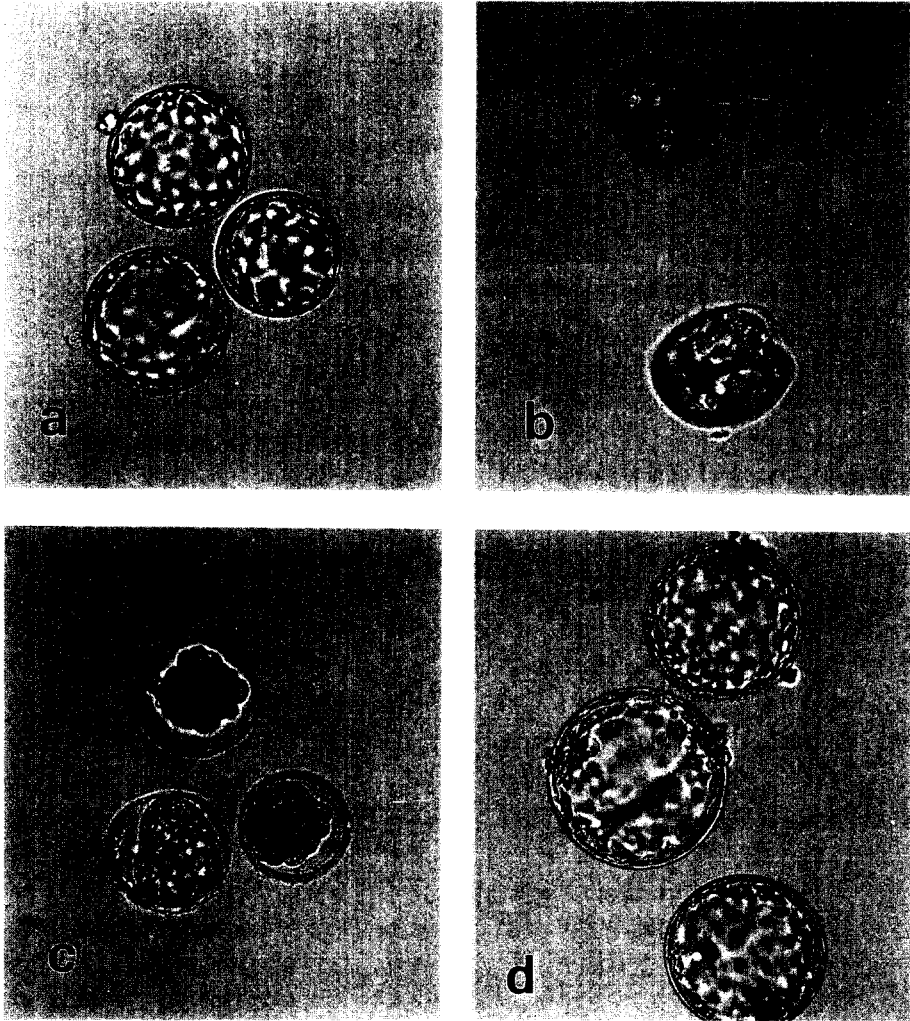


Fig. 2. The morphology of human blastocysts before vitrification and after thawing($\times 100$). (a: expanding blastocysts before vitrification, b: blastocysts exposed to GE solution, c: blastocysts at 0h after thawing, d: re-expanding blastocysts at 18h after thawing)

2. 발생단계에 따른 초자화 동결-융해한 후 포배의 생존율

포배의 발생단계에 따라 EEB, MEB, EdB, 6d-Bla로 분류하여 GE용액으로 초자화 동결-융해한 후 생존율을 관찰한 결과는 Table 2와 같다. 포배의 발생단계에 따른 EEB, MEB, EdB, 6d-Bla의 생존율은 각각 65.9%, 65.9%, 73.2%, 58.1%로 나타났다. EdB의 생존율이 73.2%로 가장 높았고

6d-Bla의 생존율이 58.1%로 가장 낮았지만 유의적인 차이는 없었다.

고 찰

완만 동결법은 Human IVF-ET programs에서 일반적으로 사용하는 동결법이지만 많은 시간과 비용이 소요되는 단점이 있어서 동결과정을 간단히 하려는 많은 노력이 시도되어왔다. 동물에서는 고

Table 2. The survival rates of human blastocysts at each developmental stage vitrified by GE solution

Stage*	No. (%) of embryos		
	Vitrified	Recovered	Survived
5 day EEB	45	44	29 (65.9)
MEB	41	41	27 (65.9)
EdB	43	41	30 (73.2)
6 day 6d-Bla	43	43	25 (58.1)
Total	172	169	111 (65.7)

* EEB: early expanding blastocyst; MEB: middle expanding blastocyst; EdB: fully expanded blastocyst; 6d-Bla: 6 day blastocyst.

농도의 동결 보호제의 사용으로 빙결정없이 빠른 시간 내에 동결이 이루어지는 초자화 동결을 일반적으로 사용하고 있으나, Human IVF-ET programs에서는 몇몇 연구자에 의해서 보고가 되고는 있지만 일반화되지는 않은 실정이다.

포유류 배아의 초자화 동결을 위해서 몇 가지 혼합액이 개발되어 왔는데, 초기 연구자의 대부분이 동결 보호제로써 DMSO, acetamide, propylene glycol, polyethylene glycol의 혼합액(Rall과 Fahy, 1985)과 glycerol, propylene glycol의 혼합액(Scheffen 등, 1986)을 사용해 왔으나, 최근에 Kasai 등(1990)에 의해서 ethylene glycol, ficoll, sucrose의 혼합(EFS)에 의한 초자화 동결이 보고된 이래 EFS용액이 많이 사용되고 있다(Kasai 등, 1992; Tachikawa 등, 1993; Zhu 등, 1993; Mahmoudzadeh 등, 1995). 또한 각종 침투성 동결 보호제의 혼합사용에 의한 초자화 동결도 많이 보고되고 있다(Massip 등, 1986; Valdez 등, 1990; Ishimori 등, 1992; Yang 등, 1992; Saito 등, 1994).

본 실험에 사용한 EFS용액은 최근에 가장 많이 사용되고 있는 초자화 동결액으로써 ficoll은 고분자 물질(macromolecule)로 안정적인 유리(glasses)의 형성을 촉진하는 역할을 하며 sucrose는 비침투성 동결 보호제로써 삼투작용에 의한 배아의 탈수화(dehydration)를 촉진함으로써 침투성 시약의 독성 효과를 막는 역할을 한다(Fahy 등, 1984; Kasai 등, 1990). EFS용액은 생쥐, 소, 토끼 등에서 높은

생존율과 산자 생산이 보고되고 있으며, 특히 Tachikawa 등(1993)은 소 포배를 one-step method로 초자화 동결-융해한 후 높은 생존율(74~77%)과 임신율을 보고한 바 있고 Mahmoudzadeh 등(1995)은 two-step method로 높은 생존율(75~89%)을 보고하였다.

최근에 EFS용액을 이용한 인간 배아의 생존율과 임신사례 등이 보고되고 있는데 Ohta 등(1996)은 8세포기의 배아를 초자화 동결-융해 후 이식하여 정상적인 임신과 분만 사례를 보고하였는데, 초자화 동결은 4℃의 40% ethylene glycol, 18% ficoll, 0.3M trehalose 혼합액(EFT)으로 one-step vitrification하였고, 20℃에서 straw를 융해하여 EFT용액을 75%, 50%, 25%, 12.5%, 6%로 점차적으로 희석하는 융해법을 사용하였다. 또한 Takahashi 등(1997)은 EFT용액으로 초자화 동결한 8~16세포기 배아는 이식하여 임신이 성립하였지만, 포배는 초자화 동결 후 생존율과 배아의 질이 낮았으며 임신이 성립하지 않았다고 보고하였다. 반면 Vanderzwalmen 등(1997)은 EFS용액을 이용하여 인간 포배의 동결 후 18.1%의 임신율을 보고한 바 있다.

GE용액은 Ishimori 등(1992)이 생쥐 포배를 25% glycerol과 25% ethylene glycerol의 혼합(GE)으로 초자화 동결한 후 높은 생존율(72%)을 보고한 바 있다. 특히 Yang 등(1992)은 GE로 소 포배를 초자화 동결한 후 80.8%의 높은 부화율을 보고한 바 있으며 Saito 등(1994)은 GE용액, GE용액에 sucrose를 첨가한 GES용액, sucrose 및 dextrose를 첨가한 GESD용액으로 소 포배를 초자화 동결하였을 때 GESD용액의 사용이 가장 높은 생존율(83.3~95.8%)과 부화율(69.2~85.9%)을 나타내었다고 보고하였다.

본 연구에서 인간 포배는 EFS용액과 GE용액으로 초자화 동결한 후 각각 5.7%와 64.4%의 생존율을 얻었다. Ohta 등(1996)과 Takahashi 등(1997)은 고농도로 혼합된 EFT용액의 독성을 막기 위하여 4℃에서 one-step method로 인간 배아를 초자화 동결하여 임신을 보고한 바 있는데 본 연구에서는 EFS용액을 이용하여 상온에서 two-step method로 초자화 동결하였다. 본 연구에서 포배는 EFS용액을 이용한 더 구체적인 실험은 이루어지지 않았

지만 상온에서 EFS용액을 이용한 초자화 동결법이 적절하지 않은 것으로 사료되며 조건을 달리한 구체적인 실험이 보충되어야 할 것 같다. 그러나 포배는 GE용액으로 상온에서 3단계로 초자화 동결할 때 높은 생존율을 얻었으므로 인간 포배의 초자화 동결이 가능함을 시사했다.

포배보다 상실배는 침투된 동결 보호제를 제거하는 동안 일어나는 삼투압력에 더 민감하며(Tachikawa 등, 1993), 포배나 팽윤된 포배는 상실배와 초기 포배보다 포배강이 더 많은 수분을 함유하여서 동결 보호제에 노출되었을 때 더 빨리 탈수화되며 탈수화의 시간이 길어질수록 독성효과가 증가한다(Mahmoudzadeh 등, 1995). Mahmoudzadeh 등(1995)은 EFS를 이용한 소 포배의 초자화 동결에서 배양 7일째 포배(51~73%)가 배양 8일째 포배(8~20%)보다 유의하게 높은 생존율을 나타내어 발달이 지연된 배아가 정상적으로 발달된 배아보다 초자화 동결한 후 유의하게 낮은 생존율을 나타냈다고 보고하였다.

본 실험에서는 인간 포배의 발생단계에 따른 생존율의 차이를 관찰하기 위하여 EFS용액보다 높은 생존율을 나타낸 GE용액으로 포배를 발생단계에 따라 분류 후 초자화 동결-용해한 후 생존율의 차이를 관찰하였을 때 배양 5일째 포배가 배양 6일째 포배보다 생존율이 높았다. 이것은 배양 6일째 포배가 발달이 지연되고 배아의 질이 낮아서 초자화 동결에 의한 상해가 더 큰 것으로 사료된다.

본 연구 결과는 인간 포배를 상온에서 간편하고 빠르게 초자화 동결이 가능함을 시사하며 앞으로 초자화 동결한 포배의 체내 이식 후 착상과 임신 가능 여부의 증명이 필요할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 인간 포배를 동결액과 발생단계에 따라 초자화 동결-용해한 후 생존율을 조사함으로써 효과적인 초자화 동결액의 개발과 높은 생존율을 얻을 수 있는 포배의 팽윤단계를 검토하여 Human IVF programs에서 초자화 동결의 적용 가능성을 조사하고자 실시하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. EFS용액과 GE용액으로 초자화 동결-용해한 후 포배의 생존율은 EFS군이 5.7%, GE군이 64.4%로 GE군이 유의하게 높게 나타났다($P < 0.001$).
2. 발생단계에 따라 배양 5일째의 EEB, MEB, EdB와 배양 6일째의 6d-Bla로 분류한 후 GE용액으로 초자화 동결-용해한 결과, 포배의 생존율은 각각 65.9%, 65.9%, 73.2%, 58.1%로 나타났다.

본 연구결과는 GE용액으로 초자화 동결한 포배의 생존율이 EFS용액으로 초자화 동결한 포배의 생존율보다 유의하게 높게 나타남으로써 인간 포배의 초자화 동결이 가능함을 시사하였다. GE용액으로 포배를 각 발생단계별로 초자화 동결하였을 때 배양 5일째의 EdB, MEB와 EEB군의 생존율이 높았으며 배양 6일째의 6d-Bla군에서는 생존율이 다소 낮았다. 따라서 GE용액으로 배양 5일째 EdB, MEB, EEB를 초자화 동결한다면 인간 포배에서도 완만 동결법에 비해 생존율이 낮지 않으면서 빠르고 간편하며 경제적인 초자화 동결법이 가능할 것으로 기대된다.

참고문헌

- Cohen J, Simons RF, Edwards RG, Fehilly CB and Fishel SB. 1985. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer.*, 2:59-64.
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA and Merzlyman HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21:407-426.
- Ishimori H, Takahashi Y and Kangawa H. 1992. Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. *Theriogenology*, 37:481-487.
- Kahn JA, Von Düring V, Sunde A, Sordal T and Molne K. 1993. The efficacy and efficiency of an *in-vitro* fertilization programme including embryo cryopreservation: A cohort study.

- Hum. Reprod., 8:247-252.
- Kasai M., Komi H, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T and Machida T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in low toxicity vitrification solution without appreciable loss of viability. J. Reprod. Fert., 89:91-97.
- Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Miyaka T, Sakurai T and Machida T. 1992. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. Biol. Reprod., 46:1042-1046.
- Kaufmann RA, Nicollet B, Menezo Y, DuMont M, Hazout A and Servy EJ. 1995. Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. Fertil. Steril., 64:1125-1129.
- Leibo SP and Loskutoff NM. 1993. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. Theriogenology, 39:81-94.
- Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Ysebaert MT and de Kruif A. 1994. Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of *in vitro* produced cattle embryos. Theriogenology, 42:1389-1397.
- Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Bols P, Ysebaert MT and de Kruif A. 1995. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced *in vitro*: effect of developmental stage, two-step addition of cyroprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. J. Reprod. Fert., 103: 33-39.
- Massip A, Van Der Zwalmen P, Scheffen B and Ectors F. 1986. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. Cryo-Letters, 7:270-273.
- Menezo Y, Nicollet B, Herbaut N and Andre D. 1992. Freezing cocultured human blastocysts. Fertil. Steril., 58:977-980.
- Ohta N, Nohara M, Kojimahara T, Ito M, Saito T, Nakahara K, Tezuka N, Saito H and Hiroi M. 1996. Ultrarapid freezing of human embryos by vitrification method: a case of delivery. Jpn. J. Fertil. Steril., 41:276-279.
- Pollard JM and Leibo SP. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. Theriogenology, 41:101-106.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature, 313:573-575.
- Rall WF, Wood MJ, Kirby C and Whittingham DG. 1987. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. J. Reprod. Fert., 80:499-504.
- Saito N, Imai K and Tomizawa M. 1994. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced *in vitro*. Theriogenology, 41:1053-1060.
- Scheffen B, Van Der Zwalmen P and Massip A. 1986. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. Cryo-Letters, 7:260-269.
- Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T and Kasai M. 1993. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by *in vitro* maturation and fertilization. Mol. Reprod. Develop., 34:266-271.
- Takahashi T, Ito M, Ohta N, Saito T, Nakahara K, Saito H and Hiroi M. 1997. Vitrification of human preimplantation stage embryo. J. of Assisted Reproduction and Genetics. Abstr., 14:PP-13-251.
- Trounson A and Mohr L. 1983. Human Pregnancy following cryopreservation thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature, 305:707-709.
- Valdez CA, Abas Mazni O, Takahashi Y, Hishinuma M and Kanagawa H. 1990. Effects of equilibration time, precooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Ther-

- iogenology, 33:627-636.
- Vanderzwalmen P, Delval A, Chatziparasidou A, Bertin G, Ectors F, Lejeune B, Nijis M, Prapas N, Prapas Y, Van Damme B, Zech H and Schoysman R. 1997. Pregnancies after vitrification of human day 5 embryos. Hum Reprod. Abstr., 12:O-198.
- Van Voorhis BJ, Syrop CH, Allen BD, Sparks AE and Stovall DW. 1995. The efficacy and cost effectiveness of embryo cryopreservation compared with other assisted reproductive techniques. Fertil. Steril., 64:647-650.
- Yang NS, Lu KH, Gordon I and Polge C. 1992. Vitrification of blastocysts produced *in vitro*. Theriogenology, 37:326.
- Zhu SE, Kasai M, Otoge H, Sakurai T, Machida T. 1993. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. J. Reprod. Fertil., 98:139-145.
- 허용수, 윤산현, 윤혜균, 조현진, 윤혜진, 이석원, 김은영, 박세필, 이성구, 이원돈, 임진호. 1996. I. Glucose와 Phosphate를 함유하지 않은 배양액에서 Blastocyst 수정란의 발생. 대한불임학회지, 23(2):155-161.
-
- (접수일 : 1999. 5. 4 / 채택일자 : 1999. 7. 18)