

## 인간 포배기 배아의 초자화 동결에 관한 연구: II. 초자화 동결이 포배기 배아의 착상 및 임신에 미치는 영향

대구마리아 산부인과<sup>1</sup>, 서울마리아 산부인과 & 마리아 기초의학 연구소<sup>2</sup>,  
대구대학교 축산학과<sup>3</sup>

김수희<sup>1</sup> · 이상원<sup>1</sup> · 이주희<sup>1</sup> · 강상민<sup>1</sup> · 오희정<sup>1</sup> · 이승민<sup>1</sup> · 이성구<sup>1</sup>  
윤혜균<sup>2</sup> · 윤산현<sup>2</sup> · 박세필<sup>2</sup> · 송해범<sup>3</sup> · 임진호<sup>2</sup>

### Study on the Vitrification of Human Blastocysts: II. Effect of Vitrification on the Implantation and the Pregnancy of Human Blastocysts

Su Hee Kim<sup>1</sup>, Sang Won Lee<sup>1</sup>, Ju Hee Lee<sup>1</sup>, Sang Min Kang<sup>1</sup>, Hee Jeong Oh<sup>1</sup>,  
Seoung Min Lee<sup>1</sup>, Seong Goo Lee<sup>1</sup>, Hye Gyun Yoon<sup>2</sup>, San Hyun Yoon<sup>2</sup>,  
Se Pill Park<sup>2</sup>, Hai Bum Song<sup>3</sup>, Jin Ho Lim<sup>2</sup>

Taegu-Maria Obstetrics/Gynecology<sup>1</sup>, Seoul-Maria Obstetrics/Gynecology & Maria Infertility  
Medical Institute<sup>2</sup>, Department of Animal Science, Taegu University<sup>3</sup>, Korea

**Objective:** This study was conducted to investigate the effect of vitrification on the implantation and the pregnancy of human blastocysts.

**Method:** The transfer of the frozen-thawed blastocysts by the slow freezing or vitrification was performed between January 1998 and July 1999. The zygotes derived from IVF were cocultured with cumulus cells in YS medium containing 20% hFF for 5 days. Two or three of the best blastocysts produced on day 5 were transferred into the uterus, and then supernumerary blastocysts were randomly divided into two groups. One was frozen by slow freezing and the other was frozen by vitrification method. The slow freezing procedure was performed in two steps (5% glycerol and 9% glycerol + 0.2 M sucrose for 10 min, respectively) using programmed freezer (-2°C/min to -7°C, manual seeding at -7°C, -0.3°C/min to -38°C and plunged into LN<sub>2</sub>). The blastocysts frozen by slow freezing were thawed at 36°C then removed glycerol in 7 steps. The vitrification procedure was performed in three steps (10% glycerol for 5 min, 10% glycerol + 20% ethylene glycol for 5 min, 25% glycerol + 25% ethylene glycol and directly LN<sub>2</sub> within 1 min). The blastocysts frozen by vitrification were thawed at 20°C water then removed cryoprotectant in 3 steps. In each group, thawed blastocysts were cocultured with cumulus cells in YS medium containing 20% hFF for 18h and transferred into the uterus. The implantation rate was evaluated per transferred blastocysts and the pregnancy rate was evaluated per transfers.

**Results:** The survival rate of vitrified group (74.5%) was higher than slow freezing group (68.0%), but not significant. When 98 thawed blastocysts of vitrification were transferred in 40 cycles, 19 pregnancies (clinical pregnancy rate; 47.5%) were established. One miscarriage occurred in the eighth week of pregnancy (ongoing pregnancy rate; 45.0%). 7 pregnancies were ongoing, 11 pregnancies went to term, and 16 healthy infants were born. The Implantation rate was 31.6%. These results were higher than those obtained by the slow freezing (clinical pregnancy rate; 40.3%,

ongoing pregnancy rate; 32.5% and implantation rate; 25.3%), but not significant.

**Conclusion:** Vitrification is a simple, quick and economical method when compared to slow freezing. It will be chosen as a good method of human embryo freezing in IVF-ET programs.

**Key Words:** Vitrification, Slow freezing, Human blastocyst embryos

현재 Human IVF-ET programs에서 잉여 배아를 동결하는 것은 필수적이며, 주로 전핵기의 배아와 2-에서 8-세포기의 초기 분열시기의 배아를 1,2-propanediol (PROH)을 사용하여 완만 동결하는 방법이 가장 보편적으로 사용되고 있다.<sup>1-5</sup> 그러나 최근에는 배양액과 배양조건 등의 개선으로 포배기까지 배아의 발생이 가능하여졌으며 포배기 배아 (이후 '포배'라 함) 이식과 동결이 많이 연구되고 있다.<sup>6-9</sup> 포배의 동결은 초기 분열 배아의 동결보다 생존력이 높고 생리학적으로 자궁의 환경에 적합하기 때문에 착상율과 임신율을 향상시킬 수 있으며 1~3개의 적은 수의 포배만을 이식함으로 다태 임신을 감소시킬 수 있는 장점이 있다.<sup>6,9,10</sup>

배아의 동결보존방법은 세포 내의 자유수를 서서히 탈수시키는 완만 동결방법 (slow freezing method)과 고농도의 동결액을 사용하여 빙결정 없이 실온에서 직접 액체질소에 침지하는 초자화 동결방법 (vitrification)으로 구분할 수 있다. 초자화 동결은 기존의 자동 세포 동결기를 이용한 완만 동결방법과는 달리 빙결정이 없으므로 배아를 용해한 후 세포의 생존성에 효과적이며, 그 과정이 매우 간편하고 빠르며 경제적인 장점이 있어 동물에서는 널리 이용되고 있으며,<sup>11-16</sup> 최근에 인간 배아의 초자화 동결에 대한 연구도 많이 보고되고 있다.<sup>17-21</sup>

이에 본 원에서는 인간 포배기 배아의 초자화 동결 가능성을 규명하고자 동결액과 발생단계에 따라 초자화 동결-용해한 후 포배의 생존율을 보고한 바 있으며,<sup>22</sup> 그 자료를 바탕으로 Human IVF-ET programs에서 초자화 동결을 실시하였다. 초자화 동결한 포배의 이식을 실시하여 임신율 및 착상율을 완만 동결한 포배의 이식군과 비교·조사하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

본 연구는 1998년 1월부터 1999년 7월까지 본

원에서 시험관아기시술을 받은 환자 중 완만 동결한 포배의 이식과 초자화 동결한 포배의 이식을 받은 환자를 대상으로 실시하였다.

### 2. 과배란 유도 및 난자채취

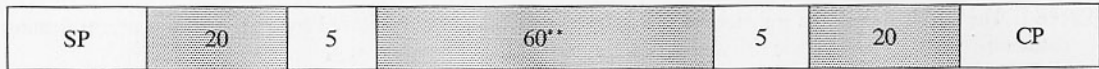
과배란은 GnRH-agonist (Buserelin)의 장·단기 투여 하에 FSH/hMG를 이용하여 유도하였으며, 직경이 17~18 mm 이상인 난포가 2개 이상 확인될 경우에 10,000 IU의 hCG를 투여하여 성숙을 유도하였다. 난자는 hCG 투여 후 36~38시간 후에 질식 초음파를 이용하여 난포를 흡인하여 채취하였으며, 채취된 난자는 성숙도에 따라 분류한 후 10% hFF (human Follicular Fluid)를 첨가한 YS 배양액 (허 등<sup>23</sup>)으로 옮겨서 수정능력을 획득할 때까지 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 3. 배양액

체외배양에 사용한 YS 배양액은 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM NaHCO<sub>3</sub> 및 5 mM KHCO<sub>3</sub>가 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 10 ml antibiotics antimycotic solution이 첨가되었으며 MEM수준의 non-essential amino acids와 vitamins 및 RPMI1640의 1/2수준의 amino acids가 첨가되었다 (허 등<sup>23</sup>). 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  $1 \times 10^5$  cells/ml 고활력 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 난자채취 후 6일째까지 수정란을 배양하였다.



**Figure 1a.** Configuration of 0.25 ml straw loaded before slow-freezing. unit (mm); **SP**: sealing powder, **■**: 9% glycerol + 0.2 M sucrose, **\*\***: embryo column, **□**: air, **CP**: cotton plug.



**Figure 1b.** Configuration of 0.25 ml straw loaded before vitrification. unit (mm); **HS&SP**: heat sealing & sealing powder, **■**: 25% glycerol + 25% ethylene glycol, **\*\***: embryo column, **□**: air, **■**: 0.5 M sucrose, **CP&HS**: cotton plug & heat sealing.

## 5. 동결 및 융해

동결과 융해는 모두 20% hFF가 첨가된 PBS 용액을 기본용액으로 사용하여 실온 (25℃)에서 실시하였다.

### 1) 완만 동결 및 융해

완만 동결은 Menezo 등<sup>9</sup>의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 포배의 동결은 PBS 기본용액, 5% glycerol, 9% glycerol + 0.2 M sucrose의 혼합액에 각각 10분씩 노출시켜 평형 (equilibration)을 유도한 후 0.25 ml plastic straw (IVM Co, France)에 Figure 1a와 같이 장진하였다. 장진한 straw는 곧바로 자동 세포 동결기 (Planner, Model KRYO-10 Series III)에 넣어 완만 동결을 실시하였다 (-7℃까지 -2℃/min, -7℃에서 seeding, -38℃까지 -0.3℃/min). 포배의 융해는 동결된 straw를 37℃에서 6~7초간 녹여서 동결 보호제를 glycerol 농도에 따라 7단계로 제거하였다. 5% glycerol + 0.4 M sucrose 용액에서 5분간, 4% glycerol + 0.2 M sucrose 용액에서 6분간, 3% glycerol + 0.2 M sucrose 용액에서 7분간, 2% glycerol + 0.2 M sucrose 용액에서 7분간, 1% glycerol + 0.2 M sucrose 용액에서 6분간, 0.2M sucrose 용액에서 2분간 및 PBS 용액에서 5분간 평형하면서 동결 보호제를 제거하였다.

### 2) 초자화 동결 및 융해

초자화 동결은 Yang 등<sup>16</sup>의 방법을 약간 변형하여 3단계로 실시하였다. 1단계로 10% glycerol 혼합액에서 5분간, 2단계로 10% glycerol + 20% ethylene glycol 혼합액에서 5분간 평형을 실시한 후 3단계로 25% glycerol + 25% ethylene glycol 혼합액 (GE)으로 옮겨서 Figure 1b와 같이 straw 내에 2~3개의 포배를 흡입하고 straw의 cotton plug 방향을 약 5 cm 가량 액체질소에 침지하였다가 5초

후 완전히 액체질소에 넣어 동결 보존하였다. 이때 3단계 평형에서 액체질소까지 straw를 침지하는데는 1분이 넘지 않도록 하였다. 동결된 포배의 융해는 straw를 액체질소에서 꺼내어 공기 중에 5초간 평형 후 20~22℃ 물에서 10초간 녹여서 3단계로 동결 보호제를 제거하였다. 먼저 빈 dish에 straw의 내용물을 부어서 5분간, 0.25 M sucrose 용액에서 5분간, PBS 용액에서 5분간 평형하면서 동결 보호제를 제거하였다.

## 6. 생존율의 판정

융해할 때 각각의 동결 보호제를 제거한 후, 20% hFF가 첨가된 YS 성장 배양액으로 2~3회 세척하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 난구세포와 18시간동안 공배양을 실시하여 다시 팽창된 포배만을 정상적으로 생존한 것으로 간주하였다.

## 7. 포배의 이식

동결-융해한 후 이식한 포배의 체내에서의 발생을 관찰하기 위하여 같은 기간에 완만 동결한 포배의 이식과 초자화 동결한 포배의 이식을 실시하여 생존율, 임신율 및 착상율을 비교·조사하였다. 동결한 포배의 이식은 환자의 자연배란 주기에 Urine LH와 초음파를 이용하여 배란 4~5일째에 실시하였으며 동결된 포배를 융해한 후 배양 18~21시간에 정상적인 형태의 생존 배아를 선별하여 이식하였다.

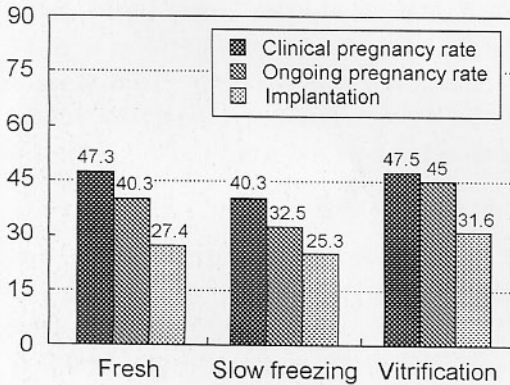
## 8. 임신율과 착상율의 판정

동결한 포배의 이식을 실시한 다음 6~7주 후 질식 초음파검사를 이용하여 태낭 (gestation sac; G-sac)과 심장박동 태아 (fetal heart beat; FHB)가 관찰되면 임상임신 (clinical pregnancy)으로 판정

**Table 1.** The survival rate and transfer number of the blastocysts frozen-thawed by slow freezing or vitrification method

	Blastocyst transfer		
	Fresh (control)	Slow freezing	Vitrification
No. of cycles	573	216	42
No. of transfer cycles	541	206	40
No. of 2PNs	5558	-	-
No. of blastocysts	3266	790	141
No. (%) of survived embryos	-	537 (68.0) <sup>a</sup>	105 (74.5) <sup>a</sup>
No. of transferred embryos	1298	487	98
Mean of transfer embryos	2.4	2.4	2.5

<sup>a</sup> not significant



**Figure 2.** The pregnancy and implantation rates of the blastocysts frozen-thawed by slow freezing or vitrification method.

하였으며, 이식한 포배의 수 중 관찰된 심장박동 태아의 수로 착상율을 조사하였으며, 임신이 10주 이상 진행된 환자를 조사하여 진행임신 (ongoing pregnancy)으로 판정하였다.

### 9. 통계적 분석

통계적 유의성 검정은 SAS (statistical analysis system)를 이용한 chi-square test에 의해서 분석하였고,  $p < 0.05$ 인 경우를 유의하다고 판정하였다.

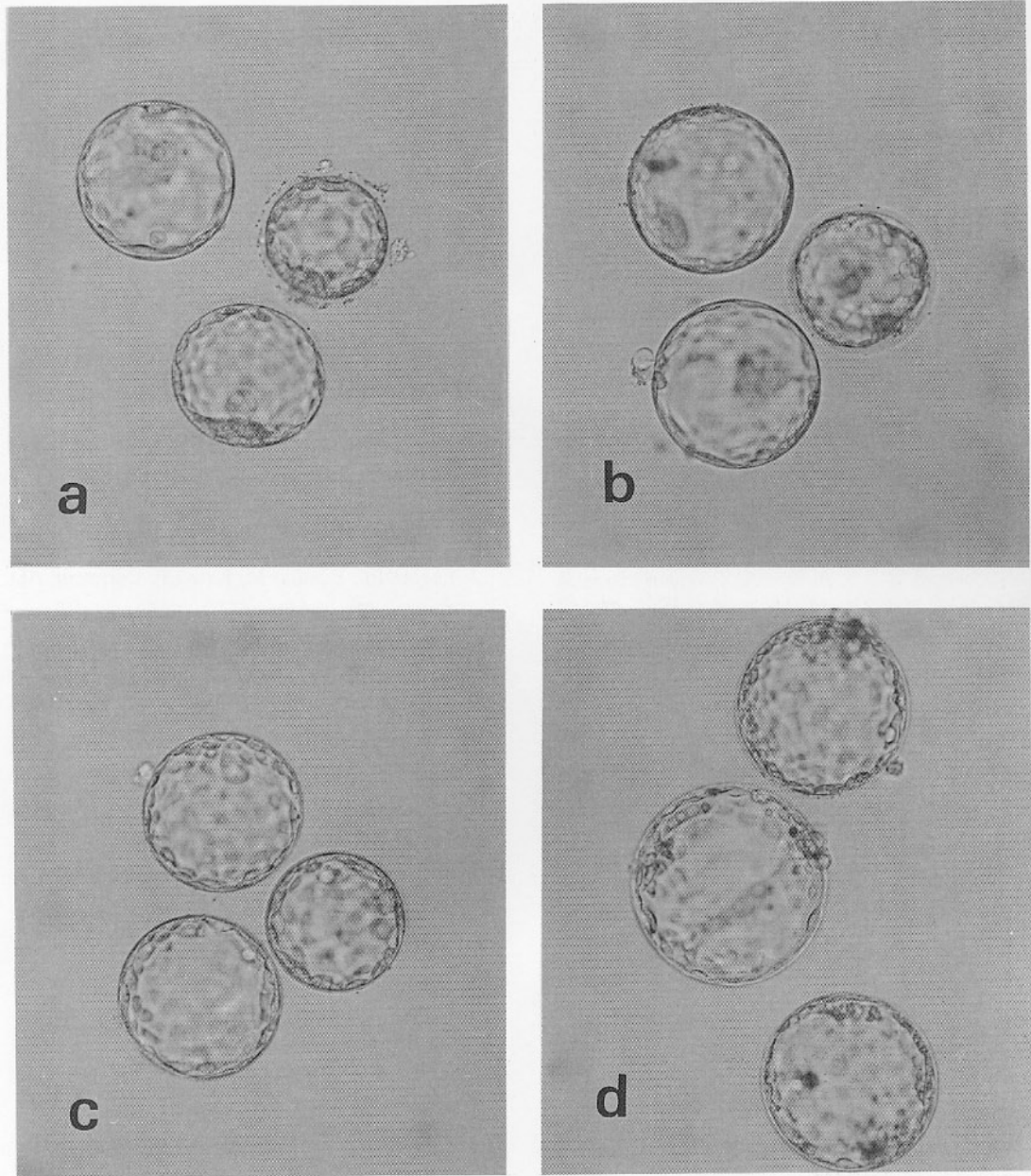
## 결 과

1998년 1월 ~ 1999년 7월까지 본원에서 실시한

Human IVF-ET programs중 완만 동결한 포배의 이식군과 초자화 동결한 포배의 이식군의 생존율은 Table 1과 같았으며 임상임신율, 진행임신율 및 착상율을 비교한 결과는 Figure 2와 같았다. 초자화 동결한 포배의 이식군의 생존율 (74.5%)은 완만 동결한 포배의 이식군의 생존율 (68.0%)보다 다소 높게 나타났으나 유의한 차이는 없었다. 완만 동결한 포배의 이식군과 초자화 동결한 포배의 이식군의 임상임신율은 각각 40.3%와 47.5%이었고, 진행임신율은 각각 32.5%와 45.0%이었으며, 포배의 착상율은 각각 25.3%와 31.6%으로 초자화 동결한 포배의 이식군이 완만 동결한 포배의 이식군보다 임상임신율, 진행임신율 및 착상율이 다소 높게 나타났으나 그룹간에 유의한 차이는 없었다. Figure 3은 완만 동결 및 초자화 동결을 실시하기 전과 용해 후의 포배의 상태를 관찰한 것으로서 동결과 용해의 과정을 거치는 동안 배아의 상태가 거의 없었던 것으로 관찰되었다.

## 고 찰

Human IVF-ET programs에서 완만 동결의 단점을 보완하기 위해서 초급속 동결 (ultrarapid freezing)과 초자화 동결 (vitrification) 등의 방법이 연구되고 있지만 일반화되지는 않은 실정이다. 초급속 동결법은 세포내·외를 각각 보호하는 두 가지 동결 보호제를 이용하여 동결하기 전에 세포 내부의 수분을 탈수시키는 방법으로 Trounson 등에 의해 생쥐 배아<sup>24</sup>와 인간 배아<sup>25,26</sup>를 이용한 동



**Figure 3.** Photographs of human blastocysts before freezing and after thawing ( $\times 100$ ). **a:** expanding blastocysts before slow freezing, **b:** re-expanding blastocysts survived through slow freezing and thawing, **c:** expanding blastocysts before vitrification, **d:** re-expanding blastocysts survived through vitrification and thawing.

결법이 처음으로 소개되었다. 최근에 초급속 동결에 의한 배아의 생존율과 임신보고를 살펴보면, Gordts 등<sup>27</sup>은 70%의 생존율과 20%의 임신율을, Feichtinger 등<sup>28</sup>은 61%의 생존율과 9.8%의 임신율을, Lai 등<sup>29</sup>은 75%의 생존율과 16%의 임신

율을 보고하였는데, 주로 전핵기에서 8-세포기사이의 배아를 2.5~3.5 M DMSO와 0.25~0.3 M sucrose를 첨가한 동결액에 2~3분간 평형시킨 후 액체질소에 침지하여 초급속 동결을 실시한 것이다.

초자화 동결은 각종 동결 보호제를 혼합하여 세포 내·외에 빙결정을 방지하면서 동결하는 방법으로 Rall과 Fahy 등<sup>30</sup>이 생쥐 배아를 이용하여 초자화 동결을 처음으로 보고하였다. 최근에 Kasai 등<sup>15</sup>이 ethylene glycol, ficoll, sucrose의 혼합액(EFS)으로 생쥐 배아를 초자화 동결하여 높은 생존율을 보고한 바 있으며 현재 동물에서는 초자화 동결이 흔히 사용되는 동결법이다.<sup>11~16</sup> 인간 배아의 초자화 동결은 Ohta 등<sup>21</sup>과 Takahashi 등<sup>20</sup>이 ethylene glycol, ficoll, threhalose의 혼합액으로 8-에서 16-세포기의 배아를 초자화 동결한 후 임신과 분만 등을 보고한 바 있으나, 고농도의 동결 보호제의 독성을 줄이기 위하여 4°C의 조건에서 동결해야 하는 번거로움이 있었다. 최근에 Mukaida 등<sup>19</sup>이 EFS 혼합액으로 4-에서 8-세포기의 인간 배아를 초자화 동결하여 17~25%의 임신율과 분만사례를 보고한 바 있으며, Vanderzwalmen 등<sup>17,18</sup>은 EFS 혼합액을 이용하여 인간 포배를 동결한 후 높은 생존율과 임신율을 보고한 바 있으나 인간 배아의 초자화 동결은 아직 초기 단계이며 일반화되지 않은 실정이다.

Kim 등<sup>22</sup>은 EFS 용액<sup>11</sup>과 GE 용액<sup>16</sup>으로 인간 포배를 초자화 동결-융해하였을 때 GE군의 생존율(64.4%)이 EFS군의 생존율(5.7%)보다 유의하게 높았으며, 포배의 발생단계에 따라 4단계로 나누어 초자화 동결하였을 때 배양 5일째의 완전팽윤 포배, 초기팽윤 포배 및 중기팽윤 포배의 생존율(각각 73.2%, 65.9%, 65.9%)이 배양 6일째의 포배의 생존율(58.1%)보다 높았다고 보고한 바 있다. 이에 본 연구는 Human IVF-ET programs에서 GE 용액을 이용하여 배양 5일째의 포배를 초자화 동결하였으며, 이들을 융해하여 이식을 실시하고 생존율, 임신율 및 착상율을 완만 동결한 포배의 이식군과 비교·조사하였다. 완만 동결한 포배의 이식군과 초자화 동결한 포배의 이식군의 생존율은 각각 68.0%와 74.5%였으며, 임상임신율은 각각 40.3%와 47.5%였고 착상율은 각각 25.3%와 31.6%였다. 초자화 동결한 포배의 이식군이 완만 동결한 포배의 이식군보다 생존율, 임신율 및 착상율이 높았으나 유의한 차이는 없었다. 또한 1998년 1월부터 1999년 7월까지 초자화 동결한 포배의 이식을 40명의 환자에게 실시한 결과 19명이 임신하였으며, 그 중 1명의 환자에서 임신 8주째에 태아가 유산되었고 현재 11명의 환자에서 16명의 건강한 아기가 태어났으며 7명의 환자는

임신이 진행중이다.

이상의 결과에서 초자화 동결한 포배는 자궁에 이식된 후 정상적으로 발생한다는 것이 확인되었으며, 초자화 동결이 완만 동결에 비해 생존율이 낮지 않으면서 빠르고 간편하며 경제적인 동결 방법이므로 Human IVF-ET programs에서 초자화 동결방법의 선택이 점점 더 증가할 것으로 기대된다.

## 참 고 문 헌

1. Veek LL, Amundson CH, Brothman LJ, De-Scisciolo C, Maloney MK, Muasher SJ, et al. Significantly higher pregnancy rate per cycle through cryopreservation and thaw of pronucleate stage oocytes. *Fertil Steril* 1993; 59: 1202-7.
2. Fugger EF, Bustillo M, Katz LP, Dorfmann AD, Bender SD, Schulman JD. Embryonic development and pregnancy from fresh and cryopreserved sibling pronucleate human zygotes. *Fertil Steril* 1988; 50: 273-8.
3. Cohen J, De Vane GW, Elsner CW, Fehilly CB, Kort HI, Massey JB, et al. Cryopreservation of zygotes and early cleaved human embryos. *Fertil Steril* 1988; 49: 283-9.
4. Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, et al. High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 1986; 46: 268-72.
5. Lassalle B, Testart J, Renard JP. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propanediol. *Fertil Steril* 1985; 44: 645-51.
6. Cho HJ, Yoon SH, Yoon HG, Lee WD, Lee SW, Lee GU, et al. Viable high pregnancies obtained from frozen-thawed blastocysts: experience of more than 350 transfer cycles. 대한불임학회 제 34차 추계학술대회 1997; p.55-6.
7. Kaufmann RA, Nicolle B, Menezo Y, DuMont M, Hazout A, Servy EJ. Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. *Fertil Steril* 1995; 64: 1125-9.
8. Nakayama T, Goto Y, Kanzaki H, Takabatake K, Himeno T, Takakura K, et al. Cryopreser-

- vation of human blastocysts. IX World Congress on In Vitro Fertilization and Alternated Assisted Reproduction; 1995 April 3-7; Vienna, Austria. p.451-4.
9. Menezo Y, Nicollet B, Herbaut N, Andre D. Freezing cocultured human blastocysts. *Fertil Steril* 1992; 58: 977-80.
  10. Bongso A. Blastocyst transfer and freezing: Can this help us to improve the success of assisted reproduction? *Singapore J of Obstet Gynecol* 1995; 26(1): 13-7.
  11. Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Bols P, Ysebaert MT, de Kruif A. 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* 1995; 103: 33-9.
  12. Saito N, Imai K, Tomizawa M. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology* 1994; 41: 1053-60.
  13. Zhu SE, Kasai M, Otoge H, Sakurai T, Machida T. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J Reprod Fert* 1993; 98: 139-45.
  14. Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Miyaka T, Sakurai T, Machida T. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biol Reprod* 1992; 46: 1042-6.
  15. Kasai M, Komi H, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fert* 1990; 89: 91-7.
  16. Yang NS, Lu KH, Gordon I, Polge C. Vitrification of blastocysts produced in vitro. *Theriogenology* 1992; 37: 326.
  17. Vanderzwalmen P, Zech H, Prapas Y, Prapas N, Nijs M, Vandamme B. Pregnancy and implantation rates after transfers of fresh and vitrified embryos on day 4 or 5. *Proceedings of the 11th World Congress on In Vitro Fertilization and Human Reproduction Genetics*; 1999 May 9-14; Sydney, Australia. O-128.
  18. Vanderzwalmen P, Delval A, Chatziparasidou A, Bertin G, Ectors F, Lejeune B, et al. Pregnancies after vitrification of human day 5 embryos. *Hum Reprod* 1997; 12: Abstract book. O-198.
  19. Mukaida T, Wada S, Nakamura S, Takahashi K, Kasai M. Pregnancy and delivery after vitrification of human early stage embryos. *Proceedings of the 11th World Congress on In Vitro Fertilization and Human Reproduction Genetics*; 1999 May 9-14; Sydney, Australia. O-127.
  20. Takahashi T, Ito M, Ohta N, Saito T, Nakahara K, Saito H, et al. Vitrification of human preimplantation stage embryo, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 1997; 14(5): Supplement. PP-13-251.
  21. Ohta N, Nohara M, Kojimahara T, Ito M, Saito T, Nakahara K, et al. Ultrarapid freezing of human embryos by vitrification method: a case of delivery. *Jpn J Fertil Steril* 1996; 41: 276-9.
  22. Kim SH, Lee SW, Lee SK, Song HB. Cryopreservation of human blastocysts by vitrification. *Proceeding of the 8th World Conference on Animal Production*; 1998 June 28-July 4; Seoul, Korea. PB1-8.
  23. 허용수, 윤산현, 윤혜균, 조현진, 윤혜진, 이석원 등. I. Glucose와 Phosphate를 함유하지 않은 배양액에서 Blastocyst 수정란의 발생. *대한불임학회지* 1996; 23(2): 155-61.
  24. Trounson A, Peura A, Kirby C. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 1987; 48: 843-50.
  25. Trounson A, Peura A, Freemann L, Kirby C. Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos. *Fertil Steril* 1988; 49: 822-6.
  26. Trounson A, Sjoblom P. Cleavage and development of human embryos in vitro after ultrarapid freezing and thawing. *Fertil Steril* 1988; 50: 373-6.
  27. Gordts S, Roziars P, Campo R, Noto V. Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos. *Fertil Steril* 1990;

- 53: 469-72.
28. Feichtinger W, Hochfellner C, Ferstl U. Clinical experience with ultrarapid freezing of embryos. *Hum Reprod* 1991; 6: 735-6.
29. Lai ACH, Lin BPH, Chang CC, Tsai HD, Hwang VWS, Lo HY. Pregnancies after transfer of ultrarapidly frozen human embryos. *J Assist Reprod Gen* 1996; 13: 625-8.
30. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-5.
-