

vitrification method using EFS 40 will be suitable for blastocysts produced *in vitro*.

- 16 -

## 소와 면양의 배아간세포 개발에 관한 연구

한국과학기술원 부설 생명공학연구소  
Department of Animal Science,  
Iowa State University, Ames, USA\*

류재웅 · C. R. Youngs\* · 한용만 · 이경광

배아간세포(embryonic stem cell, ES 세포)는 포유동물의 수정란으로부터 유래된 것으로 미분화 상태에서 무한히 증식할 수 있는 전능성을 지닌 세포이다. 생쥐에 있어서는 ES 세포주가 이미 확립되어 이를 이용한 질환모델동물개발 연구가 활발히 수행되고 있다. 그리고 일부 가축의 ES 유사세포 개발 연구가 보고되고 있지만, 이들 ES 세포주의 이용에 관한 연구보고는 아직 미미한 실정이다. 가축에 있어서 ES 세포주의 개발은 유용가축의 개량에 지대한 공헌을 할 것으로 기대된다. 이에 본 연구에서는 소와 면양의 수정란으로부터 배아간세포의 개발을 시도하였다.

도축장에서 채취된 소 난소의 2~6mm 가시 난포로부터 난포란을 회수한 다음, 10% FCS 가 첨가된 TCM199 배양액을 사용하여 22~24 시간 체외성숙을 실시하였다. 이들 난포란은 동결정자를 사용하여 10mM caffeine과 10µg/ml heparin이 첨가된 BO 배양액에서 6시간 체외수정을 유도하였다. 체외수정된 난자를 4~9일간 난구세포와 공동배양하여 상실배기에서 부화배반포기까지 발달시킨 다음, 이들 수정란을 실험에 공시하였다. 면양의 수정란을 얻기 위하여 발정주기 12일째 1200 IU PMSG를 각각의 암컷에 투여하여 다배란을 유도하였고 발정정후를 보이는 면양은 수컷과 아침, 저녁으로 자연교미를 실시한 후, 7~9일째 자궁으로부터 배반포기 배를 회수하였다.

ES 세포주 개발을 위한 배양액으로는 10%

FCS, 2mM L-glutamine, 0.1mM β-mercaptoethanol, 20µg/ml insulin이 첨가된 DMEM을 사용하였으며, mitomycin-C를 3시간 처리한 STO 단층배양세포에서 ICM 세포를 배양하였다. 또한 ICM 만을 직접 분리한 실험군과 Ionophore를 처리한 후 ICM을 분리한 실험군에서의 ES 유사세포 개발빈도를 비교 검토하였다.

소 및 면양의 수정란으로부터 분리한 내부세포괴를 STO 단층배양세포에서 5~10일간 배양한 후, ICM 만을 분리하여 신선한 STO 단층배양세포에서 반복하여 계대배양을 실시하였다. 그 결과, 소와 면양에 있어서 5~23대의 ES 유사세포주를 확립할 수 있었다. 이들 ES 유사세포에 대해 alkaline phosphatase(AP) 염색을 실시한 결과, 적색의 미분화 AP 양성반응이 확인되었다. 15~23대 계대배양한 소 ES 유사세포의 핵형을 분석한 결과, 70% 이상의 세포들이 정상적인 염색체수를 유지하고 있었으며, 소 23대 및 면양 20대 계대배양 ES 유사세포들의 체외 배분화 형성도 유도되었다. 이와 같이 소 및 면양의 ES 유사세포주에서 ES 세포주의 특성인 다능성을 확인할 수 있었다. 또한 ES 유사세포주 개발에 있어서 직접적으로 ICM 만을 분리하는 방법보다는 Inopohore의 처리후 ICM을 분리하여 배양한 실험군에서 유의적으로 높은 ES 유사세포 형성빈도를 보여주었다 ( $P<0.05$ ).

- 17 -

## 난포액이 생쥐난자의 체외성숙 및 시험관아기 임신율에 미치는 효과

한나여성의원, 건국대학교 동물자원연구센터\*

지희준 · 구정진 · 김동훈 · 장상식 · 정길생\*

시험관아기시술시 난자 및 수정란의 배양에 단백질원으로 널리 사용되어왔던 계대혈청은 그 준비과정 및 사용에 따르는 양적, 질적인 제한과 전염성질환 등의 감염위험성으로 다른 물질로

대체되어가고있다. 이에 본 연구는 시험관아기 시술과정에서 회수가 용이하고 보다 생체내 조건과 가까운 배양조건을 제공할 수 있다는 점에서 인간난포액을 단백질원으로 사용하기 위해 생쥐난자를 이용한 실험을 통해 간접적으로 난포액의 이용가능성을 검토하였고, 시험관아기시술에 이용하였을 경우 제대혈청의 사용에 비해 임신율향상에 효과가 있는지를 조사하였다.

생쥐난포난은 PMSG주사 후 48시간째에 적출한 난소로 부터 회수하였으며 hypoxanthine, adenosine 그리고 dbcAMP등의 핵성숙억제물질이 함유된 Modified Whittingam's T6 배양액에서 배양함으로써 핵성숙억제를 유지하였고, 제대혈청과 난포액을 첨가하여 핵성숙재개를 유도함으로써 이들의 핵성숙촉진효과를 비교하였다. 또한 호르몬 분석과 전기영동을 통해 이들 두 물질의 구성성분을 비교조사하였다. 한편, 시험관아기시술은 GnRH analogue, hMG를 이용하여 과배란을 유도하였고 난자성숙 및 수정란 체외 배양액으로는 TCM-199, 정자세척용으로는 Ham's F-10 배양액을 각각 사용하였으며 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

핵성숙억제물질에 의해 핵성숙이 억제된 생쥐난자의 핵성숙을 재개시키는데 있어서 제대혈청(GVBD 35.2%) 보다는 난포액(70.5%)이 유의한 효과를 나타냈으며, 이러한 효과는 난포액내의 구성성분 중 미소분자량 보다는 거대분자량의 물질들에서 보다 강하게 나타난다는 것을 확인하였다. 또한 이들 두 물질의 구성성분을 비교한 결과, 핵성숙 및 배발달의 촉진효과를 나타내는 Gonadotropin과 Estrogen등의 호르몬이 난포액내에 보다 유의하게 높은 농도로 함유되어 있음을 확인하였다. 따라서 생쥐난자를 이용한 실험을 통해 난자의 수정적기인 MII 단계까지의 체외성숙에 있어서 제대혈청 보다는 난포액이 보다 효율적이라는 것을 확인하였다. 한편, 지난 94,9월 부터 95,9월까지 본원에서 시술한 시험관아기 298예에서 얻은 결과의 통계적처리에 의하면 단백질원으로 제대혈청을 사용하였을 때(30.0%) 보다 난포액을 사용하였을 경우(45.6%) 약 15%이상의 유의한 임신율의 증가를 나타냈다. 또한 난포액을 이용하였을 경우 미세수정을 이용한 시험관아기시술 역시 45.4%의

높은 임신율을 나타냈으며, 임신유지율은 제대혈청을 사용한 경우(18.5%) 보다 2배에 가까운 36.8%의 높은 임신유지율을 나타냈다. 따라서 난포액은 난자의 체외성숙과 체외발달 및 착상율을 향상시키는데 효과적이므로 시험관아기시술시 제대혈청 보다는 난포액을 단백질원으로 사용하는 것이 바람직하다고 하겠다.

- 18 -

## 난자 및 배아 성숙이 시험관 아기 시술 성공율에 미치는 영향

전남대학교 의과대학 산부인과학교실

김재훈 · 박현정 · 권영숙 · 이여일

시험관아기 시술에 있어서 임신율에 영향을 미치는 요소로는 불임의 원인, 부인 및 남편의 나이, 난소과배란 유도방법, 채취난자의 수, 난자성숙도, 배아성숙도, 수정된 배아수, 누적배아지수, 자궁내 이식된 배아수 등 많은 것이 있다. 그중 난자 및 배아의 성숙은 성공의 관건인 착상율에 지대한 기여를 함으로 가장 중요한 인자 중의 하나로 볼 수 있다.

본 연구는 1991년 11월부터 1995년 5월까지 전남대학교 산부인과 불임클리닉에서 시행한 시험관아기시술중 난관폐색 및 선행양측난관절제술을 시행한 환자를 대상으로 시행한 146회의 체외수정시술에 대해서 난자성숙, 성숙배아수 및 이식된 배아수, 누적배아지수가 임신율에 미치는 영향을 FSH/HMG과, GnRH/FSH/HMG의 두가지 난소과배란유도 방법에 따라 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 두가지 난소 과배란 방법에 따른 임신율의 차이는 보이지 않았다.
2. 채취된 평균 난자수는 두가지 난소과배란 유도 방법에서 유의한 차이는 보이지 않았다.
3. 난자 성숙이 좋을수록 두가지 난소과배란 유도 방법에서 모두 수정율이 증가하였다 ( $P < 0.01$ ).
4. 자궁내 이식된 배아수의 평균이 임신군에