

dition were transferred to uterus of 2 pseudopregnant recipients, 1 recipient was pregnant and then born 1 live young.

Conclusion: This result demonstrates that *in vitro* culture system of preantral follicles can be used efficiently as another method to supply mouse oocyte.

B-8 CHO 세포주와 공배양을 통한 미성숙 돼지 난자의 성장과 성숙을 향상

미즈메디병원 불임의학연구소

도병록 · 전일경 · 윤수정 · 김 철 · 백혜란 · 조정현 · 윤현수 · 노성일

서 론: 인간을 포함한 대동물의 난자는 시상하부-뇌하수체-난소를 축으로 하는 내분비 조절과 난소내의 국부 조절인자들의 작용으로 난소내에서 충분한 성장이 이루어진 후 성숙하게 된다. 인간의 보조생식술 시행 시 자연주기에 채취된 미성숙 난자는 과배란 유도법으로 얻은 난자에 비하여 성숙율과 수정율이 낮고, 직경 90 μm 이하의 난자는 성숙이 불가능한 것으로 보고되고 있다.

연구목적: 본 연구는 사람 미성숙 난자의 체외 성숙률을 향상시키기 위한 기초연구로 돼지의 미성숙 난자에서 체외 성장과정을 거친 성숙 유도과정과, 난자와 CHO 세포의 공배양법의 효용성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법: 직경 5 mm 이하의 돼지 난포로부터 얻은 3097개의 미성숙 난자를 성장 배양액과 성숙 배양액에 각각 24시간씩 혹은 각 배양액 단독으로 48시간 배양하여 성숙률을 조사하였다. 성장 배양액은 TCM-199에 2.5 mIU/ml 사람의 고순도 FSH, 0.23 mM/L pyruvic acid, 5.35 $\mu\text{g/ml}$ linoleic acid, 2.0 ng/ml ascorbic acid, 5 $\mu\text{g/ml}$ ITS (insulin, transferrin, selenium), 10% fetal bovine serum을 첨가하여 이용하였다. 성숙 배양액은 TCM-199에 1 $\mu\text{g/ml}$ cystein, 25 IU/ml 사람의 고순도 FSH, 1 mg/ml E_2 그리고 10% 돼지 난포액이 첨가하여 이용하였으며, CHO cell monolayer가 있거나 또는 없는 조건에서 39 C, 5% CO_2 가 공급되는 배양조건을 유지하였다. 배양을 마친 각 군의 난자는 0.5% glutaraldehyde 용액에 고정하여, hochest 33258 (200 $\mu\text{g/ml}$)로 염색한 후 형광현미경으로 난자의 성숙 정도를 판단하여 다음의 결과를 얻었다.

결 과:

Table 1. Maturation rate of immature oocyte during *in vitro* culture in porcine

Experimental groups		M II (%)	GV (%)	Abnormal (%)
미배양 대조군	W/o culture	0.0	93.3 ^d	6.8
성숙 배양군 (48 hrs)	W/o co-culture	34.4 ^a	22.6	14.4
성장 배양군 (48 hrs)	W/o co-culture	0.0	75.3 ^e	13.3
	W/ co-culture	8.7	46.9 ^f	6.1
성장 배양 (24 hrs) 및 성숙 배양군 (24 hrs)	W/o co-culture	43.6 ^b	18.6	17.9
	W/ co-culture	52.4 ^c	9.8	20.1

^b vs. (^a, ^c), $p < 0.05$; ^a vs. ^c, ^d vs. (^e, ^f), ^e vs. ^f, $p < 0.0001$

결 론: 이상의 결과로 보아 CHO 세포주 공배양에 의한 돼지 난자의 성장 배양 후 난자의 성숙 배양은 미성숙 난자의 성숙율을 향상시킬 수 있었으며, 인간의 미성숙 난자를 이용한 시험관아기 기술에 적용하면 난자의 성숙율을 높여 임신율을 향상시킬 수 있는 방법으로 사용할 수 있을 것으로 보인다.

B-9 전통적인 IVF-ET Program에서 회수된 미성숙 난자와 새로운 IVM/F-ET Program에서 회수된 미성숙 난자의 체외성숙에 관한 연구

¹마리아 병원, ²고려대학교 응용동물과학과

양성호¹ · 박성진¹ · 문정희¹ · 현창섭¹ · 손원영¹ · 이석원¹
윤산현¹ · 고 용² · 임진호¹

목 적: 본 연구는 전통적인 IVF-ET program에서 회수된 미성숙 난자와 다낭성 난포증후군의 환자들을 대상으로 실시한 새로운 IVM/F-ET program에서 회수된 미성숙 난자의 체외성숙과 난구세포들의 형성 pattern에 따른 FSH-R (follicle stimulating hormone receptor), LH-R (luteinizing hormone receptor) 및 EGF-R (epidermal growth factor receptor)의 mRNA 발현 여부를 비교·조사하기 위하여 시행하였다.

대상 및 방법: 본 연구에서 이용된 미성숙 난자는 전통적인 IVF-ET program을 따른 34명의 환자와 새로운 IVM/F-ET program을 따른 35명의 다낭성 난포증후군의 환자로부터 얻어졌다. 새로운 IVM/F-ET program에서 미성숙 난자의 회수는 다낭성 난포증후군의 환자에게 생리주기 7~18일째에 10000 IU hCG를 투여하고 36시간 후에 실시하였다. 회수된 난자들은 세 군으로 분류하였다. A군은 전통적인 IVF-ET program을 따른 34명의 환자로부터 회수된 미성숙 난자들과 새로운 IVM/F-ET program을 따른 35명의 다낭성 난포증후군의 환자로부터 회수된 난자들 중에서 난구세포들의 형성이 분산된 (dispersed) 형태를 가진 난자들을 B군으로 분류하였으며, 난구세포들의 형성이 밀집된 (compacted) 형태를 가진 난자들을 C군으로 분류하였다. 각 군의 난자들은 YS 배양액에 30% hFF, 1 IU/ml rFSH, 10 IU/ml hCG 및 10 ng/ml EGF를 첨가하여 체외성숙을 유도하였으며, 성숙 여부는 배양 후 24, 48 및 72 시간에 관찰하였다. 또한 성숙을 유도하기 직전에 각 군의 난구세포들을 분리하여 RNA를 추출하고 FSH-R, LH-R 및 EGF-R의 mRNA 수준을 RT-PCR로 조사하였다.

결 과: A군과 B군의 미성숙 난자들을 30% hFF, 1 IU/ml rFSH, 10 IU/ml hCG 및 10 ng/ml EGF를 첨가한 YS 배양액에서 72시간 동안 배양하였을 때 체외 성숙율은 C군의 성숙율보다 유의하게 높게 나타났으며 ($P < 0.001$), 24시간까지만 배양하고 체외 성숙율을 조사하였을 때는 A군보다 B군에서 유의하게 높게 나타났다. 한편, A군의 난구세포들은 FSH-R, LH-R와 EGF-R의 mRNA 수준이 B군의 수준과 비슷하게 나타났다. 그러나 A군과 B군의 난구세포들에서 LH-R의 mRNA 수준은 C군의 수준보다 높게 발현하였다.

결 론: 이상의 결과는 다낭성 난포증후군의 환자에게 hCG만 투여하고도 분산된 난구세포들을 가진 미성숙 난자들을 회수 혹은 성장을 유도함은 전통적인 IVF-ET program에서 회수할 수 있는 미성숙 난자의 수준으로 성장된 난자들을 확보할 수 있다는 것을 시사하고, 또한 그들은 체외에서 생존 능력을 획득할 수 있는 수준으로 생리학적, 분자생물학적 특징이 유사함을 제시하고 있다.