

# 생쥐 2-세포배아에 의한 시험관아기 배양용 태아제대혈청의 질적평가에 관한 연구

서울대학교 의과대학 산부인과

문신용 · 신창재 · 정구만 · 오선경 · 방명걸 · 장윤석

## Quality Assay of Human Fetal-Cord Serum for Human IVF-ET with Mouse 2-Cell Embryos

S.Y. Moon, C.J. Shin, K.M. Chung, S.K. Oh, M.G. Pang and Y.S. Chang

*Department of Obstetrics and Gynaecology, College of Medicine, Seoul National University*

### = Abstract =

The purpose of this study was to examine the qualitative variation of human fetal-cord sera (HCS) and to accept the sera in human IVF-ET program.

One hundred and sixteenth HCS were tested with 1772 2-cell embryos of F1(C57BL×CBA) virgin mice. Ten to sixteenth embryos were cultured in m-KRB medium with a aliquot of each serum (10%, v/v) or with bovine serum albumin(0.4%, w/v) as a control medium. Embryonic development were recorded at every 24hr for 4 days by such events as cellular compaction, cavitation, and hatching.

In the control groups of eight assays, 98.1%(106/108) of 2-cell embryos developed above expanded blastocyst and the embryonic development was unified through the tests. But the developmental pattern in medium with each serum was various. Namely, the sera that supported development of 100% 2-cell embryos to above morula, early blastocyst, expanded blastocyst and hatching blastocyst was 45.7% (53/116), 35.3% (41/116), 15.5% (18/116) and 6.9% (8/116), respectively. And the sera that supported development of above 80% 2-cell embryos to the each embryonic stage was 92.2% (107/116), 83.6% (97/116), 63.8% (74/116) and 36.2% (42/116), respectively. Meanwhile two kinds of toxic pattern to the embryonic development were observed in some sera. The first pattern is that some sera arrested development of most embryos in pre- or post-stage of morula or blastocyst. The second pattern is that some sera promoted or arrested a part of embryos in the same dish. The ability of serum was depended on the batch of serum.

Finally we could accept 69%(80/116) of the tested sera for human IVF-ET program. The base line for acceptance was the ability that supported above 80% 2-cell embryos to blastocyst. But some deteriorious sera were contained in this range. We cut off about 10% of the sera (83.6%, 97/116) that passed the baseline. This final percent of sera was similar to that of grade IV of this study.

### 서 론

시험관아기 프로그램에서 배아는 약 50시간을 배양액에서 세포 내외의 상호 작용에 의해 성숙, 수정 및 분할과정을 거치게 된다. 배양용

혈청은 배아의 이러한 생물학적 작용에 필요한 에너지원으로써 뿐만아니라, 물리적, 생리적 조건(유착, 경화현상)의 개선효과도 있는 것으로 간주되고 있다(Kane, 1987; Choi 등, 1987).

인간 난자의 체외배양에는 모체의 배란전 혈청(patient's maternal preovulatory serum) 또

는 태아제대혈청(human fetal cord serum)이 주로 이용되고 있지만, Leung 등(1984)은 전자보다 후자가 시험관아기의 높은 임신율을 보고하였다. 또한 생쥐 배아의 실험에서도 전자 보다는 후자에서 발생율이 높은 것으로 나타났다(Shirley 등, 1985). 한편 Caro와 Trounson(1984)은 초기 배아에 대한 제대혈청의 유해 효과에 관해 시사하였으며, Saito 등(1980)과 Ogawa 등(1987)은 초여과장치에 의해 혈청을 분리한 결과 분자량에 따라서 배아의 발생을 촉진 또는 억제 인자의 범위를 밝혀내었다.

이러한 혈청의 유해효과는 배아가 어릴수록 더욱 민감하게 반응하므로(Quinn 등, 1982), 체외수정시스템에서는 유해혈청을 선별하기 위하여 인간배아와 발생모형이 유사한 생쥐배아에 의한 혈청의 정도관리를 실시하고 있다. Jones 등(1982)은 이 방법에 의해 시험관아기의 임신율을 일정하게 유지할 수 있었다고 보고하였다. Ackerman 등(1984)은 생쥐배아를 이용하여 소 태아혈청의 질적인 분포를 상세히 제시한 바 있다. 그러나 수 많은 체외수정 프로그램에서 인간태아제대혈청을 이용하고 있지만 이 혈청의 질적분포에 관해 정확히 밝혀지지 않았다. 아울러 국내에는 태아제대혈청에 관한 정확한 정보가 없으므로 본 연구는 태아제대혈청의 질적 분포를 확립하고 그 결과를 시험관아기 프로그램에 적용하기 위하여 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 1. 태아제대혈청(human fetal-cord serum)의 제조

정상분만(vagina delivery) 또는 제왕절개시 제대혈액을 일회용주사기(50ml)에 채취하여 4°C 냉장고에서 응고(clotting)시킨 다음 상층부분을 분리하여 원심분리(1,000 rpm, 30분)에 의해 혈청을 제조하였다. 혈청은 항온수조에서 비동화과정(56°C, 60분)을 거쳐 일회용 여과기에(ACRODISC 4192, 0.2 $\mu$ m, Gelman)에서 여과한 다음 -20°C 냉동실에 보존되었다. 냉동보존시 생쥐테스트용 혈청(0.5ml)은 별도로 5ml capture에 보존되었다.

### 2. 실험동물

암컷생쥐는 한국과학기술원 생물검정실에서 구입된 제1대 잡종(C57BL/6 $\times$ CBA)을 이용하였다. 생쥐는 광량(dark:light=12:12), 온도(22

°C) 및 환풍시설이 갖추어진 사육실에서 1-2주간 적응 후 4-5주령시에 사용되었다. 수컷생쥐는 서울대 동물사육장에서 구입된 outbred ICR계통을 한 케이지에 한마리씩 사육하면서 수정능력을 확인한 다음 8-16주령시에 사용하였고, 수컷과 암컷은 1:1 비율로 짝짓기를 시켰다. 사료와 물은 자유급식 시켰으며, 특히 수컷에게는 알팔파 밀을 공급하였다.

### 3. 과배란처리 및 2세포 배아의 회수

과배란처리는 5IU의 임마혈청성 성선자극호르몬(PMSG, Sigma No. G-4877)과 5IU의 임부용모성 성선자극호르몬(HCG, Sigma No. CG-2)을 50시간 간격으로 각각 복강주사하였다. HCG 주사후 즉시 암컷을 수컷 케이지에 넣어 자연교배를 유도하였다. 2세포배아는 HCG 주사 후 46시간에 난관을 관류하여 회수하였다. 난관은 0.4% 소혈청알부민(BSA, Sigma, A-6003)이 첨가된 인산완충액(D-PBS, GIBCO, CAT. No. 450-1300)으로 입체현미경(Nikon S.M.Z-10)하에서 관류되었다. 관류기구는 30게이지 주사침이 부착된 일회용주사기(1ml)를 이용하였고, 회수용기는 일회용 petri dish(35 $\times$ 10mm, FALCON 3001)가 사용되었다.

### 4. 배양 시스템

배양액은 m-KRB(modified Krebs-Ringer-Bicarbonate Solution)을 직접제조하여 이용하였으며, 배양액의 삼투압은 280mOsm/kg, 수소 이온농도는 7.3-7.4로 조절되었다. 증류수는 초순수정제수(American Burdick & Jackson, CAS 7732-18-5)가 배양액 제조시 이용되었고, 배양액은 4°C 냉장고에 보존되었으며, 제조 후 1주일 이내에 이용되었다. 배양액에 0.4%(w/v) 혈청알부민을 첨가하여 대조군, 10%(v/v) 제대혈청을 첨가하여 처리군으로 간주하였으며, 배아 배양전에 organ tissue culture dish(Falcon 3037)의 inner well로 옮겨 5% 탄산가스배양기(37°C, 약 100% 습도유지)에서 18시간동안 평형시켰다.

하나의 혈청을 검사하는데 10-16개의 2세포 배아가 사용되었으며, 총 116개의 혈청을 검사하는데 1772개의 배아가 이용되었다.

### 5. 발생관찰 및 혈청의 판정

배양후 2, 3, 4일에 배아의 발생 상태를 역반사현미경(Inverted Microscope) 하에서 200배

로 관찰하였다. 배양 후 3일째는 발생중지란과 배반포, 4일째는 부화배반포의 비율에 초점을 맞추었다. 2세포 배아의 80% 이상을 배반포로 발육시킨 혈청을 1989년 시험관아기 프로그램의 첫 판정기준으로 삼았다. 그러나 발생을 지연시키거나, 비정상적으로 발생된 배아가 출현된 혈청과 배반포율이 80% 이상 일지라도 부화율이 낮은 혈청은 제외시켰다.

## 결 과

### 1. 대조군에서 2-세포배아의 발생능

총 8회에 걸쳐 혈청을 평가할 때 각 반복마다 대조군을 배치하여 배양액이 배아의 발생에 미치는 효과를 검토하였다. 대조군은 혈청 검정에 사용된 동일한 배양액(m-KRB)에 혈청대신에 소혈청알부민 0.4%(w/v)를 첨가하였다.

8반복 결과 대조군에서 팽윤배반포(expanded blastocyst)로 발달한 배아는 평균 98.1%(106/108)로써 1반복(86.7%)만을 제외하고는 모든 반복에서 100%의 발생율을 보였다. 그리고 부화배반포(hatching blastocyst)로 발달한 배아는 평균 80.6%(87/108)로써 여덟번의 실험중 한번(16.7%)만을 제외하고는 70-100%(주로 90% 이상)의 발생율을 나타냈다(표 1).

### 2. 2-세포배아의 발생능에 의해 검정된 혈청의 분포

총 116개의 혈청을 2-세포배아에 의해 검정한 결과 혈청의 질적 분포는 그림 1과 같다. 배아의 100%를 상실배, 초기배반포, 팽윤배반

포 또는 부화배반포로 발달시킨 혈청은 각각 45.7%(53/116), 35.3%(41/116), 15.5%(18/116) 및 6.9%(8/116)였다. 즉 배아의 100%를 상실배 또는 초기배반포로 발달시킨 혈청이 각각 전체 혈청의 1/2과 1/3, 그리고 팽윤 또는 부화배반포로 발달시킨 혈청은 약 1/10로 나타났다.

반면에 배아의 80-99%를 앞서 언급된 각 발생단계로 발달시킨 혈청은 각각 46.6%(54/116), 48.2%(56/116), 48.2%(56/116) 및 29.3%(34/116)였다. 전체 혈청 중 약 1/2은 이 범위에서 배아를 상실배 뿐만 아니라 팽윤배반포까지 발달을 가능케 하였지만, 부화배반포로 발달을 지지한 혈청은 약 1/3에 불과하였다.

따라서 2-세포배아의 80% 이상을 상실배, 초기-팽윤- 또는 부화-배반포로 발달시킨 혈청은 각각 92.2%(107/116), 83.6%(97/116), 63.8%

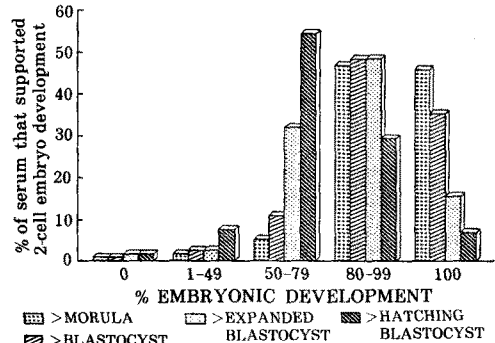


Fig. 1. Qualitative variation of Human cord sera that supported development of mouse 2-cell embryos in m-KRB medium supplemented with the respective serum.

Table 1. Development of mouse 2-cell embryos in modified KrebsRinger-bicarbonate solution with 0.4% bovine serum albumin as control medium for quality test of human fetal-cord sera

No. of replicates	Total No. of eggs	No. of eggs in one replicate	No. (%) of blastocysts	
			>Expanded	>Hatching
8	108	14 ± 2	106(98.1)	87(80.6)

Table 2. Grades of human fetal-cord sera qualified by mouse 2-cell embryos

Grades of sera	Embryonic stages (blastocyst)	Percent of eggs developed	Percent of sera passed
First	>Hatching	100%	6.9%
Second	>Expanded	100%	15.5%
Third	>Hatching	80%	36.2%
Fourth	>Expanded	80%	63.8%
Fifth	>Early	80%	83.6%

(74/116) 및 36.2%(42/116)를 차지하였다. 이 상과 같이 혈청의 약 90%가 2-세포배아를 80% 이상 상실배로 발달을 가능하게 하였지만, 포배강의 형성과 팽윤 또는 부화과정에서 혈청의 10%, 30% 또는 60%가 2-세포배아의 80% 이상을 지속적으로 발달시키지 못하였다.

한편, 2-세포배아의 50-79%만을 상실배 또는 초기배반포로 발달을 지지한 혈청은 10% 전후에 불과하였으며, 이 범위에서 팽윤 또는 부화배반포로 발달을 지지한 혈청은 각각 31.9%와 54.3%를 차지하였다. 이 범위의 혈청의 분포는 배아의 100%를 각 발달단계로 발달시킨 분포와 반대 양상을 나타내었다. 또한 1-49%만을 상실배 또는 배반포로 발달시킨 혈청은 약 2-5% 존재하였으며, 더욱 상실배까지 발달을 전혀 발달시키지 못한 혈청도 1-2% 존재하였다.

### 3. 배아의 발생에 대한 혈청의 특이적 작용 양상

그림 1에서 제시된 바와 같이 검정된 혈청 중에는 배아의 100%를 부화 배반포까지 발생을 촉진시킨 혈청이 있는 반면에 초기발생단계(2-8세포)에서 모든 배아의 발달을 억제시키는 혈청도 존재하였다. 이와같이 어떤 혈청은 생쥐 2-세포배아를 전반적으로 촉진 또는 억제시키는 효과가 있었는데 이러한 현상을 혈청의 절대적인 특성으로 간주할 수 있다. 한편 다수의 혈청은 배아의 일부를 부화배반포까지 발달을 촉진시킨 반면에 일부 배아의 발생(초기 분할 또는 포배강의 형성과 팽윤)을 억제시키는 효과가 있었다. 이러한 현상은 혈청에 따라서 차이가 심하게 나타났으며, 배아에 대한 혈청의 상대적특성으로 간주된다. 대조군(표 1)에서는 이러한 절대적특성과 상대적특성이 거의 나타나지 않은것으로 보아서 배아에 대한 혈청의 특이적 작용양상으로 받아들여진다.

### 4. 검정된 혈청의 등급

검정된 혈청(qualified serum)을 그림 1을 근거로 하여 표 2와 같이 등급을 정함으로써 혈

청의 효율적인 이용성을 증대시킬 수 있다.

검정된 혈청은 5등급으로 구분할 때 제 1등급은 배아의 100%를 부화배반포, 제 2등급은 배아의 100%를 팽윤배반포, 제 3등급은 배아의 80% 이상을 부화배반포, 제 4등급은 배아의 80% 이상을 팽윤배반포 그리고 제 5등급은 배아의 80% 이상을 초기배반포로 발달시킨 혈청이 이에 해당된다. 제 1-3등급 혈청은 유익한 혈청으로 간주될수 있지만, 제 4와 5등급의 혈청은 배양 후 3일째 배반포의 팽윤 또는 부화에 따라서 최종 판정을 내리는 것이 바람직하다.

### 5. 혈청의 판정과 이용

총 116개의 혈청 중 97개(83.6%)가 2-세포 배아를 80% 이상 배반포로 발달시켜 1989년 시험관아기프로그램의 첫 사이클의 기준치를 통과하였다. 그러나 이들 혈청 중 약 10%는 2-세포배아의 발생지연, 불충분하거나 비정상적인 포배강 형성 또는 팽윤배반포의 비율이 낮은 혈청으로써 제거되었다. 따라서 80개(69.0%)의 혈청이 최종적으로 이용되었다(표 3). 그러므로 최종 판정된 혈청의 비율은 그림 1의 혈청분포도에서 2-세포배아의 80% 이상을 팽윤 배반포로 발달시킨 혈청의 비율과 거의 비슷하였다. 따라서 혈청 판정의 기준치는 표 2의 제 4등급이상이 적절하다고 사료된다.

### 고 찰

체외수정프로그램의 중요성은 생식세포가 체외조건에서 단기간 노출 후 체내 환경으로 환원될 경우에 고유한 생물학적 기능을 계속해서 유지하는데 있다. 즉 생식세포가 체외조건에서 형태적 변화뿐만 아니라 완벽한 생리적, 생화학적 기능을 수반하므로써 체내에서 정상적인 태아로 발달이 가능하다. Caro와 Trounson(1984)은 생쥐 2세포배아를 소태아 혈청이 첨가된 배양액과 무첨가 배양액에 노출(배양)시킨 후 각기 이식한 결과 후자의 처리군에서 정상적인 태아의 발달율이 유의적으로 높다고 보고하였다.

**Table 3.** Application of human fetal-cord sera qualified by mouse 2-cell embryos to human IVF-ET program

Total No. of eggs	No. of sera tested	No.(%) of sera that supported above 80% of eggs to blastocyst	No.(%) of sera accepted finally in IVF program
1664	116	97(83.6)	80(69.0)

이러한 사실은 외부환경 조건에 민감한 단계의 배아는 비록 단기간 일지라도 체외의 영향력이 체내의 생존성과 연관이 있음을 시사한다.

체외배양에 결정적인 영향을 미칠 수 있는 인자로써 첫째 배양액의 95% 이상을 차지하는 물을 들 수 있다. 최근 Fukuda 등(1987)의 연구 결과에서 물의 정제방법으로써 무기물과 유기물의 수준이 최저치로 기록된 Milli-Q water가 배양액 제조에 적합한 것으로 나타났다. 이 물이 배양액의 biological qualities를 평가할 수 있는 지표로써 배아의 부화율을 가장 높였다고 한다. 둘째, 배양액의 선택(Quinn 등, 1985; Mahadevan 등, 1986; Bavister, 1988), 제조 및 보존방법(Dindkar와 Quigley, 1984; John과 Kiessling, 1988; Naz 등, 1986), 유해물질의 오염(Lee 등, 1988; Fishel 등, 1988; Schiewe 등, 1985)을 잘 조절 하므로써 경제적이며 성공적인 배양시스템을 확립할 수 있다고 사료된다. 마지막으로 배양액의 에너지 원으로써 이용되고 있는 첨가제를 들 수 있다. 난포세포의 체외성숙(감수분열과정), 수정, 초기 발생 및 착상전후 배아의 배양에 많이 이용되고 있는 첨가제는 여러종류의 혈청, 난포액, 양수액(Gianaroli 등, 1986)이 있으며, 또한 각종 세포(난포의 과립세포, 난관상피세포등)나 trophoblastic vesicle의 coculture도 있다. 이들 첨가제는 각종 배아의 발생 상태에 따라서 비교적 성공적으로 적용되어왔다. 시험관아기 프로그램에서는 환자의 배란전 혈청 또는 태아제대혈청이 주로 이용되고 있다.

환자의 배란전 혈청(patient's maternal preovulatory serum)은 면역학적인 측면과 병리학적인 측면에서 태아제대혈청(human fetal cord serum)보다 바람직하지만, 과배란 처리(superovulation)에 따른 내분비 물질의 과도한 혈액내 잔류(배아의 발생에 유해한 효과가 있는 것으로 간주됨: Schmidt 등, 1985)와 정도관리와 관련된 문제가 지적되고 있다. 또한 배란전 혈청은 제대혈청보다도 시험관아기의 임신율이 낮았을 뿐만 아니라(Leung 등), 생쥐 배아의 발생률에서도 나쁜 영향을 미쳤다. 한편 배란전 혈청과 제대혈청 간에 시험관아기의 임신율에 유의적인 차이가 없다는 보고도 있지만(Ball 등, 1985), Caro와 Trounson(1984)의 연구에서는 배란전 혈청보다 제대혈청에서, 제대혈청 보다는 혈청 무첨가군에서 생쥐 2세포의 발생율이 유의적으로 높다고 보고하였다. 또한 이들은 생쥐 2세포 배아가 소 혈청알부민 보다는 제대혈청 첨

가군에서 더 높은 발생율을 보였다. 본 연구자의 다른 연구에서도 생쥐 2세포 배아는 제대혈청(전 실험에서 2세포 배아의 100%를 배반포로 발달시킨 검사된 혈청)이 소혈청알부민 처리군 보다 발생율이 높았다(정등, 미발표논문, 1989). 그러나 1세포 수정란에서는 이와 반대되는 결과를 보였다. Ogawa 등(1987)은 인간 태아 제대혈청을 분자량에 따라서 초여과장치로 분리한 결과 이 혈청에는 배아를 촉진시키는 인자(5,000-1,000MW) 뿐만 아니라 억제시키는 인자(>30,000MW, <1,000MW)도 병존하고 있음을 입증하였다. 이상과 같이 제대혈청에는 유해(억제)인자와 유익(촉진)인자가 존재하며, 유해인자는 배아의 발생단계와 혈청의 샘플에 따라서 다른 양상을 나타내고 있다. Menezo의 연구팀(Menezo 등, 1984; Feichtinger 등, 1986)은 이러한 혈청의 유해인자와 관련지어 시험관아기 시스템에 혈청의 불필요성을 강조하고 있으며, B2-medium이 혈청 첨가군 만큼 높은 임신율을 보고하였다.

그러나 대부분의 연구자들은 혈청을 체외수정에 이용하고 있다. 왜냐하면 혈청은 에너지원(촉진인자)으로써 뿐만 아니라 체외조건에서 배아의 유착과 경화(Kane, 1987; Choi, 1987)를 방지하는 특성과 기타 unknown factor의 중요성을 강조하고 있다. 따라서 혈청의 유해인자를 제거하거나 유해작용이 적은 혈청을 제조하여 이용하고 있다. 이러한 방법 중 가장 일반적인 것이 생쥐 배아를 이용한 정도관리이다. 생쥐 배아를 이용하는 이유는 인간의 배아와 유사한 발생모형과 대사기능 그리고 경제적인 측면에서 고려되고 있다. 그러나 최근 Chi 등(1988)에 의해 보고된 생쥐와 인간배아의 metabolic enzymes의 '차이점에 관해 관심을 가져야 될 줄 안다. Condon-Mahony 등(1982)은 생쥐배아를 이용한 정도관리는 인간배아의 발생에 나쁜 영향을 줄 수 있는 요소를 제거할 수 있는 기회를 높이고, 그런 요소를 감소시키는데 있다고 보고하였다. 즉 혈청의 유해인자는 혈청의 샘플에 따라서 그 농도와 성격이 다를 수 있을 뿐 아니라 제조방법에 따라서 그 인자의 제거효과가 달라질 수 있음을 의미한다. 본 연구에서도 이러한 사실을 뒷받침해 주고 있다. 혈청에 따라서 생쥐 2세포배아의 100%를 부화배반포로 발달을 촉진시킨 혈청이 있는 반면 상실배까지의 발생율이 0%인 혈청도 있었다. 또한 동일한 혈청에 대하여 일부 배아는 부화

배반포까지 발생이 계속되었지만 다른 일부의 배아는 상실배, 또는 배반포 단계에서 발생을 중지하였다. 이와 같이 배아의 발생에 대한 혈청의 질적분포도는 매우 다양하게 나타났으므로 혈청에 함유된 유해인자의 특성도 다양하다고 사료된다.

본 연구에서는 2세포 배아의 80% 이상을 배반포로 발달시킨 혈청(전체혈청의 83.6%)을 시험관아기 프로그램에 적용한다는 기준을 설정하였지만, 혈청중에는 비정상적인 배반포로 발달시킨 혈청과 배반포로의 발달을 지연시킨 혈청도 포함되어 있었다. 이러한 혈청은 제외되었다. 왜냐하면 Trounson 등(1982)은 난분할 속도가 낮은 인간 배아는 낮은 임신율과 관련이 있다고 보고하였으므로, 발생지연과 관련이 있는 혈청은 수정과 분할을 가능하게 할지라도 비정상적인 대사작용에 의해 이식후에 배아의 사망과 연관성이 있을 가능성이 있기 때문이다. 따라서 본 연구 결과 최종적으로 시험관아기 프로그램에 적용된 혈청은 69%였다. 이러한 판정 기준은 연구자 간에 다소 차이가 있다. Condon-Mahony 등(1985)은 본 연구와 유사한 조건으로 실험을 수행하여 판정기준을 80% 이상의 배반포로 발달을 촉진시킨 혈청을 시험관아기 프로그램에 이용하였다. 그 기준을 통과한 혈청은 85%(46/54)로써 본 연구의 결과(83.5%)와 비슷하였다. 그러나 본 연구에서는 앞에서 언급된 비정상적인 배반포로 발달시킨 혈청을 제외시키는 제2차 판정을 추가로 실시하여 그 비율을 더욱 낮추었다. 한편 다수의 연구자들은 75% 이상의 2세포배아를 팽윤배반포 또는 부화배반포로 발달을 촉진한 혈청을 이용하고 있다(Johnston 등 1981; Quinn 등, 1984; Trounson, 1984; Naz 등, 1986). 우리의 판정 기준을 80% 이상 팽윤배반포로 한다면 본 연구결과 검사된 혈청의 63.8%(74/116)가 이 기준을 통과하게 되며, 기준을 80% 이상 부화배반포로 한다면 36.2%(42/116)만이 이 기준을 통과할 수 있다. 저자의 기준에 준한다면 현재의 시스템으로 가능하지만, 후자의 기준을 선택한다면 현재 시스템의 약 2배를 확대하여야만 본 시험관아기 프로그램에 필요한 혈청을 공급 가능하다고 사료된다. 최근 Jinno(1986)는 혈청의 제조방법에 따라서 시험관아기 프로그램의 성적에 차이가 있다고 보고하였다. 따라서 이 연구는 혈청 제조방법을 개선한다면 이 시스템의 효율성 뿐만아니라 IVF 성적도

더욱 향상될 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

## 결 론

본 연구는 제 1대 잡종(C57BL×CBA)의 2세포배아에 의한 인간태아제대 혈청의 질적평가와 이들의 실질적인 이용에 그 목적이 있다.

1989년 첫 싸이클에 총 116점의 혈청을 자체 제조하여 총 1772개의 2-세포배아에 의해 8회에 걸쳐 검정을 실시하였다. 배양액은 m-KRB(280 mOsm/kg, pH 7.3-7.4)가 사용되었으며, 이 배양액에 혈청을 각각 10% 첨가하여 14-18시간 전배양한 다음 14±2개의 2-세포배아를 넣어 96시간 동안 배양하면서 매 24시간 간격으로 발생을 관찰하였다. 각 반복마다 동일한 배양액에 0.4% 소혈청알부민을 첨가하여 동일한 처리에 의해 대조군으로 간주하였다.

대조군에서 2세포배아는 평균 98.1%(106/108)가 팽윤배반포 이상 발달하여 배아의 발생이 일정한 경향을 보였다. 한편 각각의 혈청이 첨가된 배양액에서 배아의 발생율은 다양하게 나타났다. 즉, 배아의 100%를 모두 상실배, 초기배반포, 팽윤배반포, 또는 부화배반포 이상 발달을 촉진한 혈청은 각각 45.7%(53/116), 35.3%(41/116), 15.5%(18/116) 및 6.9%(8/116)에 불과하였다. 그러나 배아의 80% 이상을 앞의 각 발생단계로 발달시킨 혈청은 각각 92.2%(107/116), 83.6%(97/116), 63.8%(74/116) 및 36.2%(42/116)를 차지하였다. 또한 혈청중에는 거의 대부분의 배아를 상실배 또는 배반포 전후단계에서 발생을 억제시킨 유해한 혈청도 다수 존재함을 확인하였다.

시험관아기프로그램의 첫 판정기준을 통과한 혈청은 83.6%(97/116)였다. 이러한 비율은 본 연구에서 검정된 혈청을 5등급으로 분류 하였을 때 제 4등급의 비율과 비슷하였다.

\*본 연구 수행에 도움을 주신 유연미, 오승은, 윤은숙, 송남희씨에게 감사를 표합니다.

## 참 고 문 헌

- Ackerman, S.B., Swanson, R.J. Stokes G.K., and Veeck, L.L.: Culture of mouse preimplantation embryos as a quality control assay for human in vitro fertilization. *Gamete Res.* 9: 145-152, 1984.

- Ball, G.D., Coulam, C.B., Field, C.S., Harms, R. W., Thie, J.T. and Byers, A.P.: *Effects of serum source on human fertilization and embryonic growth parameters in vitro*. *Fertil. Steril.* 44(1):75-79, 1985.
- Bavister, B.D.: *Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro*. *Theriogenology.* 29(1):143-154, 1988.
- Caro, C.M. and Trounson, A.: *The effect of protein on preimplantation mouse embryo development in vitro*. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer.* 1:183, 1988.
- Caro, C.M. and Trounson, A.: *Successful fertilization, embryo development, and pregnancy in human in vitro fertilization (IVF) using a chemically defined culture medium containing no protein*. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer.* 3(4):215-217, 1986.
- Chi, M.M.Y., Manchester, J.K., Yang, V.C., Curato, A.D., Strickler R.C. and Lowry, O.H.: *Contrast in levels of metabolic enzymes in human and mouse ova*. *Biol. Reprod.* 39:295-307, 1988.
- Choi, T.S., Mori, M., Kohmoto, K. and Shoda, Y.: *Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 79(2):565-568, 1987.
- Cholewa, J.A. and Whitten, W.K.: *Development of two-cell mouse embryos in the absence of a fixed-nitrogen source*. *J. Reprod. Fertil.* 22:553, 1970.
- Condon-Mahony, M., Edward Wortham, J.W., Bundren, J.C., Witmyer, J. and Shirley, B.: *Evaluation of human fetal cord sera, Ham's F10 medium, and in vitro culture materials with a mouse in vivo fertilization system*. *Fertil. Steril.* 44(4):521-525, 1985.
- Dandekar, P.V. and Quigley, M.N.: *Laboratory setup for human in vitro fertilization*. *Fertil. Steril.* 42(1):1-11, 1984.
- Feichtinger, W., Kemeter P. and Menezo, Y.: *The use of synthetic culture medium and patient serum for human in vitro fertilization and embryo replacement*. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer.* 3(2):87-92, 1986.
- Fishel, S., Jackson, P., Webster, J. and Farrantian, B.: *Endotoxins in culture medium for human in vitro fertilization*. *Fertil. Steril.* 49(1):108-111, 1988.
- Fukuda, A., Noda Y., Tsukui, S., Matsumoto, H., Yano, J., Mori, T.: *Influence of water quality on in vitro fertilization and embryo development for the mouse*. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer.* 4(1):40-45, 1987.
- Gianaroli, L., Seracchioli, B., Ferraretti, A.P., Trounson, A., Flamigi, C., and Bovicelli, L.: *The successful use of human amniotic fluid for mouse embryo culture and human in vitro fertilization, embryo culture, and transfer*. *Fertil. Steril.* 46(5):906-913, 1986.
- Jinno, M.: *Comparison of media used for human in vitro fertilization and embryo transfer programs—a new method of serum preparation*. *Nippon Sanka Fujinka Gakka, Zassh.* 38(1):102-110, 1986.
- John, D.P. and Kiessling, A.A.: *Improved pronuclear mouse embryo development over an extended pH range in Ham's F-10 medium without protein*. *Fertil. Steril.* 49(1):150-155, 1988.
- Johnston, I., Lopata, A., Speirs, A., Hoult, I., Kellow, G. and du Plessis, Y.: *In vitro fertilization: the challenge of the eighties*. *Fertil. Steril.* 36:699, 1981.
- Jones, H.W. Jr, Jones, G.S., Andrews, M.C., Acosta, A., Bundren, C., Garcia, J., Sandow, B., Veeck, L., Wilkes, C., Witmyer, J., Wortham, J.E. and Wright, G.: *The program for in vitro fertilization at Norfolk*. *Fertil. Steril.* 38:14, 1982.
- Kane, M.T.: *Minimal nutrient requirements for culture of one-cell rabbit embryos*. *Biol. Reprod.* 37:775-778, 1987.
- Lee, B.E., Boone, W.R., Brackelsberg, P.O. and Carmichael, R.A.: *Development of screening systems for evaluation of materials used in mammalian embryo transfer*. *Theriogenology.* 30(3):605-611, 1988.
- Leung, P.C.S., Gronow, M.J., Kellow, G.N., Lopata, A., Speris, A.L., McBain, J.C., du Plessis, Y.P. and Johnston, I.: *Serum supplement in human in vitro fertilization of embryo development*. *Fertil. Steril.* 41:36, 1984.
- Mahadevan, M.M., Fleetham, J., Church R.B. and

- Taylor, P.J.: *Growth of mouse embryos in bicarbonate media buffered by carbon dioxide, hepes, or phosphate, J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer.* 3(5):304-308, 1986.
- Menezo, Y., Testart, J. and Perrone, D.: *Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo culture, and transfer. Fertil. Steril.* 42(5):750-755, 1984.
- Naz, R.K., Janousek, J.T., Moody T. and Stillman, R.J.: *Factors influencing murine embryo bioassay: effects of proteins, aging of medium, and surgical glove coatings. Fertil. Steril.* 46(5):914-919, 1986.
- Ogawa, T. and Marrs, R.P.: *The effect of protein supplementation on single-cell mouse embryos in vitro. Fertil. Steril.* 47(1):156-161, 1987.
- Quinn, P. and Whittingham, D.G.: *Effect of fatty acids on fertilization and development of mouse embryos in vitro. J. Androl.* 3:640, 1982.
- Quinn, P., Kerin, J.F. and Warnes, G.M.: *Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertil. Steril.* 44(4):493-498, 1985.
- Quinn, P., Warnes, G.M., Kerin, J.F. and Kirby, C.: *Culture factors in relation to the success of human in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil. Steril.* 41:202, 1984.
- Saito, H., Berger, T., Mishell, D.R., Jr. and Marrs, R.P.: *The effect of serum fractions on embryo growth. Fertil. Steril.* 41:761, 1984.
- Schiewe, M.C., Schmidt, P.M., Bush M. and Wildt, D.E.: *Toxicity potential of absorbed retained ethylene oxide residues in cultrve dishes on embryo development in vitro. J. Animal Sci.* 60(6):1610-1618, 1985.
- Shirley, B., Wortham, J.W. Jr., Witmyer, J., Condon-Mahony, M. and Fort, G.: *Effects of human serum and plasma on development of mouse embryos in culture media. Fertil. Steril.* 43(1):129-134, 1985.
- Trounson, A., Mohr, L.R., Wood, C. and Leeton, J.F.: *Effect of delayed insemination on in vitro fertilization, culture and transfer of human embryos. J. Reprod. Fertil.* 64:285, 1982.
- Trounson, A. and Conti, A.: *Research in human in-vitro fertilization and embryo transfer. Br. Med. J.* 285:244, 1984.