

인간 난자의 체외수정을 위한 정도관리로서 생쥐 착상전 배아의 배양에 관한 연구

전북대학교 의과대학 산부인과학교실

이기숙 · 박종덕 · 이춘근 · 김종덕

Mouse Embryo Culture as Quality Control for Human IVF: Culture Media and Supplements

Gy Soog Lee, Ph.D., Jong Duk Park, M.D., Choon Khoon Lee, M.D. and Jong Duk Kim, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Chonbuk National University

= Abstract =

The development of 2-cell mouse embryos to the blastocyst stage in vitro has been used as quality control for the culture media and supplements employed for human in vitro fertilization and embryo transfer(IVF-ET). 2-cell mouse embryos were cultured to the blastocyst stage in SECM, Medium 199-Earle's, Ham's F-10 I, Ham's F-10 II, Hoppe & Pitts, MEM and HT₆. The protein supplements contained in media were bovine serum albumine, fetal bovine serum and human fetal cord serum.

The results were as follows;

1. The successful development was 81.3% in Medium 199-Earle's, 91.9% in Ham's F-10 I and 97.1% in HT₆.
2. 2-cell mouse embryos developed properly in all supplements but the best development was particularly noted in HT₆ media when HFCS was supplied as protein supplement.

서 론

인간을 비롯한 포유류의 수정(fertilization)과 초기 배아발생(embryo development)은 난관의 내강(oviductal lumen)에서 일어나지만 그 정확한 과정은 아직도 밝혀져 있지 않다. 그러나 이러한 과정은 인공적으로도 체외에서 이루어져 많은 동물들과 유아(human infants)의 출생에 큰 도움을 주고있다.

체내에서 일어나는 수정 및 배아발생 과정을 인위적으로 체외에서 성공시키기 위한 최적의 조건들에 대해서는 아직도 충분히 밝혀져 있지 않은 실정이다.

많은 체외수정 실험실에서는 생쥐 배아(embryos)의 체외(in vitro)성장에 대한 관찰이 인간 난자의 체외수정 및 배아이식(human in

vitro fertilization and embryo transfer:이하 IVF & ET)의 정도관리(quality-control)로써 채택되어지고 있으며 이 정도관리는 IVF program의 성공을 위해 필수적인 것이다.

1978년 최초로 체외수정 및 배아의 이식에 의해 Louise Joy Brown양이 탄생된 이후 체외수정 및 배아의 이식술은 불임증 치료의 한 방법으로 인정되어 현재는 전 세계적으로 선택된 환자군에서 이 과정을 통해 건강한 아이가 태어나고 있다(Edwards et al., 1980; Lopata et al., 1980; Wood et al., 1981). 그러나 본 이식수술은 각 단계에서 기술적인 어려움이 있어 성공률이 그리 높지 않은 실정이다.

체외수정 및 배아이식에 이용되는 배양액(culture media)은 다양하며(Earle's, Ham's F-10, Hoppe & Pitts, T₆등) 일반적으로 생쥐 2세포 배아(2-cell mouse embryos)를 72시간 체

외배양한 후 70~90%가 배포(blastocyst)에 도달하는 배양액을 인간난자(human oocyte)의 배양에 이용하고 있다(Ackerman et al., 1984; Dandekar and Quigly, 1984; Dorfman et al., 1984; Trounson and Conto, 1984; Cheung et al., 1985; Bongso et al., 1988; McDowell et al., 1988).

따라서 저자들은 human IVF & ET program에서 사용하는 여러 배양액 중 배아발달에 필요한 최적 배양액을 먼저 구하고 다음에 배양액에 첨가하는 단백질첨가물 중 최적 첨가물을 밝히기 위해 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

자유롭게 사육한 ICR계 흰 생쥐 암컷을 사용하였다.

2. 배아채취(embryo collection)

생쥐 암컷의 여포 성장을 촉진시키기 위해 PMSG(pregnant mare's serum gonadotropin, Sigma Co.) 5 IU를 복강주사하고(제 1일), 48시간 후에 HCG(human chorionic gonadotropin, sigma Co.) 5 IU를 다시 복강주사하여 암수를 합사시켰으며(제 3일), 제 4일에 암컷의 질점액전(vaginal plug)유무를 관찰하여 질점액전이 확인되면 교미(copulation)가 이루어진 것으로 간주하였다. 제 5일에 교미가 일어난 암컷을 경추탈구(cervical dislocation)로 도살한 후 복부를 절개하여 양 난관(oviduct)을 무균적으로 절취하여 배양액이 든 배양접시에 옮긴 후 해부현미경(Stereomicroscope, Olympus, Model SZ)하에서 30-gauge needle을 이용하여 양 난관의 세척에 의해 배아(embryo)를 채취하였다. 난할이 일어난 정상적인 건강한 2세포기 배아만을 각 실험에 사용하였다.

3. 배양과정(culture procedures)

배양은 Brinster(1963)의 paraffin drop method에 준했다. 즉 55×12mm의 1회용 배양접시(녹십자)에 멸균한 paraffin oil(Sigma Co.)을 약 7ml씩 넣고 이 속에 50 μ l씩의 배양액을 정착시켰으며 1일간 배양기에 넣어 평형(equilibrium)을 충분히 시켰다. 이 배양액에 정상적인 2세포기 배아를 넣어 37°C의 5% CO₂가 공급되는 습기찬 배양기(Forma Scientific Co. model

3187)에서 72시간 배양하였다. 배양 24시간, 48시간, 72시간에 각 배아의 난할(cleavage)단계를 도립현미경(Inverted microscope, Olympus, Model IMT-2)하에서 관찰하였다.

4. 배양액(media)

각 배양액을 제조한 수원은 4차 증류수를 사용하였다. 기본 배양액으로는 SECM(standard egg culture medium), Medium 199-Earle's, Ham's F-10, Hoppe & Pitts(이하 H&T라함), MEM(minimum essential medium), Hepes를 첨가한 Whittingham's T-6(이하 HT₆라함)를 사용하였고 이들 기본 배양액의 구성 성분을 본 실험실에서 약간의 수정을 가하여 배양액을 만들었다. 이들 배양액의 구성 성분 및 조성은 Table 1과 같다. Medium 199-Earle's 배양액은 본 실험실에서 NaHCO₃, Na-pyruvate, penicillin, streptomycin, ficoll을 첨가하므로써 배양액의 조성을 수정하였고 Ham's F-10 I 배양액은 Ca⁺⁺(lactate)·2H₂O, NaHCO₃, penicillin, streptomycin, ficoll을, Ham's F-10 II 배양액은 CaCl₂·2H₂O, Na-lactate, NaHCO₃, penicillin, streptomycin, ficoll을, MEM배양액은 NaHCO₃와 Na-pyruvate, penicillin, streptomycin, ficoll을, 그리고 HT 배양액은 MgSO₄·7H₂O, hepes, ficoll을 첨가하므로써 수정하였다. 수정된 기본배양액(working medium)에서 배아를 handling하였으며, 이 기본 배양액에 다시 각기 단백질원(nitrogen source)을 첨가하여 만든 culture medium에 2세포기 배아를 배양하였다.

그리고 실험군에 따라 첨가한 단백질 첨가물은 BSA(bovine serum albumin, Sigma Co.), FBS(fetal bovine serum, Gibco Co.), HFCS(human fetal cord serum)였으며 이중 HFCS는 56°C에서 45분간 불활성화시켜 사용하였다. 삼투압은 Osmometer(Precision)로 측정하여 280~290mosm/kg으로, pH는 7.2~7.4로(Corning 120) 조정하였다.

모든 배양액은 사용하기 전 membrane filter paper(Gelman Co. pore size 0.22 μ m)를 통과시켜 멸균하였다.

모든 실험은 2번이상 반복하여 시행하였으며 얻은 자료는 모비율 비교방법으로 통계적 유의성 검정을 실시하였다.

결 과

1. 배양액(culture media)

배아(embryo)발달에 필요한 최적 배양액을 구하고자 널리 사용하고 있는 다음의 몇가지

배양액을 비교 조사하여 보았다.

SECM:SECM에서 배아발달 정도를 알아보기 위해 Table 1과 같이 조성한 합성배양액 SECM에 HFCS를 10% 첨가하여 2세포기 배아

Table 1. Composition of modified media for the culture of early mouse embryos

Components	Concentration(g/liter)						
	SECM	Medium 199-Earle's	Ham's F-10 I	Ham's F-10 II	Hoppe and Pitts	MEM	HT ₆
Nacl	5.540	—	—	—	5.14	—	5.805
Kcl	0.356	—	—	—	0.356	—	0.106
Cacl ₂ ·2H ₂ O	0.2514	—	0.2514	—	0.2514	—	0.262
Ca ⁺⁺ (lactate)·2H ₂ O	—	—	—	0.435	—	—	—
KH ₂ PO ₄	0.162	—	—	—	0.162	—	—
Mgcl ₂ ·6H ₂ O	—	—	—	—	—	—	0.096
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.294	—	—	—	0.294	—	0.175
NaHCO ₃	2.106	0.840	2.106	2.106	1.90	0.840	1.050
Na ₂ HPO ₄	—	—	—	—	—	—	1.051
Na-Pyruvate	0.028	0.003	—	—	0.025	0.011	0.051
Na-lactate(ml)	3.68	—	3.68	—	3.7	—	4.3
Glucose	1.0	—	—	—	1.0	—	1.0
Penicillin	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.06
Streptomycin	0.075	0.075	0.075	0.075	0.05	0.075	0.05
Hepes	3.124	—	—	—	—	—	2.979
Ficoll	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Phenol red	a few	—	—	—	—	—	0.005
199 powder	—	15.1	—	—	—	—	—
Ham's F-10 powder	—	—	9.8	9.8	—	—	—
MEM powder	—	—	—	—	—	14.2	—

Table 2. Development of embryos from 2-cell stage during culture with SECM+HFCS(%)

Stage Hours	2 cell	3-4 cell	6-8 cell	Morula	Blastocyst	Fragmented	Irregular
24	6.0	75.8	18.2	—	—	—	—
48	—	6.1	—	81.8	—	—	12.1
72	—	6.1	—	—	81.8	—	12.1

No. of embryos:33

Table 3. Development of embryos from 2-cell stage during culture with Medium 199-Earle's+HFCS (%)

Stage Hours	2 cell	3-4 cell	6-8 cell	Morula	Blastocyst	Fragmented	Irregular
24	6.7	90	3.3	—	—	—	—
48	—	6.7	3.3	86.7	3.3	—	—
72	—	—	—	13.3	76.7	3.3	6.7

No. of total embryos:30

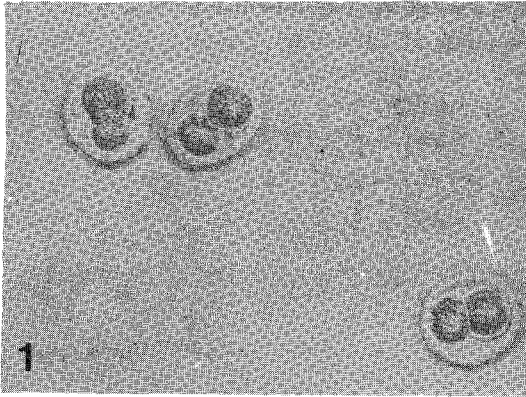


Photo. 1. 2 cell embryos at beginning of in vitro culture. ×200

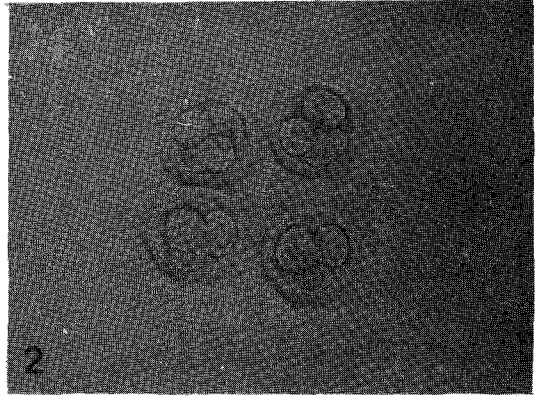


Photo. 2. 3 and 4 cell embryos after 24 hours in culture. ×200

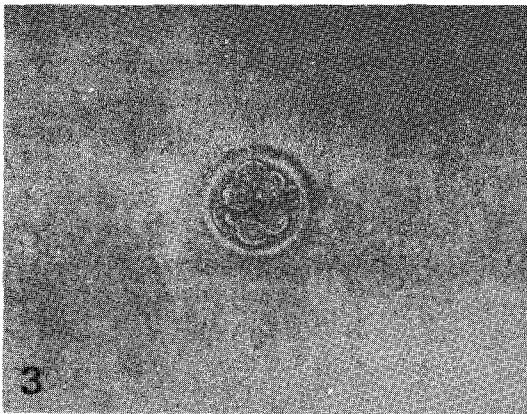


Photo. 3. 8 cell embryos after 24 hours in culture. ×200

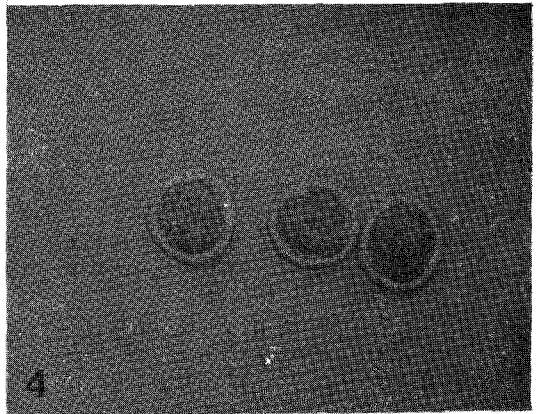


Photo. 4. Morulae after 48 hours in culture. ×200



Photo. 5. Blastocysts after 72 hours in culture. ×200

(Photo. 1)를 배양하였다(Table 2). 24시간 후 75.8%가 3~4세포기(Photo. 2)에 18.2%가 6~

8세포기(Photo. 3)로 난할(cleavage)되었다. 48시간후 81.8%가 상실배(morula, Photo. 4)까지 난할되었고, 72시간 후에는 81.8%가 배포(blastocyst, Photo. 5)까지 난할되었다.

이 결과 SECM에 배아를 배양하면 72시간 후에는 81.8%가 상실배와 배포에 도달하는 것을 알 수 있었다.

Medium 199-Earle's: Medium 199-Earle's에서의 배아 발달정도를 알아보기 위해 medium 199의 bicarbonate buffer system(Earle's salts)에 HFCS를 10% 첨가하여 2세포기 배아를 배양하였다(Table 3). 이 결과 Medium 199-Earle's에서 2세포기 배아를 72시간, 배양했을때는 89.3%가 상실배와 배포에 도달하는 것으로 나타났다.

Ham's F-10 I: Ham's F-10 I에서의 배아 발달 정도를 알아보기 위해 Table 1과 같이 조성

Table 4. Development of embryos from 2-cell stage during culture with Ham's F-10 I + HFCS(%)

Stage Hours	2 cell	3-4 cell	6-8 cell	Morula	Blastocyst	Fragmented	Irregular
24	16.2	62.2	21.6	—	—	—	—
48	2.7	—	21.6	70.3	—	2.7	2.7
72	2.7	—	—	35.1	56.8	2.7	2.7

No. of total embryos:37

Table 5. Development of embryos from 2-cell stage during culture with Ham's F-10 II + HFCS(%)

Stage Hours	2 cell	3-4 cell	6-8 cell	Morula	Blastocyst	Fragmented	Irregular
24	15.2	69.7	15.2	—	—	—	—
48	—	39.4	6.1	81.8	—	—	—
72	—	24.2	—	21.2	51.5	—	3.3

No. of total embryos:33

Table 6. Development of embryos from 2-cell stage during culture with Hoppe and Pitts + HFCS(%)

Stage Hours	2 cell	3-4 cell	6-8 cell	Morula	Blastocyst	Fragmented	Irregular
24	20.5	44.3	27.9	7.4	—	—	—
48	7.4	14.8	9.8	54.1	12.3	0.8	0.8
72	5.7	9.8	1.6	17.2	59.8	4.9	0.8

No. of total embryos:122

Table 7. Development of embryos from 2-cell stage during culture with MEM + HFCS(%)

Stage Hours	2 cell	3-4 cell	6-8 cell	Morula	Blastocyst	Fragmented	Irregular
24	6.8	88.6	4.5	—	—	—	—
48	6.8	13.6	11.4	68.2	—	—	—
72	6.8	6.8	4.5	11.4	68.2	—	—

No. of total embryos:44

한 Ham's F-10 I 에 HFCS를 10% 첨가하여 배양하여 보았다(Table 4). 이 결과 Ham's F-10 I 에서 2세포기 배아를 72시간 배양하면 91.9%가 상실배와 배포에 도달하는것을 알 수 있었다.

Ham's F-10 II :Ham's F-10 II 에서의 배아발달 정도를 알아보기 위해 Ham's F-10 II 에 HFCS를 10% 첨가하여 배양하여 보았다(Table 5). 이 결과 Ham's F-10 II 에서 72시간 배아를 배양하면 72.7%가 상실배와 배포에 도달하는 것을 알 수 있었다. 또한 Ham's F-10 I 과 비교하였을때 각 시간에 따른 난할정도도 Ham's F-10 II 에서 현저히 늦은것으로 나타났다.

Hoppe and Pitts:H&P에서의 배아발달 정도를 알아보기 위해 H&P에 HFCS를 10% 첨가하여 배양하여 보았다(Table 6). 이 결과 H&P 에 2세포기 배아를 72시간 배양하면 77.0%가 상실배와 배포에 도달하는 것으로 나타났다.

MEM:MEM에서의 배아발달 정도를 알아보기 위해 MEM에 HFCS를 10% 첨가하여 2세포기 배아를 배양하여 보았다(Table 7). 이 결과 MEM에 2세포기 배아를 72시간 배양하면 79.6%가 상실배와 배포에 도달하는것을 알 수 있었다.

HT₆:Whittingham's T-6 medium(이하 T₆)은 배양기(incubator)로 부터 실내로 옮길때 단시

Table 8. Development of embryos from 2-cell stage during culture with HT₆+HFCS (%)

Stage Hours	2 cell	3-4 cell	6-8 cell	Morula	Blastocyst	Fragmented	Irregular
24	1.4	92.8	5.8	—	—	—	—
48	1.4	—	—	98.6	—	—	—
72	1.4	—	—	5.8	91.3	1.4	—

No. of total embryos:69

Table 9. Development of embryos from 2-cell stage during culture with Ham's F-10 I +BSA (%)

Stage Hours	2 cell	3-4 cell	6-8 cell	Morula	Blastocyst	Fragmented	Irregular
24	9.1	40.9	50	—	—	—	—
48	—	31.8	—	63.6	4.5	—	—
72	—	4.5	—	27.3	63.6	—	4.5

No. of total embryos:22

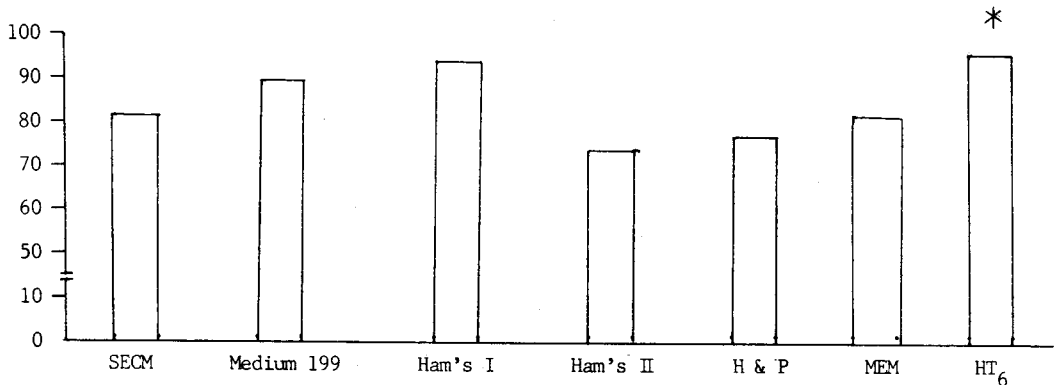


Fig. 1. Development of 2-cell mouse embryos in 7 culture media. Abscissa: Culture media. Ordinate: % of cleavage ratio developed to morula and blastocyst. Following 72 hours of culture, the cultured embryos were examined development ratio of morula and blastocyst. The asterisk represents those value which are significant ($p < 0.01$).

간 내에 pH의 빠른 증가가 관찰된 바 있다 (Martin, 1983). 본 실험은 이 T₆배양액의 pH를 안정시켜 배양했을때의 배양정도를 관찰하기 위한 것으로 Table 1과 같이 T₆배양액에 hepes(N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2 ethanesulphonic acid)를 첨가하여 배양액(HT₆)을 만들었다. 여기에 HFCS를 10% 첨가하여 2세포기 배아를 72시간 배양하였다(Table 8). 이 결과 HT₆에 2세포기 배아를 72시간 배양하면 97.1%가 상실배와 배포에 도달하는 것으로 나타났다. 또한 상기 배양액들과 비교시 시간에 따른 난할율은 가장 빠른것으로 나타났다.

이상의 성적으로 체외에서 2세포기 배아를 배양하였을때 본 실험에 이용된 모든 배양액은

70% 이상의 높은 배아발달(embryo development)을 보였다. 그러나 이중 비교적 낮은 배아발달을 보인 Ham's F-10 II 배양액과 비교해 볼때 HT₆배양액에서 2세포기 배아가 상실배와 배포까지의 발달되는 정도가 가장 좋은 것으로 (Fig. 1, 97.1%, $p < 0.01$) 나타났다.

2. 첨가물(supplements)

단백질원의 하나인 혈청단백은 대부분 동물 및 인간의 체외수정에 필수적인 것으로 알려져 있기 때문에, 배양시에는 배양액에 혈청(serum)을 첨가하여 배양을 실시한다. 이때 첨가하는 첨가물중 배아발달을 높이는 최적 첨가물을 알아보기 위해 전단계 실험으로 결과가 좋

Table 10. Development of embryos from 2-cell stage during culture with HT₆+BSA(%)

Stage Hours	3-4 cell	6-8 cell	Morula	Blastocyst	Fragmented	Irregular
24	49.2	47.5	—	—	—	3.4
48	11.9	18.6	64.4	1.7	—	3.4
72	1.7	3.4	11.9	72.9	6.8	3.4

No. of total embryos:59

Table 11. Development of embryos from 2-cell stage during culture with Ham's F-10 I +FBS(%)

Stage Hours	2 cell	3-4 cell	6-8 cell	Morula	Blastocyst	Fragmented	Irregular
24	15.4	73.1	3.8	—	—	3.8	3.8
48	3.8	11.5	7.7	65.4	—	7.7	3.8
72	3.8	3.8	—	26.9	53.8	11.5	—

No. of total embryos:26

Table 12. Development of embryos from 2-cell stage during culture with HT₆+FBS(%)

Stage Hours	3-4 cell	6-8 cell	Morula	Blastocyst	Fragmented	Irregular
24	40	40	20	—	—	—
48	—	80	20	—	—	—
72	—	—	16.7	76.7	6.7	—

No. of total embryos:30

게 나타난 Ham's F-10 I 과 HT₆의 두 배양액에 다음 몇가지 첨가물을 넣고 2세포기 배아를 배양하여 보았다.

BSA: 먼저 Ham's F-10 I 에 0.4% BSA를 첨가한 배양액의 배아발달은 72시간후 90.9%가 상실배와 배포에 도달하는 것으로 나타났다 (Table 9).

또한 HT₆에 0.4% BSA를 첨가하여 만든 배양액에 배아를 체외배양하여 보았다(Table 10). 24시간후 49.2%가 3-4세포기에, 47.5%가 6-8세포기에, 48시간후에는 47.5%가 상실배에, 72시간후에는 11.9%가 상실배에, 72.9%가 배포에 도달하였다. 따라서 BSA를 첨가한 HT₆배양액에서는 72시간 배양후 84.8%가 상실배와 배포에 도달하는것으로 나타났다. 따라서 BSA를 Ham's F-10 I 과 HT₆에 첨가했을때 좋은 배양 결과를 보이는것을 알 수 있었다.

FBS: Ham's F-10 I 에 FBS를 10% 첨가하여 만든 배양액에서 2세포기 배아를 배양하여 배양정도를 알아보았다(Table 11). 24시간후 73.1%가 3-4세포기에, 48시간후에는 65.4%가 상

실배에, 72시간후에는 26.9%가 상실배에, 53.8%가 배포에 도달하였다. 따라서 FBS를 첨가한 Ham's F-10 I 에서 2세포기 배아를 72시간 배양했을때 80.7%가 상실배와 배포에 도달하는 것으로 나타났다.

또한 HT₆에 FBS를 10% 첨가하여 만든 배양액에서 2세포기 배아를 체외 배양하여 배양정도를 관찰하였다(Table 12). 24시간후 40%가 3-4세포기에, 40%가 6-8세포기에, 20%가 상실배에 도달하여 좋은 발달정도를 보였으며, 48시간후에는 80%가 6-8세포기에, 20%가 상실배에 도달하였고, 72시간후에는 16.7%가 상실배에, 76.7%가 배포에 도달하였다. 따라서 FBS를 첨가하여 만든 HT₆배양액에서 72시간 배양하였을 때 93.4%가 상실배와 배포에 도달하는 것으로 나타났다. 그러므로 FBS도 BSA처럼 Ham's F-10 I 과 HT₆에 첨가하였을때 좋은 배양결과를 보이는 것을 알 수 있었다.

HFCS: Ham's F-10 I 에 HFCS를 10% 첨가하여 만든 배양액에 2세포기 배아를 배양하여 배양정도를 관찰하여 보았다(Table 4). 24시간

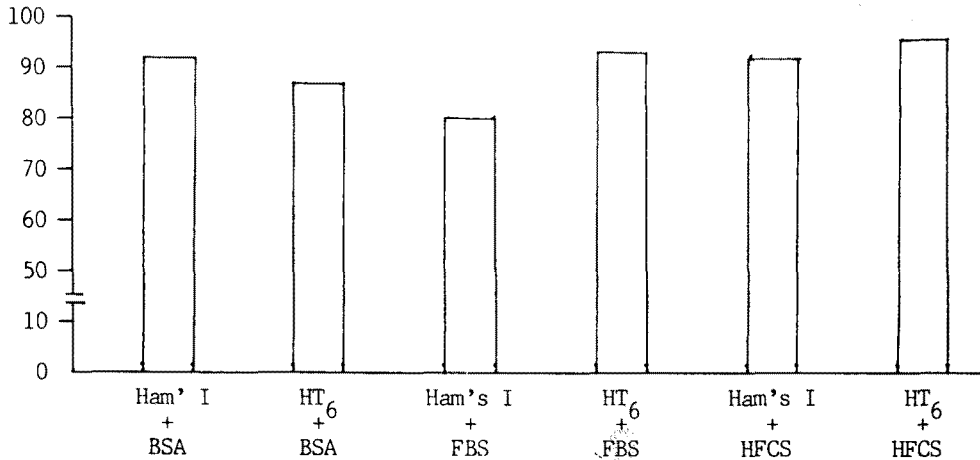


Fig. 2. Comparison of supplements on development of embryos. Abscissa: supplements in cultrue media. Ordinate: % of cleavage ratio developed to morula and blastocyst. Following 72 hours of cultrue, the cultured embryos were examined development ratio of morula and blastocyst.

후 62.2%가 3-4세포기에, 21.6%가 6-8세포기에, 48시간후에는 21.6%가 6-8세포기에, 70.3%가 상실배에, 72시간후에는 35.1%가 상실배에, 56.8%가 배포에 도달하였다. 따라서 HFCS를 첨가하여 만든 Ham's F-10 I에 2세포기 배아를 72시간 배양했을때 91.9%가 상실배와 배포에 도달하는것을 알 수 있었다.

또한 HT₆에 HFCS를 10% 첨가하여 만든 배양액의 배아발달은 72시간 체외 배양하였을때 97.1%가 상실배와 배포에 도달하는것을 알 수 있었다(Table 8).

그러므로 HFCS는 Ham's F-10 I 과 HT₆에 첨가하였을때 BSA나 FBS처럼 좋은 배양결과를 보였으며 통계적인 유의성은 없으나 가장 좋은 결과를 나타내었다(Fig. 2).

고 찰

IVF과정은 생체의(extra-corporeal)환경에서 여러 시간동안 배아(embryo)의 상태를 유지해야 하며 이런 이유 때문에 비독성의 환경(non-toxic situation)을 조성해 주어야 하고, 또한 배양액의 조성이 적합하여 생체와 유사한 최적의 상태를 유지해 주는것이 중요하다. 이러한 연구의 일환으로 Edwards(1981)는 paraffin oil하에서 영양배양액을 이용하여 생체외배양 환경을 만들었고 Lopata등(1980), Trounson(1982, 1983), Trounson등(1981)은 조직배양관(tissue culture tube)에 Ham's F-10을 사용하여 배양환경을 만들었다. 그후 현재까지 체외배양 과정

에 배양액 및 배양용기가 점차 개선되고는 있으나 아직까지 최적 배양액 및 배양조건이 제시되지 못하고 있는 실정이다(Edwards, 1981; Trounson, 1983; Cummins et al., 1986).

이들 배양액에 대해서는 정도관리(quality control)가 이루어져야 하는데 이런 정도관리는 각 배양액이 만들어진 후에 매회 실시되어야 하고 그후 인간난자를 배양해야 한다.

여러 배양액에 첨가하는 단백질첨가물로는 흔히 human fetal cord serum(Ackerman, 1984; Cheung, 1985; Bongso, 1988)이 이용되고 있으나 human preovulatory serum(Dandekar et al., 1984a; Dandekar et al., 1984b; Marrs et al., 1983)을 사용하기도 한다. 그러나 첨가물 없이 배양액만으로 배아를 배양했다는 보고도 있다(Bongso, 1988). 그러므로 이것에 대한 연구는 이들 첨가물을 정확히 규명하고 인간배아에 이용될 수 있는 간단하고 좋은 첨가물을 밝히기 위해서도 계속되어야 한다. 단백질첨가물의 영향을 알아보기 위해 saito(1984)등은 제대혈청(fetal cord serum)의 농도에 따른 영향을 보고하였으며 최소 10%농도의 제대혈청이 배아 성장과 배아독성(embryo toxicity)의 위험을 줄이기 위해서는 필요하다도 하였다. 최근 인간 제대혈청(HFCS)과 비교했을때 mouse in vitro system에서 배포와 부화(hatching)율이 증진되었음을 보고하였다.

Ackerman등(1984)은 인간제대혈청을 첨가한 Ham's F-10 I 배양액에서 2-cell mouse embryos의 73.5%가 배포단계에 도달하였으며 BSA

를 첨가한 Krebs Ringer Bicarbonate배양액에서는 91.3%가 배포단계에 도달하였다고 보고하였다. Menezo등(1984)은 HFCS와 인간혈청알부민(HSA)을 비교하여 보고하였는데 HFCS는 체외수정시 8%, 성장 및 배아이식시에는 16%를 사용하였고 HFCS대신 1% HSA를 사용했을 때에도 수정, 난할 및 임신에는 큰 차이가 없다고 하였다. 그리고 이들에 의하면 혈청의 영향은 cyclic adenosine monophosphate, catecholamines, vitamins, putative growth factors, lipids와 albumins에 기인하며 많은 종(species)에서 수정 및 초기 난할율을 증진시킨다고 하였고 Feichtinger등(1983)과 Nayudu등(1983)은 혈청은 transfer배양액의 점성을 증가시켜 배아의 손실을 막는다고 하였다.

체외배양시 중요한것은 배양액을 만드는 물의 질(quality)이 문제가 되며 이로인해 수정 및 난할율에 차이가 나타나고 임신율에 차이를 가져온다는 보고도 있다(Quinn, 1982; Quinn et al., 1984; Silverman et al., 1987; Rinehart et al., 1988).

본 실험은 체외수정 및 배아이식의 정도관리를 위한 것으로 널리 사용되고 있는 몇가지 배양액에 대해, 또한 좋은 배아발달을 보이리라고 예상되는 단백질첨가물들을 대상으로 하여 배아발달 정도를 비교 조사하였다. 즉 배양액으로 SECM, H&P, HT₆와 좀더 구성성분이 많은 MEM, Medium 199-Earle's, Ham's F-10을 본 실험의 대상배양액으로 사용하였다. 모든 배양액에서 2세포기 배아를 72시간 체외배양하면 70% 이상이 상실배와 배포에 도달하였으며, 특히 Ham's F-10 I (91.9%)과 HT₆배양액(97.1%)에서 배아발달 정도가 좋은것으로 나타났다.

한편 배양액에 첨가하는 단백질첨가물 즉 BSA, FCS와 HFCS에 대한 조사는 각 군에서 80% 이상의 배아발달을 보였으며, Ogawa등(1987)의 보고와는 달리 BSA보다 HFCS가 통계적 유의성은 없다 할지라도 더 높은 발달율을 나타낸것은 여러 종류의 BSA중 분리방법 및 처리농도가 영향을 미치는것으로 추측되며 이에대한 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 본 실험에서 FBS를 첨가물로 사용한 경우는 93.4%의 발달을 보였으나 아직 IVF&ET정도관리시 FBS를 사용한 보고는 없다. 그러나 다른 동물실험(Caro and Trounson, 1984)에서는 많이 이용하고 있으므로 FBS에

대한 인체에 적용유무는 더 실험한 후 HFCS의 사용이 여의치 못한 경우에는 사용해도 무방할 것으로 사료되었다. 또한 본 실험에 사용한 모든 기본배양액에 polymer인 ficoll을 첨가하므로써 배아의 handling시 배아가 culture dish의 바닥이나 pipette의 벽에 부착되지 않아 배아의 handling을 용이하게 하였다.

상기의 결과는 여러 배양액중 HT₆가 체외배양시 배아발달을 위한 최적 배양액인것으로 나타났다으며 또한 HFCS가 가장 좋은 배아발달을 보이는 단백질첨가물로 나타났다. 그러나 단백질첨가물에 대한 연구는 계속되어야 할 분야라고 생각되며 배양환경의 계속적인 개선과 더 나은 ovarian stimulation protocol의 적용 및 ET환경의 개선으로 더욱 높은 임신율이 기대되어질것으로 사료된다.

결 론

체외수정 및 배아이식(human IVF&ET)을 위한 배양액과 첨가물의 정도관리로서 생쥐 2세포기 배아를 배양액 SECM, Medium 199-Earle's Ham's F-10 I, Ham's F-10 II, Hoppe and pitts, MEM, HT₆와 첨가물 bovine serum albumin, fetal bovine serum, human fetal cord serum내에서 상실배와 배포까지 배아의 발달 정도를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 모든 배양액에서 70% 이상의 배아 발달율을 보였으며, Ham's F-10 I에서 90.9%, HT₆에서 97.1%의 발달을 보였다.

2. 모든 첨가물에서 80%이상의 좋은 배아 발달을 보였으며 그중 HT₆배양액에 HFCS를 첨가하였을때 가장 좋은 배아발달을 보였다.

이상과 같이 생쥐 2세포기 배아의 체외배양은 모든 배양액과 첨가물에서 좋은 배아발달을 보였으며 그중 HT₆배양액에 HFCS를 첨가하였을때 더 좋은 배양성적을 보였으므로 인간의 체외수정 및 배아이식을 위해서 HT₆배양액에 HFCS를 첨가하여 사용할 때 좋은 배양결과를 얻을것으로 사료된다.

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. *Gamet. Res.* 9: 145, 1984.

- Bongso, A., Chye, N.S., Mok, H., Lim, M.N., Wong, P.C. and Ratnam, S.: *Evaluation of Chang's culture medium for mouse in vitro fertilization and embryonic development. IVF&ET. 5:102, 1988.*
- Brinster, R.L.: *A method for in vitro cultivation of mouse ova from two cell to blastocysts. Exp. cell Res. 32:205, 1963.*
- Caro, C.M. and Trounson, A.: *The effect of protein on preimplantation mouse embryo development in vitro. IVF&ET. 1:183, 1984.*
- Cheung, S.W., Strickler, R.C., Yang, V.C., de Vera M. and Spitznagel, E.L.: *A mouse embryo culture system for quality control testing of human in vitro fertilization and embryo transfer media and fetal cord sera. Gamet. Res. 11:411, 1985.*
- Cummins, J.M., Breen, T.M., Fuller, S.M., Harrison, K.L., Wilson, L.M., Hennessey, J.F., Shaw, J.M. and Shaw, G.: *Comparison of two media in a human in vitro fertilization program: lack of significant differences in pregnancy rate. IVF&ET. 3:326, 1986.*
- Dandekar, P.V. and Quigly, M.M.: *Laboratory setup for human in vitro fertilization. Fertil. Steril. 42:1, 1984.*
- Dandekar, P.V., Spindle, A.I. and Glass, R.H.: *Development of mouse embryos in five different media. J. Cell. Biol. 99:266a Abstr. #980, 1984.*
- Dandekar, P.V., Spindle, A.I., Martin, M.C. and Glass, R.H.: *Development of mouse embryos in five different media. Fertil. Steril. 41:62S Abstr. #142, 1984b.*
- Dorfman, A., Stillman, R.J., Littman, B.A. and Schulman, D.: *Mouse embryo culture in evaluation of media and conditions for human IVF. Fertil. Steril. 41:615, 1984.*
- Edwards, R.G., Steptoe, P.C. and Purdy, J.M.: *Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. Br. J. Obstet. Gynaecol. 87:737, 1980.*
- Edwards, R.G.: *Test-tube babies. Nature 293:253, 1981.*
- Feichtinger, W., Kemeter, P. and Szalay, S.: *Facteurs morphologiques, endocrines et techniques en relation avec le resultat du transfert d'embryons humains dans l'uterus. J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)12:634, 1983.*
- Lopata, A., Johnston, I.W.H., Hoult, I.J. and Speirs, A.L.: *Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by in vitro fertilization of a preovulatory egg. Fertil. Steril. 33:117, 1980.*
- Marrs, R.P., Vargyas, J.M., Gibbons, W.E., Saito, H. and Mishell, D.R.: *A modified technique of human in vitro fertilization and embryo transfer. Am. J. Obstet. Gynecol. 147:318, 1983.*
- Martin, M.Q.: *The program for in vitro fertilization and embryo transfer at the university of Texas medical school at Houston: In vitro fertilization and embryo transfer. pp. 379-391. Academic press Inc.(London). 1983.*
- McDowell, J.S., Swallson, R.J., Maloney, M. and Veeck, L.: *Mouse embryo quality control for toxicity determination in the Norfolk in vitro fertilization program. IVF&ET. 5:144, 1988.*
- Menezo, Y., Testart, J. and Perrone, D.: *Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo culture and transfer. Fertil. Steril. 42:750, 1984.*
- Nayudu, P.L., Lopata, A., Leung, P.C.S. and Johnston, W.I.H.: *Current problem in human in vitro fertilization and embryo implantation. J. Exp. Zool. 228:203, 1983.*
- Ogawa, T. and Marrs, R.P.: *The effect of protein supplementation on single cell mouse embryos in vitro. Fertil. Steril. 47:156, 1987.*
- Quinn, P.: *Fertilization and culture of embryos: factors which have a major influence on embryo survival in vitro. In embryo transfer in cattle, sheep goats. edited by Shelton, J.N. Trounson, A.O. Moore, N.W. and James, J.W. Sydney, Australian Society for reproductive biology. pp. 47:1982.*
- Quinn, P., Warens, 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.*
- Rinehart, R.S., Bavister, B.D. and Gerrity, M.: *Quality control in the in vitro fertilization laboratory: Comparison of bioassay system for water quality. IVF&ET. 5:335, 1988.*
- Saito, H., Begar, T., Mishell, D.R. and Marrs, R.

- P.: *Effect of variable concentration on mouse embryo development. Fertil. Steril. 41:460, 1984.*
- Silverman, I.H., Cook, C.L., Sanfilippo, J.S., Yussman, M.A., Schultz, G.S. and Hilton, F. H.: *Ham's F-10 constituted with tap water supports mouse conceptus development in vitro. IVF&ET. 4: 185, 1987.*
- Trounson, A.O., Leeton, J.F., Wood, C., Webb, J. and Wood, J.: *Pregnancies in humans by fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. Science. 212:681, 1981.*
- Trounson, A.O.: *Current perspectives of in vitro fertilization and embryo transfer. Clin. Reprod. Fertil. 1:55, 1982.*
- Trounson, A.O.: *In vitro fertilization: Current topics in experimental endocrinology, vol. 5. In fetal endocrinology and metabolism. edited by L. Martin, V. James. New York, Academic press. p43, 1983.*
- Trounson, A. and Conto, A.: *Research in human in vitro fertilization and embryo transfer. Br Med. J. 285:244, 1984.*
- Wood, C., Trounson, A., Leeton, J., Talbot, J., Buttery, B., Webb, J., Wood, J. and Jessup, D.: *A clinical assessment of nine pregnancies obtained by in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil. Steril. 35:502, 1981.*
-