

수질에 대한 1-세포기 및 2-세포기 생쥐배아를 이용한 생물학적 정도관리에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실

이예경 · 정혜원 · 김향미 · 오승은 · 손영수 · 유한기 · 우복희

Mouse Embryo Culture used in Quality Control of Water for Human in Vitro Fertilization : The One-cell Stage Versus the Two-cell Stage Model

Ye-Kyung Lee, M.D., Hye-Won Chung, M.D., Hyung-Mee Kim, M.D., Seung-Eun Oh, M. S., Young-Soo Son, M.D., Han-Ki Yu, M.D. and Bock-Hee Woo, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ewha Woman's University, Seoul, Korea

= Abstract =

This study was carried out investigate the effect of water quality and the kind of media on the in vitro development of 1-cell and stage mouse embryos.

F₁ hybrid mice were superovulated and timely mated. 1-cell stage and 2-cell stage mouse embryos were recruited and taken into Ham's F-10 or m-KRB media which was made of two of two kinds of water having different quality, highly purified water and tap water.

2-cell stage embryos grew up well in vitro to blastocyst or hatching blastocyst regardless of the composition of culture media, but 1-cell stage mouse embryo didn't develop well to blastocyst or hatching blastocyst in simple media like m-KRB. These results meant in vitro development of 1-cell stage mouse embryo needed complex media like Ham's F-10 which contained abundant protein components.

In case of quality control for water, in vitro fertilization program. observation of in vitro development of 2-cell mouse embryos up to blastocyst or hatching blastocyst media such as m-KRB would be efficacious in detecting the difference of water quality.

서 론

최근 체외수정 (in vitro fertilization, 이하 IVF로 약함)에서 성공에 필수적인 요소로서 정도관리 (quality control)의 중요성이 강조되고 있으며 정도 관리란 유독인자에 의한 오염을 방지하고, 체외배양 환경을 양호한 생리적 조건으로 발전시키는 과정이다. 이러한 정도관리 프로그램을 이용하여 배아 성장에 나쁜 영향을 미치는 요소를 찾아내고 최소화할 수 있는 기회를 주게된다 (Condome-Mahony 등 1985). 따라서 정확한 정도관리가 IVF 프로그램에 이용될 때 임신율이 증가한다고 보고하고 있다 (Jones 등 1982, Quinn 등 1984).

특히 배양액을 준비하는 과정에 관심을 갖게 되는데 대부분의 인간에서 IVF에 사용되고 배양액에는 세가지 요소, 즉 물과 배양액과 단백질이 포함되며 물의 질은 배아 발달에 성공적인 열쇠가 되는 것으로 알려져 왔다 (Rinehart 등 1988). 1971년 Whittingham 등은 배양액 준비시 1차 또는 2차 증류수보다는 3차 증류수가 생쥐 2-세포기 배아의 발달을 촉진시킨다고 하였고, Fukuda 등 (1987)은 무기이온과 유기물이 적은 증류수 (Milli Q-water)가 생쥐배아의 발달을 도와준다고 하였다. Yovich 등 (1988)은 정수된 물을 사용하였을 때 수정율이나 배아 발달에는 영향을 미치지 않으나 임신율에는 영향을 미친다고 보고하였다. Silverman 등 (1989)은 Ham's F-10 배양액에 고순도 물을 사용한

경우와 수도물을 사용한 경우를 비교할 때 2-세포기 생쥐배아 발달에는 차이가 없다고 보고하였다.

Rinehart 등 (1988)은 수도물, 고순도물 (High Performance Liquid Chromatography grade water)과 증류수 (Milli-Q water)의 정도관리시 생쥐의 1-세포기, 2-세포기 배아 및 IVF를 이용하였는데 배양액에 사용되는 물의 질에 관계없이 포배기 (Blastocyst stage)에 도달하는 배아의 비율은 같다고 보고하였다.

Gorrill 등 (1991)의 실험에서 수도물과 증류수 (Milli-Q water)를 이용하여 생쥐의 1-세포기와 2-세포기 배아로 생물학적 검증 결과 1-세포기 배아에서는 물에 따라 차이를 발견할 수 없었으나 2-세포기 배아에는 Modified Tyrode's 용액에 수도물을 첨가한 경우가 배아의 발달을 촉진시킨다고 보고하였다.

현재 체외수정에서 성공율을 높이기 위해 여러가지 검증방법들을 이용하여 정도관리가 시행되고 있으며, 본 연구는 Ham's F-10과 m-KRB 배양액을 이용하여 배양액 중 중요한 요소가 되는 물질의 질에 따른 차이를 생쥐의 1-세포기 및 2-세포기 배아를 이용한 생물학적 검증에 의해 비교 분석하기 위하여 시행하였다.

연구재료 및 방법

1. 실험 동물

생쥐는 생후 4주내지 6주사이의 제 1대 잡종 (C57BL×CBA)를 이용하였다. 생쥐는 광량 (dark : light = 12 : 12), 온도 (22°C) 및 환풍시설이 갖추어진 사육실에서 1-2주간 적응 후 사용하였다. 사료와 물은 자유 급식 시켰다.

2. 과배란 유도

과배란 유도는 5 IU의 임신한 말의 혈청 성선자극호르몬 (pregnant mare's serum gonadotropin, 이하 PMSG로 약함. Sigma #CG-2)을 50시간 간격으로 각각 복강내 주사하였다. 주사용 호르몬은 생리식염수에 희석하여 1ml (50 IU)씩 1회용 주사기에 분주한 후 냉동실 (-20°C)에 보존하여 사용하였다. HCG 주사 후에는 즉시 암컷을 수컷 우리에 넣어 암컷과 수컷의 비율이 2 : 1이 되도록 교배 시켰다.

3. 배아의 회수

1) 1세포기 배아의 회수

1세포기의 배아는 HCG 주사 24시간 후에 30게이지 주사침이 부착된 일회용 튜버클린 주사기를 이용하여 난관 팽대부를 절단함으로써 난구 복합체가 배양액으로 흘러나오게 하였다. 현미경은 실체 현미경을 이용하였으며, 회수용기는 일회용 petri dish (35×10mm, FALCON 3001)를 사용하였고, 배아의 회수액은 0.3% 소혈청 알부민 (bovine serum albumin, 이하 BSA로 약함)이 첨가된 인산완충액 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 이하 D-PBS로 약함)을 사용하였다. 회수된 생쥐의 배아는 비슷한 수로 각각의 처리군에 배치하였다.

2) 2세포기 배아의 회수

2세포기의 배아는 HCG 주사 48시간 후에 30게이지 주사침이 부착된 일회용 튜버클린 주사기를 이용하여 난관을 관류함으로써 회수하였다. 회수시 사용된 기구 및 배양액은 1세포기의 배아를 회수할 때와 같은 것을 사용하였으며 회수된 배아는 비슷한 수로 각각의 처리군에 배치하였다.

4. 배양액의 제조

1) 제 1군: 고순도물 (Boxter, # 367-4)을 이용하여 modified Krebs-Ringer bicarbonate (이하 m-KRB로 약함)를 제조하였다.

2) 제 2군: 수도물을 이용하여 m-KRB를 제조하였다.

3) 제 3군: 고순도물을 이용하여 Ham's F-10 (Gibco, # 430-1700)을 제조하였다.

4) 제 4군: 수도물을 이용하여 Ham's F-10을 제조하였다.

(1) Ham's F-10 배양액의 제조과정

모든 용기는 배양액 제조 직전에 물로 2회 헹군 후 Volumetric flask에 물 (약 600ml)을 붓고 Ham's F-10분말을 넣어 자석 교반기에서 서서히 용해시킨다. 100ml의 물에 2.1g의 sodium bicarbonate (Sigma, # S5761)를 녹이고 다른 100ml의 물에 0.2452gm의 Ca-lactate (Calbiochem, # 901244)를 넣어 자석 교반기로 30분 이상 용해시키고, 또 다른 100ml의 물을 넣은 beaker에 각각 0.075g의 penicillin (Sigma, # PEN-NA)과 streptomycin (Sigma, # -6591)을 넣고 잘 녹인다.

상기한 sodium bicarbonate를 녹인 용액에 Ca-lactate를 용해시킨 용액에 Ca-lactate를 용해시킨 용액에 혼합한 후 이 혼합액을 penicillin 및 streptomycin을 녹인 용액에 첨가한다.

이 용액을 Ham's F-10용액에 조금씩 흔들면서 서서히 첨가한 후 물을 volumetric flask의 1L 눈금까지 넣은 후 잘 섞고 삼투압을 측정한다. 최종삼투압을 280mOsm/kg으로 조정된 후 0.2 μ millipore filter로 여과후 4°C냉장고에 보존한다.

(2) m-KRB 배양액의 제조 과정

모든 용기는 배양액 제조 직전에 물로 2번 행군다. Stock I 용액의 제조는 Beaker I에 40ml정도의 물을 넣고 NaCl 663.8mg, KCl 432.0mg, KH₂PO₄ 19.4mg, MgSO₄·7H₂O 34.8mg을 순서대로 용해시킨다. Beaker II에 40ml 정도의 물을 넣고 CaCl₂·2H₂O 30.0mg을 넣어 자석 교반기로 30분 이상 녹인다. Beaker I과 II의 용액을 섞은 후 phenol red 0.1mg을 넣고 100ml의 부피를 맞춘 후, 삼투압을 측정하여 230±5 mOsm/kg. H₂O가 되도록 보정하였다.

Stock II 용액의 제조는 40ml의 물을 넣고 NaHCO₃·7H₂O 1300.0mg을 용해시키고 Phenol red 0.2mg을 넣은 후 50ml의 volumetric flask에 붓고 물을 첨가하여 50ml가 되게 한 후 이 용액의 삼투압을 측정하여 270±5 mOsm/kg. H₂O가 되도록 보정하였다.

Stock I 용액 83.35ml와 stock II 용액의 16.3ml를 혼합한 후 Glucose 100.0mg, Streptomycin 5.0mg, Penicillin 7.5mg, Sodium-pyruvate 5.5mg, Sodium-lactate 0.2ml를 첨가한 후 서서히 용해하여 m-KRB 100ml용액의 삼투압을 측정하여 270±10mOsm/kg H₂O가 되도록 보정하였다.

5. 배아의 배양 및 발생관찰

배아는 실험목적에 따라서 각각 2가지 종류의 물로 만든 m-KRB와 Ham's F-10에 배양되었다. 배아는 배양접시 (FALCON 3037, Becton Dickinson)의 중앙부 (inner well)에서 배양되었

고, 배양기 (Forma Scientific)는 5% CO₂, 99% moisture 및 온도 37°C로 조절하여 사용하였다. 배아의 발생관찰은 실체 현미경의 ×80에서 실시하였고 관찰기간은 1세포기 배아는 24, 48, 72, 96, 120시간 후에, 2세포기 배아는 24, 48, 72, 96시간 후에 시행하였다.

실험 결과

1. 1-세포기 배아를 이용한 수질의 정도관리

1) 실험 배아수

8마리의 생쥐 (C57BL×CBA)에서 배아를 획득하여 고순도물 m-KRB군 (이하 KP군으로 약함), 수도물 m-KRB군 (이하 KT군으로 약함), 고순도물 Ham's F-10군 (이하 HP군으로 약함), 수도물 Ham's F-10군 (이하 HT군으로 약함)의 4군으로 나누어 각각 30개, 31개, 30개, 31개의 배아를 배치하였다 (표 1).

2) 배양 24시간 후 배아의 초기 성장상태

KP군에서는 총 30개의 1-세포기의 배아중 25개 (83.3%)가 정상적으로 2세포기 이상의 배아로 성장하였고, KT군에서는 총 31개의 1-세포기의 배아중 30개 (96.8%)가 2-세포기 이상의 배아로 성장하여 두 군 사이에 유의한 차이가 없었다. 또한 HP군에서는 총 배아 30개 중 28개 (93.3%), HT군에서는 총 배아 31개 중 31개 (100%)가 2-세포기 이상의 배아로 성장하여 HP군과 HT군 사이에도 유의한 차이는 없었다 (표 2).

3) 배양 120시간 후 배아의 성장상태

KP군의 총 30개의 배아 중 포배기 배아로 성장 발달한 배아는 8개 (26.7%)이었고 그 중 부화할 일으킨 배아는 1개 (3.3%)이었다. KT군에서는 총 31개의 배아 중 9개 (29.0%)가 포배기에 도달하였고 그 중 1개 (3.2%)가 부화되어 KP, KT군 사이에 유의한 차이가 없었다.

Table 1. Recruitment of 1-cell stage mouse embryo

	1-cell stage			
	KP	KT	HP	HT
No. of mice treated	2	2	2	2
No. of embryos recruited	30	31	30	31

KP : m-KRB with purified water
 KT : m-KRB with tap water
 HP : Ham's F-10 with purified water
 HT : Ham's F-10 with tap water

Table 2. Early in vitro development of 1-cell stage mouse embryo

	1-cell stage			
	KP	KT	HP	HT
Total No. of embryos % of embryos normally	30	31	30	31
Cleaved over 2-cell	83.3	96.8	93.3	100
% of abnormal embryos	16.7	3.2	6.7	0

Table 3. Late in vitro development of 1-cell stage mouse embryo

	1-cell stage			
	KP	KT	HP	HT
Total No. of embryos	30	31	30	31
% of blastocysts	26.7	29.0	76.7*	96.8*
% of hatching -blastocysts	3.3	3.2	70.0	80.6

*: p < 0.05.

Table 4. Recruitment of 2-cell stage mouse embryo

	2-cell stage			
	KP	KT	HP	HT
No. of mice treated	4	4	4	4
No. of embryos recruited	35	39	34	34

또한 HP군에서는 총 배아 30개 중 23개 (76.7%)가 포배기 배아로 성장하였고 HT군에서는 총 배아 31개 중 30개 (96.8%)가 포배기 배아로 성장하여 HP군에 비해서 HT군에서 오히려 유의하게 높은 비율을 나타냈다 (p < 0.05).

부화된 배아의 비율에서는 HP군에서 70.0%, HT군에서 80.6%로 두 군 사이에 유의한 차이는 없었다 (표 3).

2. 2-세포기를 배아를 이용한 수질의 정도관리

1) 실험 배아수

16마리의 생쥐에서 배아를 획득하여 KP군, KT군, HP군, HT군의 4군으로 나누어 각각 35개, 39개, 34개, 34개의 배아를 배치하였다 (표 4).

2) 배양 24시간 후 배아의 초기 성장상태

KP군에서는 총 35개의 2-세포기 배아 중 33개 (94.3%)가 정상적으로 4-세포기 이상의 배아로 성장하였고, KT군에서는 총 39개의 배아 중 31개 (79.5%)가 4-세포기 이상의 배아로 성장하여 KP군에서 KT군에 비해 일견 높은 비율을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다.

한편 HP군에서는 총 배아 34개 중 29개 (85.3%)가 4-세포기 이상의 배아로 성장하였고 HT군에서는 총 배아 34개 중 34개 전부 (100%)가 4-세포기 이상의 배아로 성장하여 오히려 HT군에서 통계적으로 유의하게 높게

Table 5. Early in vitro development of 2-cell stage mouse embryo

	2-cell stage			
	KP	KT	HP	HT
Total No. of embryos	35	39	34	34
% of embryos normally				
Cleaved over 4-cell	94.3	79	85.3*	100*
% of abnormal embryos	5.7	20.5	14.7**	0**

*, **: p < 0.05

Table 6. Late in vitro development of 2-cell stage mouse embryo

	2-cell stage			
	KP	KT	HP	HT
Total No. of embryos	35	39	34	34
% of blastocysts	94.3*	74.4*	85.3	97.1
% of hatching-blastocysts	45.7*	17.9*	61.8	82.4

*, **: p < 0.05

나타났다 (표 5).

3) 배양 96시간 후 배아의 성장상태

KP군의 총 35개의 배아 중 포배기 배아로 성장 발달한 배아는 33개 (94.3%)이었고, 그 중 부화를 일으킨 배아는 16개 (45.7%)이었다. KT군에서는 총 39개의 배아 중 29개 (74.4%)가 포배기에 도달하였고, 그 중 7개 (17.9%)가 부화되어 KP군에서 KT군에 비해 포배기 배아와 부화 포배기 배아로 성장 발달한 비율이 모두 통계적으로 유의하게 높았다 (P < 0.05).

한편 HP군에서는 총 배아 34개 중 29개 (85.3%)가 포배기 배아로 성장하였고 HT군에서는 총 배아 34개 중 33개 (97.1%)가 포배기 배아로 성장하여 두 군 사이에 유의한 차이는 없었다. 부화 포배기 배아의 비율에서도 HP군에서 61.8%, HT군에서 82.4%로 두 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (표 6).

3. 1-세포기 배아와 2-세포기 배아의 배양액의 종류에 따른 체외 성장의 비교

1) 초기 성장 상태의 비교

1-세포기 배아와 2-세포기 배아의 24시간 동안의 초기 성장율은 Ham's F-10 배양액에서 93.3%, 100%와 85.3%, 100%로 수질에 관계 없이 유의한 차이가 없었고, m-KRB 배양액에

Table 7. Early in vitro development according to the kinds of media

	1-cell stage				2-cell stage			
	KP	KT	HP	HT	KP	KT	HP	HT
Total No. of eggs	30	31	30	31	35	39	34	34
% of eggs normal cleavage	83.3	96.8*	93.3	100	94.3	79.5*	85.3	100
% of abnormal	16.7	3.2**	6.7	0	5.7	20.5**	14.7	0

*, **: P<0.05

Table 8. Late in vitro development according to the kinds of media

	1-cell stage				2-cell stage			
	KP	KT	HP	HT	KP	KT	HP	HT
Total No. of eggs	30	31	30	31	35	39	34	34
% of blastocyst	a	b	c	d	e	f		
	26.7	29.0	76.7	96.8	94.3	74.4	85.5	97.1
% of hatching-blastocyst	u	v	w	x	y	z		
	3.3	3.2	70.0	80.6	45.7	17.9	61.8	82.4

(a, c), (b, d), (a, e), (b, f) : P<0.05

(u, w), (v, x), (u, y), (v, z) : P<0.05

서 고순도물을 사용한 군에서는 83.3%와 94.3%로 유의한 차이가 없었으나, 수도물을 사용한 군에서 1-세포기 배아의 초기 성장율이 96.8%로 2-세포기 배아의 79.5%에 비해 유의하게 높았다 (P<0.05)(표 7).

2) 후기 성장 상태의 비교

1-세포기 배아의 포배기 배아로의 성장 발달률은 m-KRB 배양액에서 26.7%와 29.0%로 Ham's F-10 배양액의 76.7%와 96.8%에 비해 수질에 관계 없이 유의하게 낮았으며 (P<0.05), 2-세포기 배아의 m-KRB 배양액에서의 포배기 배아로의 성장 발달률 94.3%와 74.4%에 비해서도 수질에 관계 없이 유의하게 낮았다 (P<0.05).

2-세포기 배아의 포배기 배아로의 성장 발달률은 Ham's F-10 배양액의 85.5%와 97.1%로 m-KRB 배양액에서의 94.3%와 74.4%에 비해 수질에 관계 없이 성장 발달률 76.7%와 96.8%에 비해서도 수질에 관계 없이 유의한 차이가 없었다.

또한 부화 포배기 배아의 비율에 있어서도 전체 포배기 배아의 성장 발달률에서와 같은 차이를 보였다(표 8).

고 찰

1987년 Edwards와 Steptoe에 의한 인간의

체외수정 성공이 발표된 이후 수정 및 임신을 증가시키기 위해 많은 시도가 있었다. 이런 시도로서 생식세포의 체외배양 환경을 양호한 생리적 조건으로 발전시키기 위한 정도관리(Quality control)의 중요성이 강조되었다(Saito등 1984; Dandekar등 1984; Chetkowski등 1985; Boone등 1990).

특히 배양액은 체외수정 및 배아의 발달에 적절한 환경을 유지하는데 큰 역할을 하게 되므로 배양액 내에서 배아에 독성을 나타내는 것을 찾아내어 제거하는 것이 필요하게 되었다(Trounson등 1982; Ackerman과 Stokes등 1985; Ackerman과 Swanson등 1984; Parinaud등 1987).

이제까지 시험관아기 프로그램의 정도관리를 위해서 1-세포기 또는 2-세포기의 생쥐배아를 주로 사용하여 왔으며 그 밖에 인간정자의 생존실험이나 햄스터 정자를 이용한 정도관리 방법도 보고되고 있다(Ackerman등 1983; Fleming등 1987; Arny등 1987).

그러나 정자의 생존검증법은 정자가 나쁜 배양조건에서도 잘 견디며 정자의 운동성을 기준으로 판단하게 되므로 생쥐의 배아보다는 주관적이기 때문에 거의 사용되지 않고 있다(Bavister등 1974; Bavister와 Yanagimachi 1977).

체외수정의 정도관리에서 배양액에 사용되는 물의 질이 배아 발달에 영향을 미친다는 많은

보고가 있다.

1971년 Whittingham은 배양액 준비시 1차 또는 2차 증류수 보다는 3차 증류수가 생쥐 2-세포기 배아의 발달을 촉진시킨다고 하였으며, Fukuda등(1989)은 무기이온과 유기물이 적은 증류수(Milli-Q water)가 생쥐 배아의 발달을 도와준다고 하였다.

Siverman등(1987)은 Ham's F-10 배양액에 고순도물과 수도물을 사용하였을 때 2-세포기 생쥐 배아 발달에는 차이가 없다고 하였다.

Gorrill(1991)등은 두가지 배양액(modified Tyrode's solution과 modified Ham's F-10)에 수도물과 증류수(Milli Q water)를 첨가하여 생쥐의 1-세포기와 2-세포기 배아로 생물학적 검증을 하였는데 1-세포기 배아의 생물학적 검증시 배양액에 관계없이 물에 따른 차이를 발견할 수 없었다. 생쥐의 2-세포기 배아의 생물학적 검증은 물에 따라 차이가 있는 것으로 즉, Modified Tyrode's 용액에 수도물을 첨가한 경우가 2-세포기 배아의 발달을 촉진시킨다고 하였다. 그러나 이 연구에서는 생쥐 배아의 생물학적 검증에서 나타난 배아발달의 차이는 배양액이나 물에 대한 차이보다는 주로 동물 개체간의 차이에 의한다고 하였고 생쥐 배아에서 1-세포기는 84-96시간 후에 2-세포기는 72시간 후에 관찰하여야 하므로 시간이 많이 소요되고 비용이 많이 들고 배양액의 적합성을 판정하거나 인간 배아 정도관리로서 이용에 적절하지 못하다고 보고하였다.

Rinehart등(1988)은 수도물, 고순도물(High Performance Liquid Chromatography-grade water)와 증류수(Milli-Q water)의 정도관리 시험시에 생쥐의 1-세포기, 2-세포기 배아 및 난자의 체외수정을 이용하였는데 배양액에 사용되는 물에 관계없이 포배기에 도달하는 배아의 비율은 같다고 보고하였으며, 이들 생물학적 검증은 물의 질에 따라 차이에 대해 민감하지 못하다고 했다.

Yovich등(1988)도 물의 정제는 수정율이나 배아발달에 영향을 미치지 않는지만 임신율에는 영향을 미친다고 보고하였다.

본 연구에서는 1-세포기 생쥐 배아는 고순도물에 비해 수도물의 유해성을 유의하게 탐지해 내지 못하였으나, 2-세포기 생쥐 배아는 포배기 배아 및 부화 포배기 배아로의 성장 발달율이 m-KRB 배양액에서 고순도물을 사용한 경우 수도물을 사용한 경우에 비해서 유의하게

높았다.

이는 1-세포기와 2-세포기 생쥐 배아를 이용하여 수질에 대한 생물학적 정도관리를 하는 경우에는 2-세포기 배아를 이용하여 m-KRB 배양액 같은 단순 배양액을 사용하여 포배기 또는 부화 포배기 배아로의 체외 발생을 관찰하는 방법이 적절하다는 것을 보여준다.

Rinehart등(1988)은 Biggers-Whitten-Whittingham 배양액과 Ham's F-10 배양액에 증류수(Milli-Q water)나 수도물을 첨가한 후 단백질 첨가의 유무에 따라 생물 2-세포기로부터 포배기(blastocyst)로의 발달과정을 관찰하였다. 증류수(Milli-Q water)나 수도물에 따른 차이는 없었으나 단백질을 첨가한 경우 부화(hatching)에 영향을 미친다고 보고하였다(Spindle등 1973).

Caro와 Trounson(1984)은 2-세포기 설치류 배아에서 외부의 단백질 첨가없이 Ham's F-10 배양액만으로도 부화 포배기 배아로의 발달을 보고하였다.

Naz등(1986)은 2-세포기의 설치류 배아에서 외부에서 단백질 첨가없이 Ham's F-10 배양액만으로도 포배기(blastocyst)로의 발달이 89.4%로 소혈청 알부민(86.4%), 태아체대 혈청(90.1%), 모체 혈청(74.7%)의 단백질 첨가한 것과 비교할 때 큰 차이가 없다고 했다. 일부 보고자들은 Ham's F-10 배양액을 HPLC와 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 peptide 조성을 검사하여 3개의 커다란 장점이 있는 것을 밝혀내고 배양액 자체에 포함된 질소 성분만으로 설치류 배아의 성장에 충분하다고 보고하였다(Brinster 1965; Wright 등 1978). 그러나 Schultz등(1981)은 설치류 배아 자체가 질소성분을 가지고 있어 초기 발달에 이용한다고 하였고, 고정된 질소공급이 없이도 포배기로 발달할 수 있다고 보고하였다.

본 연구에서도 1-세포기 배아의 포배기 및 부화 포배기 배아로의 성장발달율이 m-KRB 배양액에서 Ham's F-10 배양액에 비해 수질에 관계없이 낮았다. 이는 생쥐의 2-세포기 배아는 배양액의 성분에 관계 없이 포배기나 부화 포배기로 성장 발달을 하지만 1-세포기 배아의 성장에는 m-KRB와 같은 단순 배양액보다는 Ham's F-10과 같은 단백질 성분이 포함된 복합 배양액의 필요성을 나타낸다고 할 수 있을 것이다.

이외에도 배양액의 정도관리에 배양액의 물리적인 요소 즉 삼투압이나 산도(pH)를 들 수 있다. 2-세포기 생쥐배아가 주로 시험관아기 프로그램의 정도관리에 이용되고 있으나 1-세포기 배아가 배양액의 영양결핍에 2-세포기보다 민감하다는 보고가 있다(Quinn 등 1982; Ogawa 등 1987).

Davidson 등(1986)은 1-세포기 생쥐배아가 산도(pH), 삼투압이나 적은 양의 배아의 독성 물질에 2-세포기보다 민감하다고 보고했다.

또한 Naz 등(1986)은 배양액 준비시에 단백질 첨가, 신선도 유지 및 오염방지의 중요성을 강조하였다.

현재 시험관아기 프로그램의 정도관리를 위해 1-세포기 또는 2-세포기의 생쥐배아를 주로 이용하고 있으나 생물학적 검증방법은 육안적으로 나타나거나 드물게 일어나는 배아의 독성을 검증한다는 한계가 있으며, 또한 이로써 배아의 성장을 촉진시키는 인자에 대한 설명은 불가능하고 아마도 시험관아기 프로그램에서 임신이 되는 경우는 혈청내에 생쥐배아의 생물학적 검증법으로 검사가 안되는 배아의 성장을 촉진시키는 인자가 들어있는 경우가 있을 수 있다(Leung 등 1984; Shirley 등 1985). 배양액 내 혈청첨가시 아미노산이 Ham's F-10 배양액에서와 같이 배아에 독성이 있는 물질을 흡수한다고 추측할 수 있다. 그리고 생쥐배아를 발달시키는 환경에서도 인간의 배아의 발육이 저하되거나 정지될 수 있다.

최근에는 햄스터 정자의 운동성을 이용한 생물학적 검증방법(hamster sperm motility assay, 이하 HSMA로 약함)이 보고되었는데, 이는 생쥐를 이용한 생물학적 검증방법과 비교할 때 수질의 정도관리에서 더 빠르고 정확하며 배양 배지의 불순물에 의해 민감한 것으로 보고되었다(Bavister 등 1988; Stewart 등 1988; Rinehart 등 1988).

Gorrill 등(1991)은 햄스터 정자의 운동성을 이용한 생물학적 검증(HSMA)은 실험개체간이나 실험자체나 분석자간의 차이가 적고 실험이 간단하며 비용이 적게 들고 6시간의 짧은 시간동안에 시행될 수 있어 수질이나 실험기구의 독성 등의 정도관리에 이용될 수 있다고 하였으며 정자의 운동을 판단하는데 있어 주관적인 면과 기술을 요하는 어려움이 있지만 이런 것을 보완하기 위해 컴퓨터를 이용하여 정액을 분석하는 등의 연구가 되고 있다.

따라서 난자의 체외수정에 사용되는 배양액, 혈청, 배양 용기등이 배아발육에 독성이 있는지 성장을 촉진시키는 인자가 있는지를 검증할 수 있는 객관적이고 예민하며 반복하여도 동일한 결과를 얻을 수 있는 방법의 개발이 필요한 것으로 사료된다.

결 론

체외수정 시술 프로그램의 정도관리에 흔히 사용되는 방법으로서 생쥐 제 1대 잡종(C57BL×CBA)의 1-세포기 배아와 2-세포기 배아를 이용하여 m-KRB와 Ham's F-10 배양액에 사용되는 수질의 정도 관리 체계에 대한 생물학적 검증을 시행한 후 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 1-세포기 배아를 이용한 수질의 정도 관리

1) 배양 초기 24시간 동안의 성장 발달율은 m-KRB 배양액과 Ham's F-10 배양액 양자에서 수질에 따라 유의하게 차이가 나지 않았다.

2) 배양 120시간 후 포배기 배아로의 성장 발달은 m-KRB 배양액에서는 수질에 따른 차이는 없었으나, Ham's F-10 배양액에서는 고순도물을 사용한 군에서 수도물을 사용한 군에 비해서 오히려 유의하게 낮았다.

한편, 부화된 포배기 배아의 비율은 m-KRB 배양액과 Ham's F-10 배양액 양자에서 수질에 따라 유의하게 차이가 나지 않았다.

2. 2-세포기 배아를 이용한 수질의 정도 관리

1) 배양 초기 24시간 동안의 성장 발달율에 있어서 m-KRB 배양액에서는 수질에 따른 유의한 차이는 없었으나, Ham's F-10 배양액에서는 고순도물을 사용한 군에서 수도물을 사용한 군에 비해서 오히려 유의하게 낮았다.

2) 배양 96시간 후 포배기 배아로의 성장 발달율과 부화 포배기 배아의 비율은 Ham's F-10 배양액에서는 수질에 따라 유의하게 차이가 나지 않았으나, m-KRB 배양액에서는 고순도물을 사용한 군에서 수도물을 사용한 군에 비해서 유의하게 높았다.

3. 1-세포기 배아와 2-세포기 배아의 배양액의 종류에 따른 체외 성장의 비교

1) 1-세포기 배아와 2-세포기 배아의 배양 초기 24시간 동안의 성장 발달율은 Ham's F-

10 배양액에서는 수질에 관계없이 유의한 차이가 없었고, m-KRB 배양액에서 고순도물을 사용한 군에서는 유의한 차이가 없었으나, 수도물을 사용한 군에서만 1-세포기 배아의 성장율이 2-세포기의 성장율에 비해 유의하게 높았다.

2) 1-세포기 배아의 포배기 또는 부화 포배기 배아로의 성장 발달율은 m-KRB 배양액에서 Ham's F-10 배양액에 비해서 수질에 관계없이 유의하게 낮았으며, 2-세포기 배아의 m-KRB 배양액에서의 포배기 또는 부화 포배기 배아로의 성장 발달율에 비해서도 수질에 관계없이 유의하게 낮았다.

본 연구 결과 생쥐 (C57BL×CBA)의 2-세포기 배아는 배양액의 성분에 관계없이 포배기 또는 부화 포배기로의 성장 발달을 하지만 1-세포기 배아는 포배기 또는 부화 포배기로 성장 발달하는데 m-KRB 같은 단순 배양액 보다는 단백질 성분을 많이 포함하고 있는 Ham's F-10같은 복합 배양액이 필요한 것으로 사료되며, 수질에 대한 정도 관리는 생쥐 (C57BL×CBA) 2-세포기 배아를 사용하여 m-KRB 배양액 같은 단순 배양액에서 포배기 또는 부화 포배기 배아까지의 체외성장을 관찰하는 것이 적절할 것으로 사료된다.

인용문헌

- Ackerman SB, Strokes GL, Swanson RJ, Taylor SP, Fenwick L : Toxicity testing for human in vitro fertilization programs. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1985, 2, 132.
- Ackerman SB, Swanson RJ, Adams PJ, Wortham JWE Jr : Comparison of strains and culture media used for mouse in vitro fertilization. *Gamete Res* 1983, 7, 103.
- Ackerman SB, Swanson RJ, Strokes GL, Veeck LL : Culture of mouse preimplantation embryos as a quality control assay for human invitro fertilization. *Gamete Res* 1984, 9, 145.
- Arny M, Nachtigall L, Quagliarello J : The effect of preimplantation culture conditions of murine embryo implantation and fetal development. *Fertil Steril* 1987, 48, 861.
- Bavister BD : The effect of variations in culture conditions on the motility of hamster spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1977, 38, 431.
- Bavister BD, Andrews JC : A rapid sperm motility bioassay procedure for quality control testing of water and culture media. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1988, 5, 67.
- Bavister BD, Yanagimachi R : The effect of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reactions of hamster spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 1970, 19, 228.
- Boone WR, Shapiro SS : Quality control in vitro fertilization laboratory. *Theriogenology* 1990, 31 (1), 23.
- Brinster RL : Studies on the development of mouse embryos in vitro III. the effect of fixed nitrogen source. *J Exp Zool* 1965, 158, 69.
- Caro TM, Trounson A : The effect of protein on preimplantation embryo development in vitro. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1984, 1, 183.
- Chetkowski RJ, Nass TE, Matt DW, Hamilton F, Steingold KA, Randle D, Meldrum DR : Optimization of hydrogenion concentration during aspiration of oocytes and culture and transfer of embryo. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1985, 2, 207.
- Parinaud J, Reme J, Monrozies X, Favrin S, Sarramon M, Ponronnier G : Mouse system quality control is necessary before the use of new material for vitro fertilization and embryo transfer. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1987, 4, 56.
- Quinn P, Warnes GH, Kerin JF, Kirby C : Culture factors in relation to the success of human in vitro fertilization and embryo transfer. *Ferti Steril* 1984, 41, 202.
- Quinn P, Wittingham DG : Effects of fatty acids on fertilization and development of mouse embryo in vitro. *J Androl* 1982, 3, 440.
- Rinehart JS, Bavister BD, Gerrity M : Quality Control in the in Vitro Fertilization Laboratory : Comparison of Bioassay Systems for water quality. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1988, 5, 335.
- Saito H, Berger T, Mishell DR Jr, Marrs RP : The effect of serum fractions on embryo

- growth. *Fertil Steril* 1984, 41, 761.
- Schultz GA, Kaye PL, McKay DJ, Johnson MH: Endogenous amino acid pool sizes in mouse eggs and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 1981, 61, 387.
- Shirley B, Wortham JWE Jr, Witmyer J, Condon-Mahony M, Fort G: Effects of human serum and plasma on development of mouse embryos in culture media. *Fertil Steril* 1985, 43, 129.
- Silvermen IH, Cook CL, Santifiippo JS, Yussman MA, Schultz GS, Hilton KH: Ham's F-10 constituted with tap supports mouse conceptus development in vitro. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1987, 4, 185.
- Spindle AL, Pedersen RA: Hatching, attachment and outgrowth of mouse blastocysts in vitro: Fixed nitrogen requirements. *J Exp Zool* 1973, 186, 305.
- Steptoe PC, Edwards RG: Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1977, 2, 366.
- Stewart-Savage J, Bavister BD: Deterioration of stored culture media as monitored by a sperm motility bioassay. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1988, 5, 76.
- Trounson A, Conti A: Research in human in vitro fertilization and embryo transfer. *Br Med J* 1982, 285, 244.
- Cholewa JA, Whitten WK: Development of two-cell mouse embryo in the absence of a fixed nitrogen source. *J Reprod Fertil* 1970, 22, 553.
- Condon-Mahony M, Wortham JWE, JR, Bundren JC, Witmyer J, Shirley B: Evaluation of human fetal cord sera, Ham's F-10 medium, and in vitro culture material with a mouse in vivo fertilization system. *Fertil Steril* 1985, 44, 521.
- Dandekar PV, Quigley MM: Laboratory setup for human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1984, 42, 1.
- Davidson A, Vermesh M, Lobo RA, Paulson RJ: Mouse embryo culture as quality control for human in vitro fertilization: The one-cell versus the two-cell model. *Fertil Steril* 1988, 49, 516.
- Fleming TP, Pratt HPM, Braude PR: The use of mouse preimplantation embryos for quality control of culture reagents in human in vitro fertilization programs: A cautionary note. *Fertil Steril* 1987, 47, 858.
- Fukuda A, Noda Y, Tsukui S, Matsumoto H, Yano J, Mori T: Influences of water quality on in vitro fertilization and embryo development for the mouse. *J Vitro Fert Transfer* 1987, 4, 40.
- Gorril MJ, Rinehart JS, Tamhane AC, Gerrity M: Comparison of the hamster sperm motility assay to the mouse one-cell and two-cell embryo bioassay as quality control tests for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1991, 55, 345.
- Jones HW Jr, Jones GS, Andrews MC, Acosta A, Bundren C, Garcia J, Sandow B, Veeck L, Wilkes C, Witmyer J, Wortham JE, Wright G: The program for in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 1982, 38, 14.
- Leung PCS, Gronow MJ, Kellow GN, Lopata A, Speirs AL, McBain JC, du Plessis YP, Johnston I: Serum supplement in human in vitro fertilization and embryo development. *Fertil Steril* 1984, 41, 36.
- Naz RK, Janousek JT, Moody T, Stillman R: Factors influencing murine embryo bioassay: effects of proteins, aging of medium, and surgical glove coating. *Fertil Steril* 1986, 46, 914.
- Ogawa T, Marrs RP: The Effects of Protein Supplementation on single-cell mouse embryos in vitro. *Fertil Steril* 1987, 47, 156.
- Whittingham DG: Culture of mouse ova. *J Reprod Fertil (Suppl)* 1971, 14, 7.
- Wright RW, Watson JG, Chaykin S: Factors influencing the in vitro hatching of mouse blastocysts. *Anim Reprod Sci* 1978, 1, 181.
- Yovich JL, Edirisinghe W, Yovich JM, Stanger J, Matson P: Methods of water purification for the preparation of culture media in an IVF-ET programme. *Hum Reprod* 1988, 3, 245.