大韓不妊學會雜誌: 第21卷 第1號 1994
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 21, No. 1, 1994, 4

ICR계 생쥐 1세포배를 이용한 수질의 평가

함춘여성 크리닉

김충현 · 정경순 · 박소현 · 황도영 · 김기철 · 민응기

Evaluation of Water Quality using ICR Mouse 1-cell Embryo

Chung Hyon Kim, Kyung Soon Cheong, So Hyun Park, Doyeong Hwang, Ki Chul Kim and Eung Gi Min

Hamchoon Women's Clinic

=Abstract=

To confirm the overcome of *in vitro* 2-cell block, ICR mouse 1-cell embryos were cultured in CZB media. All embryos in CZB were overcome *in vitro* 2-cell block and 92% of embryos were developed to the blastocyst at day 4. However, in m-KRB group(control) only 20% of embryos were developed over 2-cell. Any embryos in m-KRB did not develop to the morular stage.

Developments and degenerations of ICR mouse 1-cell embryos were compared in CZB medium prepared with water of three quality:(1) Milli-Q ultrafiltration water(UF);(2) Milli-Q reverse osmosis water(RO);(3) tap water(TAP). The objective was to evaluate the potential of quality control using ICR mouse 1-cell embryos. The more water was purified, the better embryo developments were supported and the less embryos were degenerated.

As a quality control system, the culture of ICR 1-cell mouse embryos in CZB was useful.

서 론

시험관 아기 프로그램(IVF-ET program)에 있어 정도관리(quality control)의 중요성은 여러 보고자들에 의해 널리 알려져 있으며(Jones et al., 1982;Quinn et al., 1984;정등, 1990), 생쥐 1세포배를 이용한 system(Quinn et al., 1984), zona-free embryo의 이용(Fleming et al., 1987;Montoro et al., 1990;Fleetham et al., 1993), 냉동-융해 배아의 이용(Fleetham et al., 1993), hamster 정자(Bavister & Andrews, 1988;Gorrill et al., 1991) 혹은 인간 정자(Elder & Avery, 1992)를 이용한 system등 다양한 방법이 시행되고 있으나, 생쥐 2세포 배아의 배반포 발생을 이용한 system이 주로 이용되고 있다(Saito et al., 1984;Condon-Mahony et al., 1985). 그러나 시험관 아기 프로그램에서는 배우자(gamete)상태로 부터 최대 8-16세포기 까지의 배아를 배양하며, 생쥐와 다른 종인 human에 적용되기 때문에 정도관리의 결과가 시험관 아기 프로그램에 적합하다고 단정할 수 없으므로 suboptimal condition을 보다 민감하게 screening할 수 있고, 시험관 아기 프로그램에 보다 유사한 조건의 정도관리 프로그램의 개발을 위한 연구들이 많이 이루어지고 있다.

1세포 배아를 이용한 정도관리가 2세포배를 이용하는 것 보다 suboptimal condition에 보다 민감한 것으로 알려져 있다(Quinn & Whittingham, 1982;Davidson et al., 1988). 그러나 일반적으로 생쥐 배아는 *in vitro* 2-cell block 현상을 가지므로 1세포배아를 체외 배양시킨 경우 대부분 2세포배 이상으로 발달하지 못하여 그 이용이 제한되어 있으나 Chatot등이 개발한 CZB배양액은 random-bred strain mouse에서 *in vitro* developmental block현상을 극복하는 것으로 알려져 있다(Chatot et al., 1989;

FitzGerald & DiMattina, 1992).

따라서 random-bred strain인 ICR계 생쥐의 1세포배를 이용한 정도관리가 가능하리라 사료되나 이를 이용한 정도관리에 관한 보고는 없었으며, 2-cell block을 극복하고 정상적으로 발생하는 inbred strain의 잡종 1대를 이용한 정도 관리가 *in vitro* developmental block을 나타내는 strain을 이용한 정도관리보다 뛰어난 민감도를 가지는 것으로 보고되었다(Fleetham et al., 1993). 그러나 이들의 보고는 2세포배를 이용한 비교로서 1세포배를 이용할 경우 생쥐 계통에 의한 차이는 극복되리라 사료된다. 이에 본 연구자들은 ICR계 생쥐 1세포배를 CZB와 m-KRB배양액에서 배양하여 Chatot등의 결과를 확인하였고, 수질이 확연히 구별되는 세 종류의 물을 사용하여 제조한 CZB배양액에서 배양하여 정도관리의 가능성을 점검하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험실에서 사육중인 4-6주령의 ICR계 생쥐를 이용하였다. 사육실은 12시간 주기로 명암이 조절되고 환기와 습도가 양호한 곳으로 실내온도를 20-25℃ 내외로 조절하였다.

2. 배양액의 제조

1) m-KRB배양액의 제조

초순수 정제수(UF) 100ml에 NaCl 663.8mg, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 30mg, KH_2PO_4 19.4mg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 34.8mg 및 phenol red 0.2mg을 녹여 stock I용액을 제조하였고, stock II용액은 동일한 물 100ml에 $NaHCO_3$ 1,300mg과 phenol red 0.2mg을 녹여 제조하였다.

Stock I용액 83.35ml과 stock II용액 16.3ml을 혼합한 후 glucose 100mg, streptomycin sulfate 5mg, penicillin-G(Na salt) 7.5mg, sodium lactate(60 % syrup) 0.2ml, sodium pyruvate 5.5mg을 첨가한 후 용해시켜 100ml의 m-KRB용액을 제조하였다. 제조된 배양액의 삼투압은 270±10mOsm/Kg이었다.

2) CZB배양액의 제조

CZB배양액은 초순수 정제수(UF), 역삼투 정제수(RO) 및 수돗물(TAP)로 표 1과 같은 조성으로 제조하였다. 제조된 배양액의 삼투압은 275±5mOsm/Kg였다.

3. 과배란 유도

난포의 성장은 촉진하고 배란을 유도하기 위해 7.5 IU PMSG(Sigma)와 5 IU hCG(Sigma)를 48시간 간격으로 복강 주사한 후 수컷과 합사시켰다.

4. 배아의 획득

hCG주사 후 16-18시간째 교미가 일어난 암컷을 경추이탈로 도살시킨 후 양측 난관을 절취하여 0.4% BSA(Sigma)가 포함된 D-PBS(Gibco)용액으로 옮겨 해부 현미경하에서 난관 팽대부를 절단하여 난구체(cumulus complex)가 흘러나오게 하였다. 난구체는 0.1% hyaluronidase(Sigma)가 포함된 D-PBS로 옮겨 난구세포를 제거하였고, D-PBS로 다시 옮겨 3회 세척하였다.

5. 배양액의 준비 및 배아의 배양

Table 1. Composition of CZB medium

	Conc (mM)		Conc (mM)
NaCl	81.62	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.70
KCl	4.83	Sodium lactate	31.30
KH_2PO_4	1.18	Sodium pyruvate	0.27
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.18	EDTA	0.11
$NaHCO_3$	25.12	Glutamine	1.00

Add penicillin G 100IU/ml;streptomycin sulfate 5mg/ml. Glucose(final conc. 5.5mM) add to CZB at 48-50 Hr from culture start.

Table 2. *In vitro* development of ICR 1-cell embryo

Media	N	> 2 Cell (Day 2)	≥ Blastocyst (Day 4)	≥ Exp. Blast. (Day 6)
KRB	56	12(20.0±4.4)	0(0)	0(0)
CZB	56	51(93.4±6.9)*	52(92.4±2.1)*	40(72.6±8.8)*

*$p<0.01$

배양액은 난자 채취 1일전에 준비하여 배양기(37℃, 5% CO_2 in air)에서 전배양하였다. 획득된 배아는 각 실험군 마다 무작위로 일정수 배치하였고, 즉시 배양기로 옮겨 배양하였다. CZB배양액을 이용하는 실험군에서는 배양 48시간에 최종농도가 5.5mM이 되게 glucose를 첨가하였다.

6. 발생관찰 및 통계분석

배양 후 2, 4 및 6일에 해부 현미경하에서 배아의 발생을 관찰하였다. 통계분석은 student's *t*-test로 실시하였다.

결 과

1. CZB배양액을 이용한 2-cell block의 극복

회수한 1세포 배아를 0.4% BSA가 포함된 m-KRB 및 CZB배양액에서 배양하여 CZB배양액의 2-cell block 극복 효과를 확인하였다.

CZB배양액에서는 90% 이상의 배아가 배양 2일에 2세포 이상으로, 배양 4일에는 배반포 형성을 하였다. 그러나 m-KRB배양액에서는 배양 2일에 20%의 배아만이 2세포배 이상으로 발달하였고, 이들 배아도 4-6세포배 이상으로 발달하지 못하였다(표 2).

2. ICR계 생쥐 1세포배를 이용한 수질의 평가

0.4% BSA를 각기 다른 수질로 제조된 CZB배양액에 첨가하여 배아의 발생을 관찰하였다(그림 1). 배양 시간이 경과함에 따라 수질에 따른 발생 정도의 차이를 나타내었으나, UF군과 RO군 사이에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내었고, RO군과 TAP군간에서는 배양 4일에 배반포 형성비율에서만 유의한 차이를 나타내었다($p<0.05$).

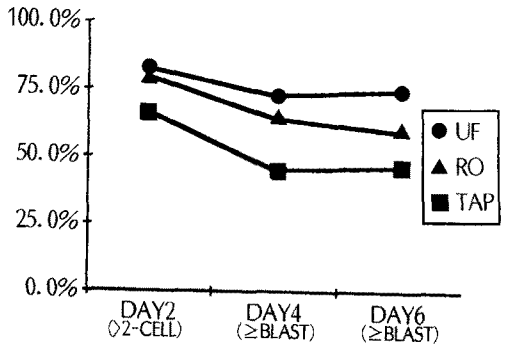

Fig. 1. Development of ICR 1-cell embryo to blastocyst in albumin supplemented CZB medium.

배양 6일에 퇴화된 배아의 비율에서도 수질에 따른 차이를 나타내었다(그림 2). UF, RO, TAP군에서 각각 11.4, 32.2, 42.6%의 배아가 퇴화되었으며 UF와 TAP군의 차이는 통계적으로 유의하였다($p<0.05$).

Albumin에 의한 독성의 감소를 배제하기 위해 BSA를 첨가하지 않은 CZB배양액에서

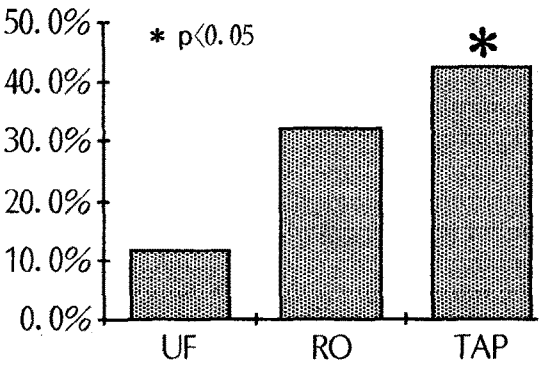

Fig. 2. Percentage of degenerated embryos in albumin supplemented CZB medium.

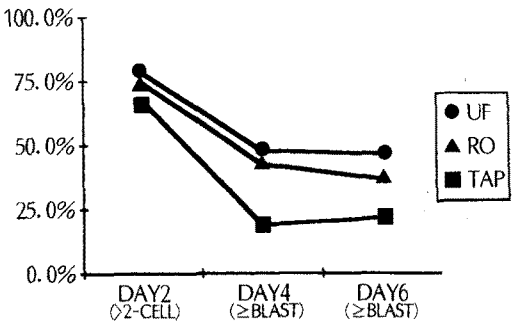

Fig. 3. Development of ICR 1-cell embryos to blastocyst in albumin free CZB medium.

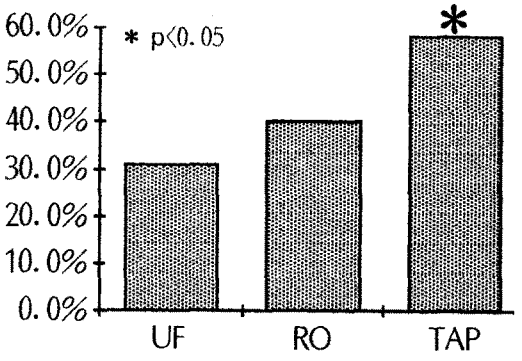

Fig. 4. Percentage of degenerated embryo in albumin free CZB medium.

배아를 배양하여 관찰하였다(그림 3). BSA첨가 실험과 마찬가지로 수질에 따른 발생정도의 차이를 보여 주었으나, 발생속도가 다소 느린 경향을 나타내었다. 각 군에서 배양 2일에 2세포기를 통과한 배아의 비율은 BSA첨가시와 거의 같은 수준이었으며, 배양 4일과 6일에 UF와 TAP군 사이에는 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다($p<0.05$).

배양 6일에 퇴화된 배아의 비율은 BSA첨가 실험보다 퇴화된 배아의 비율이 다소 높은 경향이 있었으나 수질에 따른 차이를 나타내었다(그림 4). 또한 UF와 TAP군 사이에는 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다($p<0.05$).

고 찰

ICR계 생쥐는 체외배양시 2-cell block현상으로 그 이용이 제한되어 왔으나(Whitten & Biggers, 1968), Chatot등이 개발한 CZB배양액은 random-bred mouse의 2-cell block을 극복할 수 있게 해 주는 것으로 보고되어 있다(Chatot et al., 1989). CZB배양액은 lactate와 pyruvate의 비율이 120정도이고, glutamine과 EDTA가 첨가되어 있으며, 초기 배양기간동안 glucose가 제거된 점이 조성상의 특징이다. 이러한 조성은 보다 energy효율을 높일 수 있는 방향으로 개선된 것으로 사료된다. 또한 1-2세포기 생쥐 배아에서 glutamine은 다른 amino acid보다 많이 축적되어 있으며(Brinster, 1971), 인간 배아의 경우 glucose보다 더 쉽게 이용되는 energy source로서(FitzGerald & DiMattina, 1992), lactate와 pyruvate를 대사하여 얻는 energy에 추가하여 배아에 energy를 공급할 수 있다(Chatot et al., 1989). 생쥐에서 2세포배는 glucose를 이용할 수 없는데(Biggers et al., 1967;Barbehenn et al., 1974;Seshagiri & Bavister, 1989), 다른 동물에서 초기발생동안 glucose에 의한 발생억제 현상을 발견할 수 있고(Schini & Bavister, 1988;Bavister, 1991;Kim et al., 1993), 완전히 성숙되지 않은 mitochondria의 기능에 악영향을 줄 가능성이 있으므로 이를 제거한 것으로 사료되며(Stern et al., 1971), 일부에서는 배양 전 기간 동안 glucose의 존재가 필요치 않다는 보고도 있다(Lawitts & Biggers, 1991). 본 연구에서 m-KRB와 CZB를 비교한 결과 CZB 배양액에서는 모든 배아가 2-cell block을 극복하고, 대부분의 배아가 배반포를 형성하는 반면, m-KRB에서는 20%의 배아만이 2세포기 이상으로 발달하였으나 이들 배아도 상실배를 형성하지는 못하여 Chatot등의 결과를 확인할 수 있었다.

수질에 따른 배아 발생정도의 차이는 보고자들에 따라 상이한데 Whittingham(1971)과 Fukuda등(1989)은 고순도의 물일수록 생쥐 배아의 발달에 도움이 된다고 하였고, Silverman등(1987)과 Rinehart등(1988)은 정제정도에 따른 차이가 없음을 보고하였다. 또한 Gorrill등(1991)은 생쥐 2세포기 배아의 경우 수돗물로 제조하였을 때 발생이 촉진됨을 보고하였다. 그러나 인간 배아의 경우 수정이나 난할에 있어 수질에 따른 차이는 없으나 임신율에 있어 차이를 나타내는 것으로 알려져 있으므로 체외수정 프로그램에서 이의 판별은 중요하다 하겠다(Yovich et al., 1988). 이러한 수질의 판별이 CZB배양액을 이용한 ICR계 생쥐 1세포배의 배반포 발달 정도로 가능한지 알아봄으로써 정도관리 체계로서의 유용성을 확인하고자 하였다.

BSA를 첨가한 실험군에서 배아는 수질에 따라 그 발생 정도의 차이를 나타내었느나, 통계적으로 유의한 차이로 UF와 RO군을 구별하지는 못하였다. 배양 6일에 퇴화된 배아의 비율은 정제 정도에 반비례하여 증가하는 양상을 나타내었으며, 초순수 정제수와 수돗물로 제조된 배양액을 통계적으로 유의하게 구별하였다. BSA로 인한 유해물질의 독성 감소효과를 배제하기 위하여 BSA를 첨가하지 않은 실험군에서도 첨가군과 비슷한 발생양상을 나타내었으나, 전체적으로 발생정도가 낮은 경향을 보였다. 배양 6일에 초순수 정제수와 수돗물로 제조된 배양액은 통계적으로 유의한 차이를 나타내었으며, 퇴화된 배아의 비율도 첨가군과 같은 양상을 나타내었으나 그 비율은 다소 증가하였다.

BSA첨가군에 있어서 그 발생정도는 2-cell block의 극복을 확인한 실험에 비해 다소 떨어지는 경향을 보였는데, block극복 실험에 이용된 배양액은 이미 발생능력을 확인한 배양액을 사용하였으나, 수질 평가시에는 이러한 확인없이 사용했기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 수질 평가에 있어 다소 낮은 발생정도를 보이긴 했으나, 체외수정시술에 필요한 다른 정도관리에서는 BSA를 첨가하지 않고 시

행하는 것이 바람직하리라 사료된다.
본 연구는 다른 정도관리 체계와 비교 실험을 통해 그 정확도를 점검하여야 하나, 체외수정 시술 분야에서 배양액을 제외한 대부분의 정도관리에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

In vitro 2-cell block 현상으로 인하여 체외배양이 제한되었던 ICR계 생쥐 1세포배를 CZB배양액에서 배양하여 2-cell block의 극복 효과를 확인하였고, 각기 다른 수질로 제조한 CZB배양액에 배양하여 수질 판별여부를 확인하여 정도관리 체계로서의 가능성을 점검하였다.

1. *In vitro* 2-cell block의 극복

m-KRB용액과 CZB배양액에 1세포 배아를 배양한 결과 CZB배양액에서는 모든 배아가 2세포배 이상으로 발달하여 배양 4일에 92%의 배아가 배반포를 형성하였다. 이에 비하여 m-KRB에서는 20%의 배아만이 2세포기를 통과하였고 상실배를 형성한 배아는 없었다.

2. ICR계 생쥐 1세포배를 이용한 수질의 평가

BSA첨가 유무에 관계없이 배아의 발생정도 및 퇴행되는 배아의 비율로 수질의 구별이 가능하였다. 배아 발생정도는 수돗물, 역삼투정제수, 초순수정제수의 순으로 높았으며, 퇴행된 배아의 비율은 그 역순이었다.

이와같은 결과로 ICR계 생쥐 1세포배를 이용한 수질의 평가는 가능하며, 다른 정도관리에서도 이의 이용이 가능하리라 사료된다.

인 용 문 헌

Barbehenn EK, Wales RG, Lowry OH:The explantation for the blockade of glycolysis in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974, 71, 1056-1060.

Bavister B:Culture requirements for mammalian embryos. In:"Reproductive biology: clinical and basic perspectives" Part II. Gamete activation, fertilization and preimplantation development. AFS 24th Annual postgraduate Course VIII. 1991, 107-119.

Bavister BD, Andrews JC:A rapid sperm motility bioassay procedure for quality-control testing of water and culture media. *J IVF ET* 1988, 5, 67-75.

Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP: The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967, 58, 560-567.

Brinster RL:Uptake and incorporation of amino acids by the preimplantation mouse embryo. *J Reprod Fertil* 1971, 27, 329-388.

Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I:An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1989, 86, 679-688.

정구민, 문신용, 오선경, 임경순, 장윤석:배양액과 첨가제의 효율적인 품질검사에 관한 연구. 한국수정란이식학회지 1990, 5, 28-41.

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 vitro* fertilization system. *Fertil Steril* 1985, 44, 521-525.

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, 516-521.

Elder KT, Avery SM:Routine gamete handling:oocyte collection and embryo culture. In:Brinsden PR and Rainsbury PA, eds. A textbook of *in vitro* fertilization and assisted reproduction. New Jersey:The Parthenon Publishing Group Inc., 1992, 155-170.

FitzGerald L, DiMattina M:An improved medium for long-term culture of human embryos overcomes the *in vitro* developmental block and increases blastocyst formation. *Fertil Steril* 1992, 57, 641-671.

Fleetham JA, Pattinson HA, Mortimer D:The mouse embryo culture system:improving the sensitivity for use as a quality control assay for human *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1993, 59, 192-196.

Fleming TP, Pratt HPM, Braude PR:The use of mouse preimplantation embryos for quality control of culture reagents in

human *in vitro* fertilization program:a cautionary note. *Fertil Steril* 1987, 47, 858-860.

Fukuda A, Noda Y, Tsukui S, Matsumoto H, Yano J, Mori T:Influences of water quality on *in vitro* fertilization and embryo development for mouse. *J IVF ET* 1987, 4, 40-45.

Gorrill MJ, Rinehart JS, Tamhane AC, Gerrity M:Comparison of the hamster sperm motility assay to the mouse one-cell and two-cell embryo bioassays as qualtiy control tests for *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1991, 55, 345-354.

Jones HW Jr, Jones GS, Andrews ML, 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, 14-21.

Kim JH, Funahashi H, Niwa K, Okuda K:Glucose requirement at different developmental stages of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology* 1993, 39, 875-886.

Lawitts JA, Biggers JD:Optimization of mouse culture media using simplex methods. *J Biol Reprod* 1991, 91, 543-556.

Montoro L, Baccaro M, Subias E, Swaanson J, Young P, Sueldo C:Detection of endotoxin in human *in vitro* fertilization by the zona-free mouse embryo assay. *Fertil Steril* 1990, 54, 109-112.

Quinn P, Warnes GH, Kerin JF, Kirby C:Culture factors in relation to the success of human *in vitro* fertilization and embryo transfer. *fertil Steril* 1984, 41, 202-209.

Quinn P, Whittingham DG:Effects of fatty acids on fertilization and development of mouse embryo *in vitro*. *J Androl* 1982, 3, 440-444.

Rinehart JS, Bavister BD, Gerrity M:Quality control in the *in vitro* fertilization laboratory:Comparison of bioassay systems fro water quality. *J IVF ET* 1988, 5, 335-342.

Saito H, Berger T, Mishell DR Jr, Marrs RP: The effect of serum fractions on embryo growth. *Fertil Steril* 1984, 41, 761-765.

Schini SA, Bavister BD:Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol Reprod* 1988, 39, 1183-1192.

Seshagiri PB, Bavister BD:Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos *in vitro*. *Biol Reprod* 1989, 40, 599-606.

Silverman IH, Cook CL, Sanfilippo JS, Yussman MA, Schultz GS, Hilton KH: Ham's F-10 constituted with tap water supports mouse conceptus development *in vitro*. *J IVF ET* 1987, 4, 185-187.

Stern S, Biggers JD, Anderson E:Mitochondria and early development of the mouse. *J Exp Zool* 1971, 176, 179-191.

Whitten WK, Biggers JD:Complete development *in vitro* of the preimplantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J Reprod Fertil* 1968, 17, 399-401.

Whittingham DG:Culture of mouse ova. *J Biol Reprod(Suppl)* 1971, 14, 7-21.

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. *Human Reprod* 1988, 3, 245-248.