

배란유도제가 생쥐 미성숙난자의 성숙에 미치는 영향 및 여러 배양액내에서 생쥐 2세포기의 배아 발달에 관한 연구

전북대학교병원 산부인과학교실

이종진 · 양춘모 · 문현창 · 이호성 · 이기숙 · 류철희 · 김종덕

Influence of Ovulation Induction Medicine on the Nuclear Maturation of Mouse Immature Oocytes and Development of Mouse 2-cell Embryo in Various Culture Media

**Jong-Jin Lee, Chun-Mo Yang, Hyun-Chang Moon, Ho-Seong Lee,
Ky-Sook Lee, Cheul-Hee Rhee and Jong-Duk Kim**

*Department of Obstetrics and Gynecology Chonbuk National University Hospital,
Chonju, Chonbuk, Korea*

= Abstract =

Purpose of the present study was to find the optimal ovulation induction medicine for the maturation and development of immature oocytes and culture media for 2-cell embryos in the mouse model. ICR female mouse aged 6 to 8 weeks, were stimulated with 5 IU PMSG injection. At 47 to 50 hour post-PMSG injection, ovaries were dissected out and oocytes-cumulus complexes were punctured. The oocyte-cumulus complexes were cultured in media containing various ovulation induction medicine, CC, HMG and Metrodin for 18 hours.

Female ICR mice were stimulated with 5 IU PMSG and 48 hours later were injected 5 IU of hCG, then female and male mice were mated. At 48 hour post-hCG injection, oviducts were dissected out and 2-cell embryos were flushed. The 2-cell embryos were cultured in various media, Ham's F-10 media of milli-Q water (3°), Ham's F-10 media of HPLC (high performance liquid chromatography, Baxter) water, Medicult media, HTF (human tubal fluid) media for 96 hours.

The results were as follows.

1. When the oocytes-cumulus complexes were cultured in 10^{-9} $\mu\text{g/ml}$ ~ 10^{-8} $\mu\text{g/ml}$ of CC, those were suppressed in meiotic maturation (28.2~33.7%). Whereas the oocytes-cumulus complexes were cultured in 10^{-7} $\mu\text{g/ml}$ ~ 10^{-4} $\mu\text{g/ml}$, these were not effected in meiotic maturation (54.5~72.7%).
2. When the oocytes-cumulus complexes were cultured in 10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ ~ 10^{-1} $\mu\text{g/ml}$ of Metrodin, those were suppressed in meiotic maturation (35.7~41.5%). Meanwhile the oocytes-cumulus complexes were cultured in 10^{-7} $\mu\text{g/ml}$ ~ 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$, those were not effected in meiotic maturation (54.2~70.3%).
3. When the oocytes-cumulus complexes were cultured in 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$ ~ 10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ of HMG,

those were suppressed in meiotic maturation (48.2~50.4%). As being cultured in 10^{-7} $\mu\text{g/ml}$ ~ 10^{-6} $\mu\text{g/ml}$, increased in meiotic maturation (75.8~80.7%).

4. When the 2-cell embryos were cultured in Ham's F-10 media of milli-Q water (3°), Ham's F-10 media of HPLC (high performance liquid chromatography, Baxter) water, Medicult media, HTF (human tubal fluid) media, developmental rates to blastocyst and hatching for 96 hour were 50.0%, 45.2%, 71.5% and 95.6%, respectively.

Key Words: Ovulation induction, Maturation of immature oocytes, Culture media

서 론

1978년 Steptoe와 Edwards에 의해 인류 최초의 시험관 아기가 탄생한 이래 체외수정기술 (IVF)은 불임증 치료의 한 방법으로 전 세계적으로 널리 시술되고 있다. 최초의 시험관 아기를 비롯하여 초기의 체외수정기술에는 자연주기에서 채취된 한개의 난자에서 수정란이 이루어졌다. 그러나 이후 임신율은 과배란유도제의 사용과 더불어 주로 여러개의 배아를 이식한 결과로 증진되어졌다.

자연주기에서의 난포성장과정은 난소내에는 많은 원시난포들이 있어, 매 주기마다 난포자극호르몬이 상승하면서 과립막 세포의 aromatase enzyme system을 자극하여 난포들이 4 mm 이상 성장하며 이 중 하나의 난포가 생리주기 제 5일~제 7일에 다른 난포들에 비해 우월하여 우성난포가 되며 성장을 지속하게 된다. 성장난포에 의해 지속적으로 분비되는 estradiol (E2), inhibin, 기타 여러 인자들에 의해 뇌하수체의 성선자극호르몬 분비의 억제가 오고 이로 인해 2차난포의 성숙이 억제되는 난포퇴행으로 인해 다른 난포들은 소멸하게 된다. 우성난포내에서는 많은 과립세포가 분열 증식하여 estradiol을 생성하게 되며 그양이 증가하여 일정 기간 이상 지속되면 양성되먹임에 의하여 황체 형성자극호르몬 폭발이 유발되어 난자성숙의 마지막 마무리를 하게 되며 LH surge 24시간 후 estrogen peak가 오고, estrogen peak 24시간 후 LH peak가 일어나 10~12시간만에 배란이 일어나게 된다. 과배란유도를 위해 clomiphene citrate (CC)나, human menopausal gonadotropin (HMG), 난포형성자극호르몬을 투여하면 난포발달 초기에 여러개의 난포성장에 필요한 성선자극호르몬의 "threshold requirement"를 초과하게 되고 여러개의 우성난포의 지속적인 성장이 가능하게 되어 난포퇴행의 초기단계에 접어

드는 큰 난포들을 얻을 수 있다. 그러나 생리주기 제 3일에는 난소를 자극한다 해도 이미 발달을 시작한 난포들이 서로 다른 성장과정에 와 있으므로 모든 난포들에서 성장의 일치를 기대할 수는 없다. 이렇게 하여 성숙한 난자들은 초음파를 이용하여 채취하게 되며 채취된 난자는 배양액에서 배양한 후 체외수정을 시키고 40~44시간 후 난할이 확인된 배아를 자궁내 이식하게 된다. 난자의 체외성숙과 수정 및 배양에 필요한 체외배양조건은 생체의 환경과 유사하게 만들어 주고 있으나, 체내에서 일어나는 수정 및 배아발생과정을 인위적으로 체외에서 성공시키고 더 높은 임신율을 얻기 위한 조건들을 찾기 위해서 지속적으로 많은 연구들이 이루어지고 있다. 체외수정 및 배아이식에 이용하는 배양액은 다양하며 (HT6, T6, Earle's, Ham's F-10, Hoppe & Pitts) 최근에는 배양액 제조의 복잡성을 줄이기 위해 상업용 배양액이 이용되기도 한다 (Medicult, HTF · Haman Tubal Fluid, GPM · Gamate Preparation Medium, Serono). 일반적으로 배양액에서 생쥐 2세포기 배아를 72시간 체외 배양한 후 70~90%가 배포에 도달하는 배양액이면 인간 난자의 배양에 이용할 수 있다.

따라서 체외수정기술에 사용하는 여러 배란 유도제가 미성숙 난자성숙에 미치는 영향을 비교하고 체외수정기술에 사용되는 여러 배양액 중 배아발달에 필요한 최적 배양액을 얻기 위해 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물은 물과 먹이를 자유롭게 섭취시켜 사육한 ICR계 흰 생쥐를 사용하였다.

2. 난자채취

생쥐 암컷의 난포성장을 촉진시키기 위해 6~

8주 된 흰 생쥐에 PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin, Sigma Co.) 5 IU를 복강주사 한 이틀 후에 난자를 채취하였다. 먼저 생쥐의 복부를 절개하여 가는 핀셋과 해부용 미세 수술 가위를 사용하여 무균적으로 양쪽 난소를 절취하여 배양액이 든 배양접시에 옮긴 후 해부현미경 (zoom stereo- microscope, Olympus, model SZH-131)하에서 예리한 바늘로 난소 표면의 난포를 터트려 난자를 추출해 내었다. 난자들 중 난구세포가 붙어 있는 난자-난구 복합체는 복합체의 크기보다 약간 큰 직경을 갖게 뽑아낸 미세피펫을 이용하여 분리했다.

3. 배아채취

생쥐 암컷의 난포성장을 촉진시키기 위해 PM-SG 5 IU를 복강주사하고 (제 1일), 48시간 후에 hCG (human chorionic gonadotropin, Sigma Co.) 5 IU를 다시 복강주사하여 암수를 합사시켰으며 (제 3일), 제 4일에 암컷의 질 점액전 (vaginal plug)을 관찰하여 질 점액전이 확인되면 교미가 이루어진 것으로 간주하였다. 제 5일에 교미가 일어난 암컷으로부터 난관을 무균적으로 절취하여 배양액이 든 배양접시에 옮긴 후 해부현미경하에서 30 gauge needle을 이용하여 양 난관을 씻어냄으로써 배아를 채취하였다. 난할이 일어난 정상적이고, 건강한 2세포기 배아만을 각 실험에 이용하였다.

4. 배양 및 관찰

1) 난자배양

3 mM hypoxanthine 배양액내에서 난자 난구 복합체를 분리하였으며 분리해낸 난자-난구 복합체의 배양은 Brinster의 paraffin drop method에 준하였다. 즉 60×15 mm의 1회용 배양접시 (Falcon Co.)에 멸균한 paraffin oil (Sigma Co.)을 7 ml씩 넣고 이 속에 50 μl씩의 배양액을 정착시켜 1일간 37°C의 5% CO₂가 공급되는 습기찬 배양기 (Forma Scientific Co. Model 3037)에 넣어 충분히 평형을 시켰다. 난자-난구복합체의 자연성숙을 막기 위해 3 mM hypoxanthine을 기본배양액에 첨가하여 난자-난구 복합체의 분리시 사용하였으며 3 mM hypoxanthine배양액에 0.4% bovine serum albumin (BSA, Sigma Co.)를 첨가한 배양액에서 1시간 동안 배양하면서 난자의 성숙을 억제하였다. 다시 30분간 기본배양액으로 옮겨 배양한 후 각 배란

유도제의 각각의 농도에서 18시간 배양하였다. 배양기간이 지난 난자-난구 복합체를 난자의 크기보다 약간 큰 직경을 갖게 뽑아낸 미세피펫을 이용하여 난자-난구 복합체의 난구세포들을 제거한 후 난자만을 도립 현미경하에서 관찰하였다.

2) 배아배양

배양은 Brinster의 paraffin drop method에 준하였다. 즉 60×15 mm의 1회용 배양접시에 멸균한 paraffin oil을 넣고 이 속에 배양액을 정착시켰으며 1일간 배양기에 넣어 충분히 평형을 시켰다. 이 배양액에 정상적인 2세포기 배아를 넣어 배양기에서 96시간 배양하였다. 배양 24시간, 48시간, 72시간, 96시간에 각 배아의 난할단계를 도립현미경 (Olympus, model IMT-2)하에서 관찰하였다.

5. 배양액

1) 난자

기본 배양액으로는 Ham's F-10 배양액 (Ham's F-10 powder, ca⁺⁺ · lactate · 2H₂O 0.2452 g/l, NaHCO₃ 2.106 g/l, penicillin 0.075 g/l, streptomycin 0.075 g/l)을 사용하였고, 난자-난구복합체의 배양에는 BSA (Sigma Co.)를 0.4% 첨가하였다.

배양액의 osmolarity는 280~300milliosmol/kg으로, pH는 7.2~7.4 (Fisher, Accumet 15)로 조절하였다. 모든 배양액은 사용하기 전 membrane filter paper (Millipore Co. 0.22 μm)를 통과시켜 멸균하였다. CC (Sigma Co. U.S.A.), HMG (IBSA, Swiss), Metrodin (Laboratories Serono S.A. Swiss)은 기본 배양액에 각 실험농도 범위로 첨가하여 사용하였다.

2) 배아

Ham's F-10 배양액은 milli Q (3차) 물과 HPLC용 (Baxter)물을 사용하여 만들었으며 여기에 0.4% BSA를 첨가하여 2세포기 배아를 배양하였다. 또한 상업용으로 나오는 Medicult 배양액 (Medicult, Denmark)과 HTF (Irvine scientific, U.S.A.) 배양액에 2세포기 배아를 배양하였다.

결 과

1. 배란유도제

각 배란유도제가 생쥐 미성숙 난자의 성숙에 미치는 영향을 알아보기 위해 난자성숙을 억제하는 농도인 3 mM hypoxanthine (노, 1994)에서

Table 1. Effect of CC on the rate of maturation of cumulus-cell enclosed oocytes^a

Group (µg/ml)	Total	No. of oocytes (percent)		
		Prophase I	Metaphase I	Metaphase II
Control	91	4 (3.7±2.2) ^b	30 (33.7±3.8)	57 (62.6±4.0)
10 ⁻⁹	45	6 (17.0±8.8)	24 (53.4±1.7)	15 (33.7±1.5)**
10 ⁻⁸	39	7 (17.5±6.4)	21 (53.2±1.6)	11 (28.2±0.7)**
10 ⁻⁷	33	2 (5.3±3.1)	13 (40.2±3.5)	18 (54.5±2.9)
10 ⁻⁶	57	2 (3.1±3.1)	14 (24.3±7.3)	41 (72.7±6.1)
10 ⁻⁵	52	3 (5.9±2.4)	15 (28.2±4.9)	34 (65.9±4.5)
10 ⁻⁴	46	1 (2.3±2.0)	16 (35.1±1.3)	29 (62.9±2.7)

^a The oocyte - cumulus complexes (occ) were preincubated for 1 hour in the medium containing 3 mM hypoxanthine and cultured for 30 minutes in plain medium, and then transferred to the CC medium (10⁻⁹ µg/ml~10⁻⁴ µg/ml), cultured further for 18 hours.

^b Values are means ± SE.

**p<0.01

1시간 동안 난자의 성숙을 억제시킨 후 기본배양액을 거쳐 (30분) 각 배란유도제가 첨가된 배양액에서 18시간 배양하였다.

1) CC

CC (10⁻⁹ µg/ml~10⁻⁴ µg/ml)가 첨가된 배양액에서 미성숙 난자-난구 복합체를 배양하여 난자의 성숙을 조사하였다. 전기 I까지 성숙한 것은 대조군이 3.7%였고, 10⁻⁹ µg/ml~10⁻⁴ µg/ml 농도에서는 각각 17.0%, 17.5%, 5.3%, 3.1%, 5.9%, 2.3%였으며, 난자가 중기 I까지 성숙한 것은 대조군에서 33.7%, 10⁻⁹ µg/ml~10⁻⁴ µg/ml 농도에서 각각 53.4%, 53.2%, 40.2%, 24.3%, 28.2%, 35.1%였다. 중기 II까지 성숙한 난자의 성숙율은 대조군에서 62.6%였으며 10⁻⁹ µg/ml에서는 33.7%, 10⁻⁸ µg/ml에서는 28.2%, 10⁻⁷ µg/ml에서는 54.5%였고, 10⁻⁶ µg/ml~10⁻⁴ µg/ml에서는 62.9~72.7%로 나타났다. 이로부터 배양액내의 CC는 낮은 농도 (10⁻⁸~10⁻⁹ µg/ml)의 CC를 포함한 실험군에서는 중기 II까지 도달하는 난자의 성숙율이 유의하게 떨어졌으나 (28.2~33.7%) 비교적 높은 농도인 10⁻⁷ µg/ml~10⁻⁴ µg/ml의 실험군에서는 난자의 성숙율에 유의한 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다 (54.5~72.7%) (Table 1, Fig. 1).

2) Metrodin

Metrodin (10⁻⁷ µg/ml~10⁻¹ µg/ml)이 첨가된 배양액에서 미성숙 난자-난구 복합체를 배양하여 난자의 성숙을 조사하였다. 난자가 전기 I까지

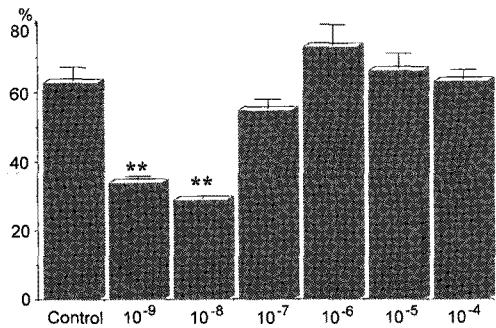


Fig. 1. Effect of CC on the rate of maturation of cumulus cell-enclosed oocytes. **p<0.01.

성숙한 것은 대조군은 3.7%였고, 10⁻⁷ µg/ml~10⁻¹ µg/ml 농도에서 각각 7.8%, 12.7%, 0%, 0%, 5%, 0%, 0%였으며, 난자가 중기 I에까지 성숙한 것은 대조군에서 33.7%, 10⁻⁷ µg/ml~10⁻¹ µg/ml 농도에서 각각 21.9%, 29.9%, 45.8%, 58.5%, 45.5%, 62.6%, 65.5%였다. 난자가 중기 II까지 성숙한 난자의 성숙율은 대조군에서 62.6%였으며, 10⁻⁷ µg/ml에서는 70.3%, 10⁻⁶ µg/ml에서는 57.4%, 10⁻⁵ µg/ml에서는 54.2%, 10⁻⁴ µg/ml에서는 41.5%, 10⁻³ µg/ml에서는 49.4%, 10⁻² µg/ml에서는 37.4%, 10⁻¹ µg/ml에서는 34.5%로 나타났다. 이로부터 배양액내의 Metrodin은 중기 II까지 도달하는 난자의 성숙율이 10⁻⁴ µg/ml 이상의 높은 농도에서는 유의하게 억제되어 나타났으나 (34.5~41.5%) 10⁻⁷

Table 2. Effect of Metrodin on the rate of maturation of cumulus cell-enclosed oocytes^a

Group (µg/ml)	Total	No. of oocytes (percent)		
		Prophase I	Metaphase I	Metaphase II
Control	91	4 (3.7±2.2) ^b	30 (33.7±3.8)	57 (62.6±4.0)
10 ⁻⁷	28	2 (7.8±4.2)	6 (21.9±5.9)	20 (70.3±3.0)
10 ⁻⁶	25	3 (12.7±6.4)	8 (29.9±5.0)	14 (57.4±6.3)
10 ⁻⁵	24	0 (0)	11 (45.8±4.2)	13 (54.2±4.2)
10 ⁻⁴	26	0 (0)	15 (58.5±5.2)	11 (41.5±5.2)**
10 ⁻³	28	2 (5.0±5.0)	12 (45.6±8.5)	14 (49.4±6.8)
10 ⁻²	32	0 (0)	20 (62.6±1.4)	12 (37.4±1.4)**
10 ⁻¹	23	0 (0)	15 (65.5±2.7)	8 (34.5±6.0)**

^a The oocyte-cumulus complexes (occ) were preincubated for 1 hour in the medium containing 3 mM hypoxanthine and cultured for 30 minutes in plain medium, and then transferred to the HMG medium (10⁻⁷ µg/ml~10⁻¹ µg/ml), cultured further for 18 hours.

^b Values are means ± SE.

**p<0.01

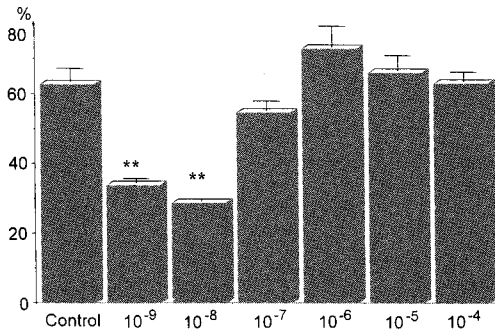


Fig. 2. Effect of Metrodin on the rate of maturation of cumulus cell-enclosed oocytes. **p<0.01

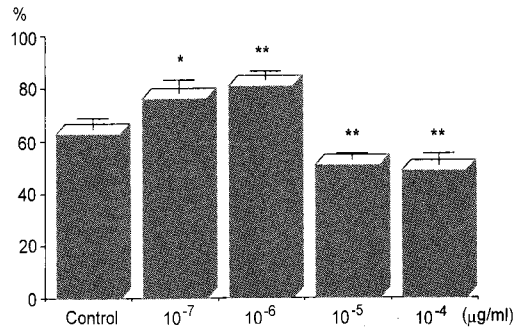


Fig. 3. Effect of HMG on the rate of maturation of cumulus cell-enclosed oocytes.

**p<0.05, **p<0.01.

µg/ml~10⁻⁵ µg/ml의 실험군에서는 난자의 성숙에 유의한 영향을 미치지 않은 것으로 보였다 (Table 2, Fig. 2).

3) HMG

HMG (10⁻⁷ µg/ml~10⁻⁴ µg/ml)에서 미성숙 난자-난구 복합체를 배양하여 난자의 성숙율을 조사하였다. 난자가 전기 I에까지 성숙한 것은 대조군이 3.7%, 10⁻⁷ µg/ml~10⁻⁴ µg/ml 농도 범위에서 1.5%, 0%, 2.8%, 0%였으며, 난자가 중기 I에까지 성숙한 것은 대조군에서 33.7%, 10⁻⁷ µg/ml~10⁻⁴ µg/ml 농도에서 각각 22.7%, 19.3%, 46.8%, 51.8%였다. 난자가 중기 II에까지 성숙한 난자의 성숙율은 대조군에서 62.6%였으며, 10⁻⁷ µg/ml와

10⁻⁶ µg/ml 농도 범위에서는 난자의 성숙율이 상승하여 75.8%, 80.7%의 성숙율을 보였으나, 10⁻⁴ µg/ml~10⁻⁵ µg/ml에서는 억제되어 48.2%, 50.4%로 나타났다 (Table 3, Fig. 3). 이로부터 배양액내의 HMG는 중기 II에까지 도달하는 난자의 성숙율이 10⁻⁵ µg/ml~10⁻⁴ µg/ml의 실험군에서는 난자의 성숙에 유의한 저해를 보였으나 10⁻⁷ µg/ml~10⁻⁶ µg/ml에서는 난자의 성숙율을 유의하게 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 CC는 낮은 농도에서는 난자의 성숙을 억제하고 높은 농도 (10⁻⁷ µg/ml~10⁻⁴ µg/ml)에서는 난자의 성숙에 유의한 영향을

Table 3. Effect of HMG on the rate of maturation of cumulus cell-enclosed oocytes^a

Group ($\mu\text{g/ml}$)	Total	No. of oocytes (percent)		
		Prophase I	Metaphase I	Metaphase II
Control	91	4 (3.7 \pm 2.2) ^b	30 (33.7 \pm 3.8)	57 (62.6 \pm 4.0)
10 ⁻⁷	47	1 (1.5 \pm 1.47)	11 (22.7 \pm 4.9)	35 (75.8 \pm 5.3)*
10 ⁻⁶	46	0 (0)	10 (19.3 \pm 1.86)	36 (80.7 \pm 3.3)**
10 ⁻⁵	40	1 (2.8 \pm 2.8)	19 (46.8 \pm 1.86)	20 (50.4 \pm 2.6)**
10 ⁻⁴	48	0 (0)	25 (51.79 \pm 5.0)	23 (48.2 \pm 5.0)**

^a The oocyte-cumulus complexes (OCC) were preincubated for 1 hour in the medium containing 3 mM hypoxanthine and cultured for 30 minutes in plain medium, and then transferred to the HMG medium (10⁻⁷ $\mu\text{g/ml}$ ~10⁻⁴ $\mu\text{g/ml}$), cultured further for 18 hours.

^b Values are means \pm SE.

*p<0.05, **p<0.01

Table 4. Development of embryos from 2-cell stage during culture with Ham's F-10 media of milli Q (3^o) water

Stage	2 cell	3-4 cell	5-8 cell	Morula	Blastocyst	Expanded B.	Hatching	Fragment	Irregular
Hours	No. (%)								
24	30	4 (13.3 \pm 8.6)	20 (66.7 \pm 5.6)	5 (16.7 \pm 2.7)					1 (3.3 \pm 2.3)
48	30	2 (6.7 \pm 4.8)	10 (30.0 \pm 13.6)	5 (16.7 \pm 10.2)	7 (23.3 \pm 10.2)	5 (16.7 \pm 13.8)			1 (3.3 \pm 2.3)
72	30	10 (3.3 \pm 5.1)	7 (23.0 \pm 13.6)		3 (10.0 \pm 5.3)	10 (30.0 \pm 14.4)	5 (16.7 \pm 8.2)	3 (10.0 \pm 5.4)	1 (3.3 \pm 2.3)
96	30					14 (46.7 \pm 7.0)	1 (3.3 \pm 2.8)	15 (50.0 \pm 1.1)	

B: blastocyst

미칠 수 없으며, Metrodin은 높은 농도에서는 난자의 성숙을 억제하고 낮은 농도 (10⁻⁷ $\mu\text{g/ml}$ ~10⁻⁵ $\mu\text{g/ml}$)에서는 난자의 성숙에 유의한 영향이 없는 것으로 보인다. HMG는 높은 농도에서는 난자의 성숙을 억제하나 낮은 농도 (10⁻⁷ $\mu\text{g/ml}$ ~10⁻⁶ $\mu\text{g/ml}$)에서는 난자의 성숙을 유의하게 증가시키므로 HMG가 포함된 배양액에서 난자를 배양할 때 난자의 성숙율이 가장 좋은 것으로 나타났다 (Fig. 4).

2. 배양액

배아의 발달율을 높일 수 있는 간편하고 좋은 배양액을 구하고자 다음 몇가지 배양액을 비교 조사하였다.

1) Milli Q (3차) 물로 제조한 Ham's F-10 배양액
배아의 발달 정도를 알기 위해 milli Q (3차) 물로 제조한 Ham's F-10 배양액에 BSA를 0.4% 첨가하여 2세포기 배아를 배양하였다 (Table 4). 24시간 후 66.7%가 3~4세포기에, 16.7%가 5~8세포기로 난할되었다. 48시간 후 16.7%가 5~8세포

Table 5. Development of embryos from 2-cell stage during culture with Ham's F-10 media of HPLC water

Stage	2 cell	3-4 cell	5-8 cell	Morula	Blastocyst	Expanded B.	Hatching	Fragment	Irregular
Hours	No.	No. (%)		No. (%)		No. (%)		No. (%)	
24	42	12 (28.6 ±10.0)	24 (57.1 ±11.3)	6 (14.3 ±4.1)					
48	42	8 (19.0 ±8.1)	12 (28.6 ±3.9)	5 (11.9 ±4.1)	7 (40.5 ±6.7)		5 (11.9 ±4.3)	2 (4.8 ±3.9)	
72	42	7 (16.7 ±7.7)	7 (16.7 ±6.5)	2 (4.8 ±2.3)	7 (16.7 ±12.2)	9 (21.4 ±5.0)	5 (11.9 ±4.3)	2 (4.8 ±3.9)	
96	42	2 (4.8 ±3.9)	2 (4.8 ±3.9)			4 (9.5 ±4.9)	12 (28.6 ±4.0)	3 (7.1 ±5.9)	19 (45.2 ±11.4)

HPLC: high performance liquid chromatography, B: blastocyst

기에, 23.3%가 상실배에, 16.7%가 배포까지 난할되었다. 72시간 후에는 30%가 배포에, 16.7%가 확산된 배포까지 난할되었다. 96시간 후에는 46.7%가 확산된 배포에, 3.3%가 부화하였다.

이 결과 Milli Q (3차) 물로 제조한 Ham's F-10 배양액에서 2세포기 배아를 배양하면 96시간 후에는 50.0%가 배포이상까지 발달하는 것을 알 수 있었다.

2) HPLC용 (Baxter) 물로 제조한 Ham's F-10 배양액

HPLC용 (Baxter) 물로 제조한 Ham's F-10 배양액에서 2세포기 배아의 발달 정도를 알아보기 위해 BSA를 0.4% 첨가하여 2세포기 배아를 배양하였다 (Table 5). 24시간 후 57.1%가 3~4세포기에 14.3%가 5~8세포기로 난할되었다. 48시간 후 11.9%가 5~8세포기에, 40.5%가 상실배로 난할되었다. 72시간 후 16.7%가 상실배에, 21.4%가 배포로 발달되었다. 96시간 후에는 9.5%가 배포로, 28.6%가 확산된 배포로, 7.1%가 부화하였다.

이 결과 HPLC용 (Baxter) 물로 제조한 Ham's F-10 배양액에 2세포기 배아를 96시간 배양하면 45.2%가 배포이상부터 부화까지 난할되는 것을 알 수 있었다.

3) Medicult 배양액

Medicult 배양액에서 배아의 발달 정도를 알아보기 위해 2세포기 배아를 배양하여 보았다 (Ta-

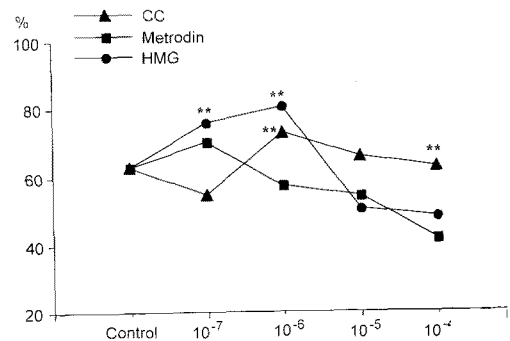


Fig. 4. Comparison of various ovulation induction medicine on the metaphase II oocytes. **p<0.01.

ble 6). 24시간 후 57.1%가 3~4세포기로, 4.8%가 5~8세포기로, 2.4%가 상실배로 난할되었다. 48시간 후 14.3%가 5~8세포기로, 42.9%가 상실배로, 23.8%가 배포로 발달하였다. 72시간 후 19.0%가 상실배, 14.3%가 배포로 42.9%가 확산된 배포로 발달하였다. 96시간 후 14.3%가 배포로, 16.7%가 확산된 배포로, 40.5%가 부화되었다.

이 결과로 Medicult 배양액에서 2세포기 배아를 96시간 배양하였을 때 71.5%가 배포이상 부화까지의 단계로 발달하는 것을 알 수 있었다.

4) HTF 배양액

HTF 배양액에서 배아의 발달 정도를 알아보

Table 6. Development of embryos from 2-cell stage during culture with media of Medicult

Stage	2 cell	3-4 cell	5-8 cell	Morula	Blastocyst	Expanded B.	Hatching	Fragment	Irregular
Hours No. (%)									
24	42	15 (35.7 ±14.3)	24 (57.1 ±23.8)	2 (4.8 ±3.9)	1 (2.4 ±6.7)				
48	42	2 (4.8 ±1.7)	5 (11.9 ±4.9)	6 (14.3 ±18.7)	18 (42.9 ±23.8)	10 (23.8 ±9.5)		1 (2.4 ±6.1)	
72	42	2 (4.8 ±8.0)	4 (9.5 ±5.8)	2 (4.8 ±6.2)	8 (19.0 ±6.1)	6 (14.3 ±9.0)	18 (42.9 ±28.9)	1 (2.4 ±6.1)	1 (2.4 ±3.9)
96	42				6 (14.3 ±5.2)	7 (16.7 ±28.2)	17 (40.5 ±16.4)	12 (28.6 ±17.4)	

B: blastocyst

Table 7. Development of embryos from 2-cell stage during culture with media of HTF

Stage	2 cell	3-4 cell	5-8 cell	Morula	Blastocyst	Expanded B.	Hatching	Fragment	Irregular
Hours No. (%)									
24	23	16 (69.6 ±16.7)	5 (21.7 ±12.8)	2 (8.7 ±5.8)					
48	23	1 (4.3 ±6.6)		15 (65.2 ±23.4)	4 (17.4 ±14.8)	3 (13.0 ±6.7)			
72	23	1 (4.3 ±6.7)		2 (8.7 ±5.8)	3 (13.0 ±7.1)	16 (69.6 ±23.2)		1 (4.3 ±6.7)	
96	23				1 (4.3 ±6.7)	4 (17.4 ±11.6)	17 (73.9 ±23.8)	1 (4.3 ±6.7)	

HTF: human tubal fluid, B: blastocyst

기 위해 1% human serum albumin (HSA)을 첨가하여 배양하여 보았다 (Table 7). 24시간 후 69.6%가 3~4세포기로, 21.7%가 5~8세포기로 8.7%가 상실배로 발달하였다. 48시간 후 65.2%가 상실배로, 17.4%가 배포로, 13.0%가 확산된 배포로 발달하였다. 72시간 후 13.0%가 배포로, 69.6%가 확산된 배포로 발달하였다. 96시간 후 4.3%가 배포로, 17.4%가 확산된 배포로, 73.9%가 부화하였다. 이

결과 HTF 배양액에 2세포기 배아를 96시간 배양하였을 때 95.6%가 배포이상 부화까지의 단계로 발달하는 것을 알 수 있었다.

이상의 성적으로 체외에서 2세포기 배아를 96시간 배양하였을 때 Medicult 배양액과 HTF 배양액에서 높은 배아발달을 보였으며, 특히 HTF 배양액에서 2세포기 배아를 배양하였을 때 가장 높은 배아발달을 보이는 것으로 나타났다 (Fig. 5).

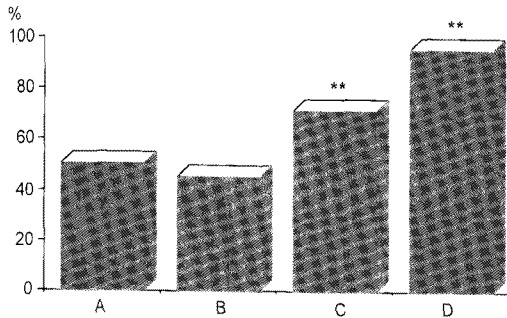


Fig. 5. Development of embryos in various culture media for 96 hr (Blastocyst ~ hatching).

**p<0.01

A. Ham's F-10 media of mili Q (3°) water, B. Ham's F-10 media of HPLC, C. Medicult media, D. HFT media.

고 찰

Trounson이 CC를 이용한 주기에서 배아를 여러개 이식하여 임신에 성공한 이후로 여러개의 난자를 얻기위해 다양한 과배란유도제들이 사용되어지고 있다. 체외수정기술에서 과배란유도의 목적은 많은 수정란을 얻는데 있다. 배란유도제에 대한 반응은 개인차를 보이며 약제의 종류나 용량 및 hCG 투여 기준에 따라 난자의 질이 달라지므로 이에 따른 수정률 및 임신률의 차이가 있을 수 있다.

CC는 E2 결합 수용체 (E2-binding receptors)의 경쟁적인 저해제로써 작용하고 자궁내막 수용체를 변형시키는 antiestrogen으로 알려져 있으며 다낭성 난소 증후군과 만성적 무배란의 여러 다른 상황을 가진 여성의 배란을 유도하는데 고도로 효과적인 estrogen agonist-antagonist이다. 과거 30년 동안 CC의 많은 사용에도 불구하고 CC에 대한 작용기전은 대부분이 알려져 있지 않고 있다. 정상 생리주기의 초기 난포기와 황체기에서는 CC를 위한 시상하부의 위치가 확인되었으며 이들 연구에서 CC는 LH pulse 폭에 변화없이 LH pulse 빈도에 증가를 유도하는 것으로 증명되었다. CC는 효능있는 nonsteroidal estrogen인 diethylstilbestrol (DES)과 구조적으로 유사한 nonsteroidal agent로, 이 구조적인 유사성 때문에 표적세포의 estrogen 수용체와 상호작용을 하며 약한 estrogen의 그리고 강한 antiestrogen의 활성을 발휘한다. CC에 노

출되어질 때에 아마도 catecholaminergic neuron system인 시상하부는 CC가 시상하부의 수용체부위로부터 내인성 estrogen과 대체되기 때문에 내인성 estrogen의 수준을 인식할 수는 없으며 이 상황에서 시상하부는 성선자극호르몬 분비호르몬 (GnRH)의 분비를 위해 활성화되어진다. 증가된 GnRH 자극은 뇌하수체로부터 성선자극호르몬 분비를 자극하며 그 결과로 난포성장과정은 난소내에서 증진되어진다. 그러므로 증가된 난포 호르몬산출과 많은 난포의 발달은 임신의 기회를 증가시키는데 유리한 영향을 갖는다. 그러나 이들은 가끔 메스꺼움, 구토, 난소과자극, 다태임신과 같은 문제를 유발할 수도 있다. 이러한 부작용 외에 배란유도의 높은 효능에도 불구하고 CC는 기대되어지는 만큼 빈번하게 임신이 일어나지는 않는다는 점이다. CC가 경우에 따라 정상주기 여성에서 사용된다 할지라도 1차적인 임상적 이용은 무배란 여성에 쓰인다. 다낭성 난소 증후군을 가진 여성에서 초기연구는 CC에 반응하는 난소의 스테로이드호르몬 생성과 성선자극호르몬의 배란양상을 비교 조사한 것이었으나 그 작용에 대한 시상하부-뇌하수체 부위의 평가가 이루어진 것은 아니었다. 또한 CC는 무배란 이외의 불임증에도 많이 이용되어지고 있으며 황체기 기능부전의 발생과 관련되어서도 사용되고 있다.

HMG는 Gemezell 등이 인간의 뇌하수체로부터 추출한 성선자극호르몬으로 Garcia 등이 처음으로 정상주기를 갖는 여성에서 과배란유도를 위해 사용하기 시작한 이후 폐경기여성의 소변에서 FSH와 LH가 다량 존재함을 발견하고 이를 분리하여 추출한 성선자극호르몬으로 FSH와 LH를 1:1의 비율 즉 각각 75 IU씩 포함하고 있다 (Menotropin). HMG는 난소의 기능은 있으며 성선자극호르몬의 분비가 적은 시상하부 무월경, 무배란, 황체기 결함이 있는 경우, 원인 불명의 불임인 경우, 기타 CC로 배란유도가 실패한 경우 등에 사용되고 있다.

Human Urinary FSH (Metrodin)는 LH를 제거한 순수한 FSH로, 75 IU FSH와 1 IU 미만의 LH를 포함하고 있으며 내인성 성선자극호르몬의 분비가 있는 시상하부 무월경의 여성에게 많이 사용하고 있다. FSH와 HMG 사이에 편견이 대두되고 있는데 이는 성선자극호르몬의 분비가 각기 다른 날에 시작되어지기 때문에 생기는 것으로 HMG군에서 투여는 MCD 3에 시작하며 FSH군에서는

MCD 2에 시작한다. Protocol의 작은 차이에 의해 산출되어지는 편견으로 알려지고 있으며 HMG를 더 선호하기도 하는데 이는 외인성 LH에 노출되는 총량이 제 2일에 출발하는 것보다 약간 더 낮기 때문이다. 결론적으로 LH의 반대영향이 더 낮은 것이 FSH와 HMG사이에 임신율의 작은 차이를 초래할 수 있다는 견해도 있다.

본 실험에서는 각 배란유도제는 배란유도제의 농도가 높아도 (Metrodin과 HMG에서는 10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ 이상) 난자의 성숙이 저해되며, 배란유도제의 농도가 낮아도 (CC에서 10^{-8} $\mu\text{g/ml}$ 이하) 난자의 성숙을 유발할 수 없는 것으로 나타났으며, CC는 낮은 농도에서는 난자의 성숙을 억제하고, 높은 농도인 10^{-7} $\mu\text{g/ml}$ ~ 10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ 에서는 난자의 성숙에 유의한 영향을 미칠 수 없는 것으로 나타났다. Metrodin은 높은 농도에서는 난자의 성숙을 억제하며, 낮은 농도인 10^{-7} $\mu\text{g/ml}$ ~ 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$ 에서도 난자의 성숙에 유의한 영향을 미칠 수 없는 것으로 나타났다. 또한 HMG는 높은 농도에서는 난자의 성숙을 저해하나, 낮은 농도인 10^{-7} $\mu\text{g/ml}$ ~ 10^{-6} $\mu\text{g/ml}$ 에서는 난자의 성숙에 유의한 영향을 발휘하는 가장 좋은 배란유도제로 나타났다. 이것은 난자의 성숙을 유도하기 위해서는 적정량의 호르몬이 필요한 것을 의미하며 그 이상 많거나 적을 때에는 난자의 성숙을 유발하지 못하거나 오히려 저해할 수 있는 요인으로 작용함을 시사하므로 각 배란유도제의 투여용량은 난소에서 난포성장의 정도를 보아가며 또한 전 주기의 반응정도에 따라 다음 주기의 용량을 결정해야 될 것으로 보였으며 배란유도제와 이것의 농도 선택이 난자의 성숙에 중요한 영향을 미치며 과다한 용량은 난자의 발생 및 난자성숙 즉 난자의 질에 오히려 해로운 영향을 미칠 수 있는 큰 요인으로 작용될 수 있음을 나타내고 있다. 또한 본 실험은 체외수정 및 배아 이식에 사용되는 몇가지 배양액에서 배아발달 정도를 비교 조사하였다. 즉 배양액으로 서로 다른 물을 사용하여 만든 Ham's F-10 배양액과 상업용으로 제조되어 시간과 복잡성을 줄이고 간편하게 공급받을 수 있는 최근 시판되고 있는 Medicult 배양액, HTF 배양액을 본 실험의 대상으로 사용하였다. Milli Q (3차)로 만든 Ham's F-10 배양액에서 생쥐 2세포기 배아를 배양할 때 96시간 후 배포이상의 발달이 50.0%인 것은 많은 불순물이 함유된 물이기 때문일 것으로 추측되었다.

HPLC용 (Baxter) 물로 제조한 Ham's F-10 배양액에서는 96시간 후 배포이상의 발달이 45.2%인 것은 이 물이 수입되어 유통되는 과정에서 시간이 경과하면서 그 질이 떨어지기 때문에 배아발달율이 저조한 것으로 추측되었으나 향후 확인되어야 될 것으로 사료되었다. Medicult 배양액에서 96시간 배양 후 배포이상의 발달은 71.5%로 나타났으며, HTF 배양액에서는 95.6%로 나타났다. 이것은 상업용 배양액이 빠른 유통경로를 거쳐 바로 사용될 수 있다면 좋은 배양액으로 간편하게 이용될 수 있는 배양액으로 사료되었다.

결 론

각 배란유도제에 따른 난자의 성숙율을 조사하였으며, 또한 각 배양액에 따른 배아발달의 정도를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CC를 포함한 배양액에서 미성숙 난자-난구 복합체를 배양하였을 때 낮은 농도 (10^{-9} $\mu\text{g/ml}$ ~ 10^{-8} $\mu\text{g/ml}$)에서는 난자의 성숙율이 억제되었으며 (28.2~33.7%) 그 이상의 높은 농도 (10^{-7} $\mu\text{g/ml}$ ~ 10^{-4} $\mu\text{g/ml}$)에서도 난자의 성숙율에 유의한 영향이 없었다 (54.5~72.7%).

2. Metrodin을 포함한 배양액에서 미성숙 난자를 배양하였을 때 높은 농도 (10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ ~ 10^{-1} $\mu\text{g/ml}$)에서 난자의 성숙이 억제되었으며 (34.5%~41.5%) 낮은 농도에서도 (10^{-7} $\mu\text{g/ml}$ ~ 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$) 난자의 성숙율에 유의한 영향이 없었다 (54.2%~70.3%).

3. HMG를 포함한 배양액에서 미성숙 난자를 배양하였을 때 높은 농도에서는 (10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ ~ 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$) 난자의 성숙율에 억제를 보였으며 (48.2%~50.4%), 낮은 농도 (10^{-7} $\mu\text{g/ml}$ ~ 10^{-6} $\mu\text{g/ml}$)에서는 난자의 성숙율을 유의하게 증가시켰다 (75.8%~80.7%).

4. 각 배양액에서 2세포기 배아를 96시간 배양하였을 때 milli Q (3차) 물로 만든 Ham's F-10 배양액에서 50.0%, HPLC용 (Baxter) 물로 만든 Ham's F-10 배양액에서 45.2%, medicult 배양액에서 71.5%, HTF 배양액에서 95.6%의 배아발달을 보였다.

이상과 같이 각 배란유도제에서 미성숙 난자-난구 복합체를 배양할 때 HMG를 포함한 배양액에서만 유의한 난자 성숙율의 증가를 보였다. 또한 2세포기 배아를 체외배양 할 때 상업용 Medi-

cult나 HTF 배양액이 배아발달을 위해 사용될 수 있는 좋은 배양액으로 사료되었다.

인 용 문 헌

- Adashi EY: Clomiphene citrate: mechanism(s) and site(s) of action—a hypothesis revisited. *Fertil Steril* 1984, 42: 331-344.
- Brinster RL: A method for in vitro cultivation of mouse from two-cell to blastocysts. *Exp Cell Res* 1963, 32: 205-208.
- Clark JH, Markaverich BM: The agonistic-antagonistic properties of clomiphene: a review. *Pharmacol Ther* 1982, 15: 467-519.
- Clark JH, Peck EJ, Anderson JN: Oestrogen receptors and antagonism of steroid hormone action. *Nature* 1974, 251: 446-448.
- Daya B, Collins JA, Gunby J, Sagle MA, Hughes EG: Follicle stimulating hormone versus human menopausal gonadotropin for in vitro fertilization cycles: a meta analysis. *Fertil Steril* 1985, 64: 347-354.
- Dickey RP, Olar TT: Clomiphene citrate-induced intrauterine insemination cycles. *Assist Reprod Rev* 1993, 3: 108-120.
- Dickey RP, Olar TT, Taylor SN, Cuore DN, Rye PH: Sequential clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin for ovulation induction: Comparison to clomiphene citrate alone and human menopausal gonadotropin alone. *Hum Reprod* 1993, 8: 56-59.
- Fisch P, Casper RF, Brown SE, Wrixon W, Collins JA, Reid RL and Simpson C: Unexplained infertility: evaluation of treatment with clomiphene citrate and human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 1989, 51: 828-833.
- Fritz MA, Speroff L: The endocrinology of the menstrual cycle: in the interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms. *Fertil Steril* 1982, 38: 509-529.
- Garcia JE, Jones GS, Acosta AA, Wright GL Jr: Human menopausal gonadotropin / human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: Phase I, 1981. *Fertil Steril* 1983, 39: 174-179.
- Judd SJ, Alderman J, Bowden J, Michailov L: Evidence against the involvement of opiate neurons in mediating the effect of clomiphene citrate on gonadotropin-releasing hormone neurons. *Fertil Steril* 1987, 47: 574-578.
- Keenan JW, Herbert CM, Bush JR, Wentz AC: Diagnosis and management of out-of-phase endometrial biopsies among patients receiving clomiphene citrate for ovulation induction. *Fertil Steril* 1989, 51: 964-967.
- Kerin JF, Liu JH, Phillipou G, Yen SSC: Evidence for a hypothalamic site of action of clomiphene citrate in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1985, 61: 265-268.
- Kokko E, Janne O, Kauppila A, Vihko R: Cyclic clomiphene citrate treatment lowers cytosol estrogen and progesterin receptor concentration in the endometrium of postmenopausal women on estrogen replacement therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1981, 52: 345-349.
- Maraucic M, Casper RF: The effect of luteal phase estrogen antagonism on luteinizing hormone pulsatility and luteal function in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1987, 64: 148-152.
- 노효섭, 정영주, 조한구, 박환규, 송완례, 이기숙, 김종덕: Hypoxanthine과 ovarian steroids가 생쥐난자 성숙에 미치는 영향. 대한불임학회지 1994, 21: 191-200.
- Ronnberg L, Isotalo H, Kauppila A, Martikainen H, Vihko R: Clomiphene-induced changes in the endometrial receptor kinetics on the day of ovum collection after ovarian hyperstimulation: a study on cytosol and nuclear estrogen and progesterin receptors and 17 β hydroxysteroid dehydrogenase. *Ann NY Acad Sci* 1985, 442: 408-415.
- Rosenberg SM, Luciano AA, Riddick DH: The luteal phase defect: the relative frequency of, and encouraging response to, treatment with vaginal progesterone. *Fertil Steril* 1980, 34: 17-20.
- Stephens PC, Edwards RG: Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978, 2: 366.
- Taylor SN, Cuore DN and Rye PH: Relationship of follicle number and other factors to fecundability and multiple pregnancy in clomiphene citrate-induced intrauterine insemination cycles.

Fertil Steril 1992, 57: 613-619.

Testart J, Belaisch-Allart J, Frydman R: Relationships between embryo transfer results and ovarian response and in vitro fertilization rate: analysis of 186 human pregnancies. *Fertil Steril* 1986, 45: 237-243.

Trounson AO, Leeton JF, Wood C, Weeb J, Wood J: Pregnancies in humans by fertilization in vitro and embryo transfer. *Science* 1981, 212: 681.

Wood C, McMaster R, Rennie G, Trounson A, Leeton J: Factors influencing pregnancy rates following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1985, 43: 245-250.

Yen SSC, Vela P, Ryan KJ: Effect of clomiphene citrate in polycystic ovary syndrome: relationship between serum gonadotropin and corpus luteum formation. *J Clin Endocrinol Metab* 1970, 31: 7-13.