

배양액 용량이 B6D2F1 마우스 배아발생능력에 미치는 영향

유창석^{1,*} · 박기상^{1,2} · 서병부^{1,3,†}

¹대구대학교 동물자원학과, ²경북대학병원 산부인과, ³대구대학교 생명환경연구소

Effect of Different Volume of Microdrop Culture on B6D2F1 Mice Oogenesis

Chang-Seok Yoo^{1,*}, Kee Sang Park^{1,2} and Byoung Boo Seo^{1,3,†}

¹Dept. of Animal Resources, Daegu University, Gyeongbuk 38453, Korea

²Dept. of Obstetrics and Gynecology, Kyungpook National University Hospital, Daegu 41944, Korea

³Institute of Life and Environment, Daegu University, Gyeongbuk 38453, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effects of different volume (100 μ l vs. 2 ml) of microdrop culture on B6D2F1 mice oogenesis. In the present study, B6D2F1/CrljOri F₁ mice were utilized in order to maximize oogenesis. Also we used TCM-199, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), embryo culture medium (Fertilization medium, Cleavage medium, Blastocyst medium), G series medium and One step medium. Blastulation rate was not different between groups (58.4 \pm 2.9% vs. 61.2 \pm 4.8%). Zona hatched rate (38 \pm 15.4% vs. 27 \pm 3.4%) and attached rate (55 \pm 13.9% vs. 46 \pm 3.9%) did not differ by the volume of culture media. Total cell numbers (59.8 \pm 9.7 vs. 70.3 \pm 8.7), ICM cell numbers (15.8 \pm 0.6 vs. 16.8 \pm 1.5), TE cell numbers (44.0 \pm 9.7 vs. 53.6 \pm 7.3), % ICM (26.4 \pm 2.9% vs. 23.8 \pm 3.3%) and ICM:TE ratio (1: 2.8 \pm 0.4 vs. 1: 3.2 \pm 0.6) were not different between groups (i.e., 100 μ l vs. 2 ml). These results show that the capacity of the culture medium did not effect the cell numbers of B6D2F1 mice blastocysts. In summary, these results can provide fundamental data to maximize culture condition for *in vitro* fertilization on B6D2F1 mice.

(Key words : B6D2F1 mice, microdrop culture, oogenesis, inner cell mass, trophectoderm)

서 론

1969년 인간 난자를 이용하여 세계 최초로 체외수정을 성공한 이래 시험관아기 기술을 이용하여 1978년 처음으로 인간의 아기가 태어났다(Chang 등, 1986). 이후 전 세계적으로 수많은 기관에서 인공수태시술을 시행하고 있으나, 아직도 체외수정술을 이용한 임신 성공률의 향상에는 한계가 있는 것이 사실이다. 임신 성공에 영향을 미치는 요인으로는 여성 환자의 나이 또는 건강상태 불임요인, 시술자의 경험, 환경적 요인(배양실 온도, 습도, 배양기, 장비 등)이 있다(Ashworth 등, 2009). 또한 미성숙난자를 이용한 체외수정시술로 많은 출생이 보고되고 있으나, 아직까지 그 성공률은 과배란 유도 후 얻은 성숙난자를 이용한 체외수정시술에 비하면 많이 낮은 것으로 알려져 있다(De Vos 등, 1999). 미성숙 난자의 성숙을 유도하기 위해서는 외인성 성선자극호르몬(Exogenous gonadotropin) (Park 등, 1994a, 1994b, 1994c; Greve 등, 1995; Meyer 등, 1999)이나

성장인자(Growth factor) (Uhm 등, 2010), 단백질원을 투여하여 배양하거나, 생식기관의 상피세포(Uterine epithelial cell)나 난포에서 얻은 과립막 세포(Granulosa cell) 또는 vero cell과 함께 공배양을 하여 성숙을 유도하였다(Kim 등, 1995; Kim 등, 2002; Moulavi 등, 2006). 또한 성숙 과정에서 불완전한 배양액의 조성때문에 투명대 경화 현상이 일어나 수정이 잘 되지 않거나, 수정에 실패하는 경우가 발생하기도 한다(Park 등, 2000). 수정이 된다고 하더라도 이후 배아 발달이 저조할 수 있다. 또한 난자성숙 과정에서 난자 세포질 내에 미토콘드리아의 이상으로 인한 모계유전질환을 물려받게 될 수 있다(Holt 등 1990). 이와 같은 조건으로 배양과정에서 적절한 배양 조성 환경을 확보하고, 우수한 난자를 체외성숙배양하여 수정을 실시하게 됨으로써 건강한 아이의 출산과 체외수정을 위한 난자의 수를 최대한 확보할 수 있고, 또 경제적인 측면에서 대체적으로 가격이 비싼 배란촉진제의 비용을 줄일 수 있으며, 환자의 난소 과잉 자극증후군의 빈도 또한 줄일 수 있으며, 미성숙 상

This research was supported by the Daegu University Research Grant, 2013.

* Present address: Mama Papa & Baby, Ulsan, Korea

† Correspondence : duanimal@daum.net

태의 난자나 수정 후 배아의 동결보존을 함으로써 임신 성공률을 높일 수 있다고 보고하였다(Park 등, 1994a, 1994b; Kim 등, 1995; Han 등, 2006).

다양한 방법으로 난자 또는 배아를 배양하고 있으며, 이들 배양 방법 중 배양액 용량이 많으면 배아 발달을 저하시킨다고 보고하였으나(Paria 등, 1990), Roh 등(2005)은 배양액 용량이 너무 적으면 배아에서 생산되는 대사산물과 유리 산소가 축적되어 발달에 해로운 영향을 끼친다고 보고하였다. 또한 배양액 용량과 배아 발생 능력 간에는 상관관계가 없다는 보고(Kim과 Park, 2004)도 있어서 배양액 용량에 대해서도 논란의 여지가 많다. 이와 같이 마우스 난자와 정자를 체외 수정한 후 효율적인 수정란 배양에 있어서 적절한 배양액 용량에 관하여 다양한 의견이 존재한다. 한편, B6D2F1 마우스는 다른 마우스와 달리 2세포기에서 배반포까지의 발달율이 좋은 마우스라고 알려져 있다. 그러므로 B6D2F1 마우스를 이용하면 보다 효율적인 배반포배를 생산하여 다양한 기초 실험을 수행할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 B6D2F1 마우스 난자에 있어서 배양액 용량이 배아발생능력에 미치는 실험결과는 아직까지 발표되지 않고 있다. 한편, B6D2F1 마우스의 난자를 2 ml와 100 μ l의 그룹으로 나누어 배양한 후 배양액 용량이 배아발생능력에 미치는 영향에 관하여 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 국내에서 사육 중인 Hybrid 계통의 B6D2F1 마우스(모계:C57BL/6NcrIBR. 부계:DBA/2CrIBR)를 사용하였으며, 암컷은 생후 5~8주령, 수컷은 9~13주령인 것을 사용하였다(오리엔트바이오). 실험동물은 약 일주일동안 동물이 새로운 사육환경에 적응하고, 최소한의 스트레스를 받도록 적응기간을 두고 실험을 실시하였다. 실험동물 사육을 위해 명과 암 주기를 12:12(낮:7:00~19:00, 밤:19:00~7:00)로 조절하였고, 습도와 온도는 각각 40~50%, 22~24 $^{\circ}$ C로 유지하였다. 마우스는 실험에 사용하기 전까지 사료와 물을 무제한으로 공급하였으며, 마우스의 사양관리와 동물실험규정은 대구대학교 동물실험 윤리위원회의 규정(DUIACC-2014-02-0509-101)에 따라 실시하였다.

2. B6D2F1 마우스 배양액

G1 plus 배양액(Vitrolife, Sweden)과 Cleavage medium(CM)(COOK Medical, Australia)은 2PN~8세포기 단계까지 사용하였다. 그리고 G2 plus 배양액(Vitrolife, Sweden)과 Blastocyst medium(BM)(COOK Medical, Australia)은 8세포기에서 포배아 단계까지 사용하였다. 정자부유 배양액으로 GIVF(Vitrolife,

Sweden), 정자의 수정능획득과 체외수정 배양액으로 Fertilization medium(FM)(COOK Medical, Australia)을 사용하였다.

3. 마우스 난자의 준비

실험동물에 과배란을 유도하기 위하여 B6D2F1 암컷 마우스에 난자성숙실험 48시간 전 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG)(SIGMA, USA)를 5~8주령의 마우스에 5~7.5 IU를 투여하여 과배란을 유도하였으며, 실험의 정확성을 높이기 위해 호르몬을 오후 4시에 주사하였다. 호르몬 투여 48시간 후 경추탈골법으로 마우스를 희생한 뒤 난소를 회수하였으며, 회수한 난소 주변의 혈액과 지방은 멸균된 거즈로 최대한 제거한 후 2 ml의 PBS+20% FBS 용액이 들어있는 기관배양접시(Falcon, 3037, USA)로 옮긴 난소는 31 gauge가 부착된 1 ml 인슐린 주사기(BD, 328820, Ultra-Fine II, USA)를 사용하여 해부현미경(Leica MZ12.5, Switzerland)이 들어있는 IVF 챔버(Hoffman, C100-2, USA)내에서 난소 내 난포를 터뜨려 미성숙 난자를 채취하였다. 실험에 사용된 B6D2F1 암컷 마우스는 전부 150마리를 사용하였으며, 과배란 처리 후 평균 15~20개의 미성숙난자를 회수하였다.

4. 체외 성숙(In Vitro Maturation, IVM)

채취한 B6D2F1 마우스 난자는 다시 20%의 FBS가 함유된 PBS 용액에 세척한 다음 성숙배양에 이용하였다. 난자는 Fig. 1에서 보이는 바와 같이 난자-난구세포 복합체(COC, Cumulus-oocyte complexes), 난자-난구세포 일부 부착(CO, Cumulus-oocyte partial contact) 또는 나화난자(O, Denuded oocyte)와 같이 3가지로 분류하였다. 1) COC는 난자 주위에 난구세포가 조밀하고 균일하게 덮여있는 것으로, 2) CO는 난자 주위에 난구세포가 일부 덮여있는 것으로, 3) O는 난자 주위에 난구세포가 덮여있지 않은 것으로 하였다. 분류된 난자는 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 배양하였다. 난자의 체외성숙은 미네랄 오일(SAGE, Paraffin oil)이 도포된 50 μ l 또는 100 μ l 소적에서 배양하였으며, 난자의 성숙 배양은 약 19시간 실시하였다. 난자의 성숙 판단은 제 1 극체가 선명하게 보이는 것을 정상 성숙으로 판단하였으며, 극체가 여러 개이거나 거대 극체, 왜소 극체인 경우 또는 극체가 희미하게 보이는 경우에는 비정상 성숙으로 판정하였다.

5. 체외수정(In Vitro Fertilization, IVF)

체외수정은 난자 성숙이 시작된 이후 20시간째에 시작하였으며, 체외수정을 할 때마다 B6D2F1 마우스 수컷 한 마리씩 사용하였으며, 체외수정을 시작하기 전 B6D2F1 마우스 수컷 한 마리를 경추탈골법으로 도살 후 정소상체 미부만을 회수하였다. 회수한 정소상체 미부는 멸균된 거즈로 최대한 지방조직과

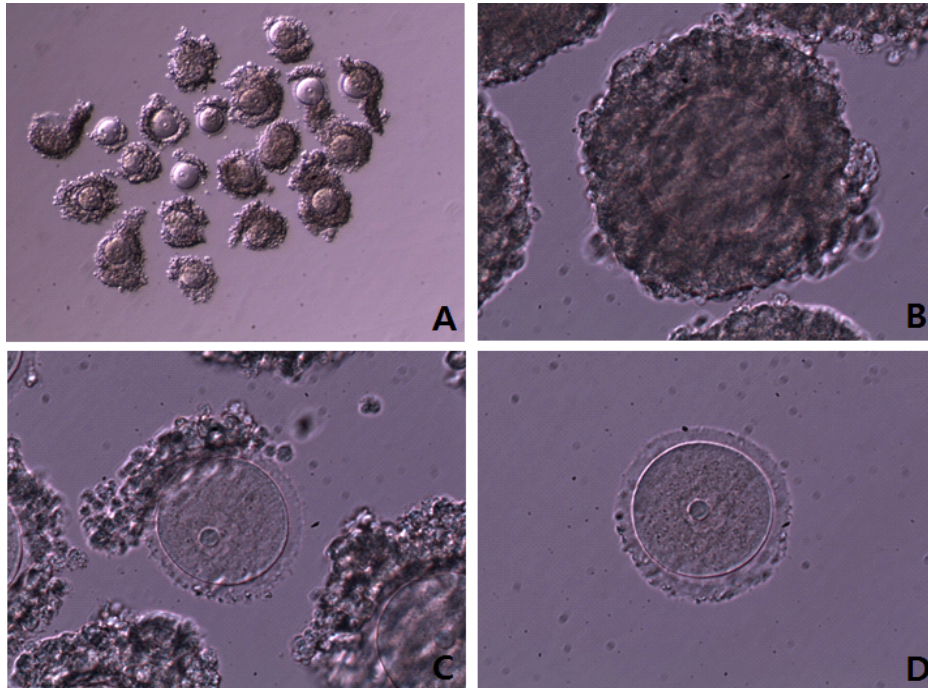


Fig. 1. Collected oocytes of B6D2F1 mice. (observed by differential Interference contrast microscope, Olympus BX-71, Japan). A: Collected oocytes ($\times 40$), B: COC (cumulus-oocyte complexes, $\times 200$), C: CO (cumulus-oocyte partial contact, $\times 200$), D: O (denuded oocyte, $\times 200$).

혈액을 제거한 후 0.5 ml 단백질원이 첨가되어 있지 않은 GIVF가 든 기관배양접시(Falcon, 3037, USA)에 옮긴 후 기관배양접시에 PBS가 담겨있는 out-well에서 한번 세척한 다음, IVF 챔버 내에서 해부현미경하에 해부용 핀셋과 31 gauge가 부착되어진 1 ml 인슐린주사기를 이용하여 정소상체미부 내에 있는 정자괴를 방출시키고, 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에 15분간 묻혀 있는 정자괴가 풀리도록 배양하였다. 15분 후 정자괴가 풀린 배양액을 0.5 ml의 단백질원이 첨가된 배양액에서 다시 37°C, 5% 또는 6% CO₂ 배양기 내에서 약 90분간 배양하여 수정능 획득을 유도하였다. 수정능 획득을 유도하는 동안 마클러 카운팅 챔버(Markler counting Chamber, Sefi medical instruments, Israel)를 이용하여 정자의 농도와 생존율을 평가하였다. 수정능 획득이 이루어지는 동안 성숙배양된 난자를 피펫팅 또는 1% Hyaluronidase를 이용하여 난구세포를 벗겨낸 후, 극체가 선명하고 뚜렷하게 보이는 난자를 수정에 이용하였다. 성숙된 난자는 1 ml 수정용 배양액이 든 배양접시에서 세척한 뒤 미네랄 오일이 도포된 50 μ l 또는 100 μ l의 수정용 배양액 소적에 옮겨졌다. 그리고 수정능 획득을 유도한 정자를 수정용 배양액 소적에 주입하였으며, 주입량은 생존정자 기준으로 2×10^6 /ml를 주입하였다.

6. 배아 배양(In Vitro Culture, IVC) 및 포배아의 이중형광염색
체외수정 확인은 수정 후 약 4~6시간 뒤에 실시하였다. 수

정 확인을 위해 난자를 세척하였으며, 세척용 배양액이 든 기관 배양 접시에서 난자 주위에 붙은 정자와 난구 세포 등 이물질을 제거하였다. 이물질이 제거된 난자는 체외배양용 배양액으로 옮긴 다음, 도립 미분간섭 현미경(BX-71, Olympus, Japan)을 보면서 응성전핵과 자성전핵의 유무를 보고, 수정을 확인하였다. 정확한 수정률 확인은 수정 후 약 24시간 뒤에 실시하였는데, 2세포 배아로 발달하면 수정된 것으로 확정하였다. 2세포기 배아는 5일 또는 7일간 배양하였다. 5일째는 포배아 단계에서 이중형광염색을 실시하여 내세포괴(Inner cell mass, ICM)와 영양배엽세포(Trophectoderm, TE)를 확인하였다. 7일간 배양한 경우에는 포배아의 투명대 탈출률과 투명대 탈출 포배아의 부착 유무를 확인하여 착상률을 간접적으로 측정하였다. 배양기간 중 2일에 한 번씩 신선 배양액으로 교환했으며, B6D2F1 마우스 포배아의 이중형광염색은 Park 등(2014)의 방법을 이용하였다.

7. 통계처리

실험에 대한 주관적인 관점을 배제하기 위해 실험 배치와 관찰은 완전임의 배치법을 실시하였다. 실험 결과는 백분율로 나타내었고, 불연속 변수에 대한 표준 오차(\pm SD)와 유의성 검정은 SAS 프로그램(Statistics Analytical System, version 9.4, USA)을 이용하여 처리하였다. 각 처리군간 유의성은 LSD와 Duncan 다중검정을 이용하여 5% 수준에서 검정하였다.

결 과

1. 배양액 용량(100 μ l와 2 ml)이 B6D2F1 마우스 2세포기 배아의 포배아 형성률에 미치는 영향

배양액 용량(100 μ l와 2 ml)이 B6D2F1 마우스 2세포기 배아의 포배아 형성률에 미치는 영향을 확인하기 위하여 미성숙 난자를 체외성숙시키고, 수정 후 24시간 뒤에 온전하게 할구가 분할된 2세포기의 배아만을 이용하여 실험에 이용하였다. 각 실험군당 10~15개의 배아를 배양하여 관찰하였으며, B6D2F1 마우스 2세포기 배아의 포배아 형성률의 결과는 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 보는 것과 같이, B6D2F1 마우스 포배아의 형성률은 100 μ l군에서 58.4 \pm 2.9%이고, 2 ml군에서 61.2 \pm 4.8%로 두 그룹간의 유의적인 차이는 나지 않았다.

2. 배양액 용량(100 μ l와 2 ml)이 B6D2F1 마우스 포배아 세포수에 미치는 영향

배양액 용량(100 μ l와 2 ml)이 B6D2F1 마우스 포배아 세포수에 미치는 영향을 확인하기 위하여 B6D2F1 마우스 수정 후 배양 5일째 되는 날 이중형광염색을 실시하였으며, 그 결과는 Table 2에 제시하였다. 100 μ l와 2 ml 배양액의 용량에 따른 B6D2F1 마우스 포배아의 ICM 세포 수는 각각 15.8 \pm 0.6개와 16.8 \pm 1.5개, TE 세포 수는 각각 44.0 \pm 9.7개, 53.6 \pm 7.3개로 두 군간 유의적인 차이는 확인할 수 없었으나, 2 ml군에서 많은 수의 TE 세포를 확인할 수 있었으며, 총 세포 수는 각각 59.8 \pm 9.7개, 70.3 \pm 8.7개로 2 ml군이 많은 결과를 보였으나, 유의적인 차이는 나지 않았다. 또한 B6D2F1 마우스 총 세포대비 ICM 세포의 분포는 각각 26.4 \pm 2.9%, 23.8 \pm 3.3%로 유의적인 차이는 없었지만, 2 ml군에서 많은 수의 TE 세포가 있었기 때문에 100 μ l군에 비해 낮은 수치를 나타내었다. 마지막으로 ICM:TE 비는 각각 1:2.8 \pm 0.4, 1: 3.2 \pm 0.6으로 2 ml군에서 높은 것을 확인할 수 있었다.

3. 배양액 용량(100 μ l와 2 ml)이 B6D2F1 마우스 포배아의 투명대 탈출과 착상률에 미치는 영향

Table 1. Effect of medium volume on formation rates of B6D2F1 mice blastocyst after *in vitro* fertilization

Variables	Groups		Significance
	100 μ l	2 ml	
Examination (n)	7	7	-
2-cell embryos (n)	77	93	-
Blastulation rates (%)	58.4 \pm 2.9	61.2 \pm 4.8	NS

Each value is mean \pm standard error.
NS = not significant differences between group.

Table 2. Effect of medium volume on cell numbers of B6D2F1 mice blastocysts

Variables	Groups		Significance	
	100 μ l	2 ml		
Blastocysts (n)	12	24	-	
Cell numbers (n)	ICM	15.8 \pm 0.6	16.8 \pm 1.5	NS
	TE	44.0 \pm 9.7	53.6 \pm 7.3	NS
	Total	59.8 \pm 9.7	70.3 \pm 8.7	NS
% ICM of total cells	26.4 \pm 2.9	23.8 \pm 3.3	NS	
ICM:TE ratio	1 : 2.8 \pm 0.4	1 : 3.2 \pm 0.6	NS	

Each value is mean \pm standard error.
NS = not significant differences between group.

배양액 용량(100 μ l와 2 ml)이 B6D2F1 마우스 포배아의 투명대 탈출과 착상률에 미치는 영향을 확인하기 위하여 B6D2F1 마우스 배아를 수정 후 7일 동안 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 Fig. 3에서 보는 것과 같다. 배양액 용량에 따른 B6D2F1 마우스 포배아의 투명대 탈출률은 각각 38 \pm 15.4%와 27 \pm 3.4%로 두 군간의 유의적인 차이는 나지 않았지만, 100 μ l군이 2 ml군에 비해서 높은 투명대 탈출률을 보였다(Fig. 2). 또한 B6D2F1 마우스 포배아의 투명대 탈출 이후 배양접시에 세포가 착상되는 것을 확인한 결과, 착상률은 각각 55 \pm 13.9%와 46 \pm 3.9%로 배양액 용량에 따른 통계적인 유의성은 없었으나, 100 μ l군이 2 ml군에 비해 조금 높은 세포 착상률을 보였다(Fig. 3).

고 찰

배양액 용량(100 μ l와 2 ml)이 B6D2F1 마우스 2세포기 배아의 포배아 형성률에 미치는 영향은 본 실험에서 B6D2F1 마

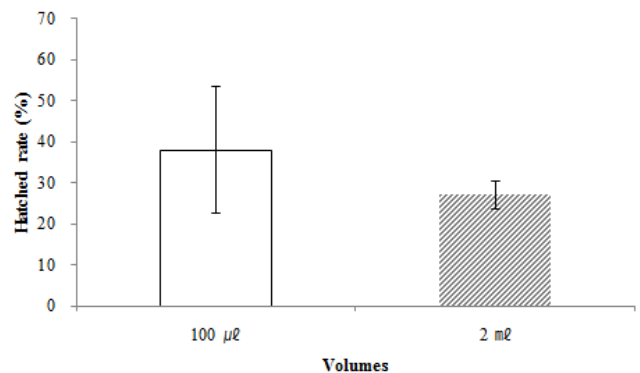


Fig. 2. Effect of medium volume on hatched rate of B6D2F1 mice blastocysts. Value is mean \pm standard error.

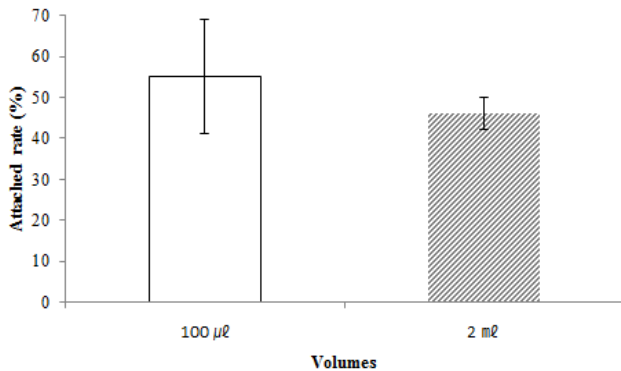


Fig. 3. Effect of medium volume on attached rate of B6D2F1 mice embryos. Value is mean±standard error.

우스 포배아의 형성률은 100 µl군에서 58.4±2.9%이고, 2 ml군에서 61.2±4.8%로 두 그룹간의 유의적인 차이는 나지 않았지만, Park(2003)은 ICR 마우스를 이용하여 배양액 용량(50 µl와 2 ml)이 포배아 형성률과는 무관하다는 결과(63.8%와 62.3%)를 보여 본 실험과 동일한 결과를 얻었지만, Therapoen 등(2011)은 배양액의 용량과 배아의 배양수가 배아 발달에 중요한 영향을 미친다고 보고한 것과는 상이한 결과를 보였다. 배양액 용량(100 µl와 2 ml)이 B6D2F1 마우스 포배아 세포 수에 미치는 영향을 확인한 실험에서 100 µl와 2 ml 배양액의 용량에 따른 B6D2F1 마우스 포배아의 ICM 세포 수는 각각 15.8±0.6개와 16.8±1.5개, TE 세포 수는 각각 44.0±9.7개, 53.6±7.3개로 두 군간 유의적인 차이는 확인할 수 없었으나, 2 ml군에서 많은 수의 TE 세포를 확인할 수 있었으며, 총 세포 수는 각각 59.8±9.7개, 70.3±8.7개로 2 ml군이 많은 결과를 보였으나 유의적인 차이는 나지 않았다. 또한 B6D2F1 마우스 총 세포대비 ICM 세포의 분포는 각각 26.4±2.9%, 23.8±3.3%로 유의적인 차이는 없었지만, 2 ml군에서 많은 수의 TE 세포가 있었기 때문에 100 µl군에 비해 낮은 수치를 나타내었으며, ICM:TE비는 각각 1:2.8±0.4, 1:3.2±0.6로 2 ml군에서 높은 것을 확인할 수 있었다. 한편, ICR 마우스를 이용하여 배양액 용량(50 µl와 2 ml)이 포배아의 ICM 세포 수(12.8개와 13.0개), TE 세포 수(47.8개와 49.0개), 총 세포 수(63.7개와 61.6개), % ICM(21.2%와 21.0%) 그리고 ICM:TE ratio(1:3.72와 1:3.77)는 배양액 용량은 포배아의 세포 수와 무관하다고 보고하였으며(Park, 2003), 본 실험은 이러한 결과와 유사한 결과를 얻어 이러한 결과를 종합하여 볼 때 배양액의 용량은 포배아의 세포 수 발달과 무관하다고 판단된다. 그렇지만 Lane과 Gardner(1992)는 마우스 2-세포 배아를 배양할 때, 배양액 소적 당 배아 밀집도는 높이고 배양액 용량은 줄일수록(320 µl에서 20 µl) 포배아 형성률과 포배아의 세포 수가 유의하게($p < 0.01$) 증가한다고 하였다. Salahuddin 등(1995)은 마우스에서 20 µl 배양액 소적에 배양

하는 배아 밀집도가 증가할수록(1개, 5개, 10개 그리고 20개) 포배아의 투명대 탈출률이 증가한다고 하였다. 또한 Theraporn 등(2011)은 배양액 용량과 배아의 숫자가 배아 발달에 중요한 영향을 미친다고 보고하여 본 실험과 상이한 결과를 보였다.

그리고 본 실험에서 배양액 용량에 따른 B6D2F1 마우스 포배아의 투명대 탈출률은 각각 38±15.4%와 27±3.4%로 두 군간의 유의적인 차이는 나지 않았지만 100 µl군이 2 ml군에 비해 높은 투명대 탈출률을 보였다. 이는 Park(2003)이 ICR 마우스를 이용하여 보고한 배양액 용량에 따른 배아 발달에서 완전 투명대 탈출률(33.3%와 30.4%)을 보여 두 그룹간 유의적인 차이가 없다는 것과 동일한 결과를 얻어 배양액의 용량이 포배아의 형성과정에서 투명대 탈출률과 무관하다고 판단된다. 이러한 실험 결과들을 바탕으로 B6D2F1 마우스의 체외 수정 및 배아 배양을 위한 배양 조건의 극대화 및 인간 배아의 체외 수정 및 체외 배양을 위한 임상 실험을 위한 기초 연구 자료로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

결론

본 연구는 배양액의 용량(100 µl와 2 ml)이 B6D2F1 마우스 배아의 발생능력에 미치는 영향에 관하여 실험을 실시하였다. B6D2F1 마우스 2세포기 배아의 포배아 발달율은 100 µl군에서 58.4±2.9%, 2 ml군에서 61.2±4.8%, 포배아 세포 개수는 TE(44.0±9.7개, 53.6±7.3개), 총 세포 수(59.8±9.7개, 70.3±8.7개)로 두 군간의 유의적인 차이는 나지 않았지만 2 ml군에서 보다 높은 결과를 보였다. 또한 투명대 탈출률(38±15.4%, 27±3.4%), 착상률(55±13.9%, 46±3.9%)은 두 군간 유의적인 차이를 보이지 않았지만 100 µl군에서 2 ml군에 비해 투명대 탈출률과 착상률이 높았다. 또한 B6D2F1 마우스 총 세포대비 ICM 세포의 분포는 각각 26.4±2.9%, 23.8±3.3%로 유의적인 차이는 없었으며, ICM:TE 비는 각각 1:2.8±0.4, 1: 3.2±0.6로 2 ml군에서 높은 것을 확인할 수 있었다.

이러한 실험 결과는 배양액의 용량이 B6D2F1 마우스의 배반포의 세포 수에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여 보여준다. 또한 이 실험의 결과들을 바탕으로 B6D2F1 마우스의 체외 수정 및 배아 배양을 위한 배양 조건의 극대화 및 인간 배아의 체외 수정 및 체외 배양을 위한 임상 실험을 위한 기초 연구 자료로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

REFERENCES

- Ashworth CJ, Toma LM and Hunter MG. 2009. Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: Implications for reproductive efficiency and environmental

- sustainability. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364:3351-3361.
- Chang YS, Lee JY, Moon SY and Kim JK. 1986. Pregnancy and its outcome by *in vitro* fertilization of human oocytes and embryo transfer: A report of the first test tube babe in Korea. *Kor. J. Obstet. Gynecol.* 29(3):345-361.
- De Vos A, Van de Velde H, Joris H and Van Steirteghem A. 1999. *In-vitro* matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod. Hum. Reprod.* 14(7): 1859-1863.
- Greve T, Callesen H, Hyttel P, Hoier R and Assey R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43:41-50.
- Han SH, Kim HJ, Moon JH, Jee BC, Ku SY, Suh CS, Kim SH, Choi YM, Kim JK and Moon SY. 2006. Comparison of two culture media on *in vitro* maturation and fertilization of immature oocytes obtained from stimulated cycles. *Kor. J. Obstet. Gynaecol.* 49(7):1492-1500.
- Holt IJ, Harding AE, Petty RKH and Morgan-Hughes A. 1990. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am. J. Hum. Genet.* 46:428-433.
- Kim KR, Moon SY and Chang YS. 1995. *In vitro* maturation immature mouse oocytes using co-culture with human uterine epithelial cells. *Kor. J. Obstet. Gynecol.* 38(6):1014-1029.
- Kim SK, Park JW and Hur EJ. 2002. Effect of human oviduct epithelial cells and vero cell on early mouse embryonal development *in vitro*. *Kor. J. Obstet. Gynecol.* 45(6):978-989.
- Kim SY and Park KS. 2004. Effects of media volume on blastocyst formation, cell numbers and ICM proportion in mouse two-cell embryos. *Kor. J. Fertil. Steril.* 31:1-7.
- Lane M and Gardner DK. 1992. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of preimplantation mouse *in vitro*. *Human Reprod.* 7:558-562.
- Meyer WR, Novotny DB, Fritz MA, Beyler SA, Wolf Lynda J and Lessey BA. 1999. Effect of exogenous gonadotropins on endometrial maturation in oocyte donors. *Ferti. Steril.* 71(1):109-114.
- Moulavi F, Hosseini SM, Ashahverdi A and Nasr-Esfahani MH. 2006. Can vero cell co-culture improve *in-vitro* maturation of bovine oocytes? *Reprod. Biomed. Online.* 13(3):404-411.
- Paria BC and Dey SK. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro*: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Develop. Biology* 87:4756-4760.
- Park KS. 2003. A study on mouse and human germ cell culture for improvement of pregnancy rates *in vitro* fertilization-embryo transfer technique. Ph. D. Dissertation, Daegu University, Gyeongbuk.
- Park KS, Lee SH and Song HB. 1994a. Influences of different culture conditions on nuclear maturation and cumulus cell layers of mouse follicular oocytes *in vitro*. *J. Anim. Sci. Technol.* 36(6):613-622.
- Park KS, Lee SH and Song HB. 1994b. *In vitro* fertilization and polyspermy in follicular oocytes matured in various culture conditions. *Kor. J. Fertil. Steril.* 21(2):177-182.
- Park KS, Lee TH, Song HB and Chun SK. 2000. Human amniotic fluid induces spontaneous hardening of the zona pellucida of mouse immature oocytes during maturation *in vitro*. *Kor. J. Fertil. Steril.* 27(1):23-29.
- Park KS, Son WY, Kim JH, Lee KA, Han SY, Ko JJ and Cha KY. 1994c. Influences of human body fluids and gonadotropins supplemented in the maturation medium on the nuclear maturation and fertilization ability of mouse immature oocytes. *Kor. J. Fertil. Steril.* 21(2):183-190.
- Park KS, Kim HJ, Choi YB, Ahn KH, Yang JB, Yu CS and Seo BB. 2014. The effect of various assisted hatching techniques on the mouse early embryo development. *Clin. Exp. Reprod.* 41(2):68-74.
- Roh S, Choi YJ and Min BM. 2005. Optimization of embryo density and the volume of culture medium for an improvement of mouse parthenogenetic embryo development. *Reprod. Develop. biology* 29(3): 145-147.
- Salahuddin S, Ookutsu, S, Goto K, Nakanishi Y and Nagata Y. 1995. Effects of embryo density and co-culture of unfertilized oocytes on embryonic development of *in-vitro* fertilized mouse embryos. *Hum. Reprod.* 10(9): 2382-2385.
- Teraporn V, Ubol SA, Suppachai S and Waraporn P. 2011. Effect of embryo density microdrop volume on the blastocyst development of mouse two-cell embryos. *Fertil. Steril.* 95(4):1435-1439.
- Uhm SJ, Gupta MK, Yang JH, Chung HJ, Min TS and Lee HT. 2011. Epidermal growth factor can be used in lieu of follicle-stimulating hormone for nuclear maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 73(8):1024-1036.