

생쥐 체외수정 정도관리의 유용성에 관한 실험적 연구

전남대학교 의과대학 산부인과학교실

임영경 · 박현정 · 이여일

Mouse Embryo Culture as Quality Control for Human In Vitro Fertilization

Young-Kyung Lim, M.S., Hyun-Jeong Park, M.S. and Yu-Il Lee, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Chonnam University Medical School, Kwang-ju, Korea

= Abstract =

The development of 2-cell mouse embryos to the blastocyst stage in vitro has been used as a quality control for the media employed for human in vitro fertilization. There was a comparison between the quality control data of the culture medium as ascertained by 2-cell mouse embryos development and sperm motility and the data from fertilization and cleavage of human oocytes.

However, there was no obvious association between fertilization and cleavage of human oocytes and the quality of the medium ascertained by mouse embryo development and sperm motility.

서 론

성공적인 인간 난자의 체외수정 및 배아이식을 위하여 최적의 배양액상태 여부를 점검하고 인간 배아의 성장에 유해한 효과를 끼치는 요인을 감지하며 적절한 배양조건을 부여할 목적으로 배양액의 정도관리를 위한 여러가지 방법이 이용되어 왔다. 이러한 정도관리 방법에는 정자의 운동성검사, 2 세포기 생쥐 배아의 배양(Condon-Mahony et al., 1985; Ackerman et al., 1985), 1 세포기 생쥐 접합체의 배양(Quinn et al., 1984; Ogawa et al., 1987), 생쥐 난자의 체외수정 및 배양(Hoppe et al., 1973; Fukuda et al., 1987), 생쥐 배아의 배양 및 배아이식(Caro & Trounson, 1984; Han & Kiessling, 1988) 등이 이용되고 있으나 대부분의 체외수정 프로그램에서는 2 세포기 생쥐 배아의 포배기까지 성장상을 조사하는 방법이 주로 이용되고 있다(Trounson & Conti, 1982; Dandekar & Quigley, 1984).

이에 저자들은 본 병원 시험관아기 프로그램에 사용하고 있는 배양액 정도관리 방법인 생쥐 2-세포기 배아 배양 시스템의 유용성을 점검할 목적으로 배양액의 생쥐 배아 배양성적

및 정자의 운동성과 인간 난자의 수정 및 난할율의 상호 연관성을 조사하고자 본 연구를 시도하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

1990년 9월부터 1991년 3월까지 만 6개월 동안 체외수정 및 자궁내 배아이식을 시행하기 위해 전남대학교 병원 체외수정 연구실에서 제조한 배양액에 대해 총 10회에 걸쳐 2-세포기 생쥐 배아 배양법을 이용한 배양액에 대한 정도관리를 실시하였고 동시에 이 기간에 전남대학교 병원 산부인과 불임 진찰실에 내원하여 체외수정 및 배아의 자궁내이식을 시술받는 28명의 환자에서 총 165개의 난자를 채취하고 체외수정 및 배양후 수정 및 난할율을 구하여 정도관리를 시행했던 해당 배양액의 성장율로 나타난 생쥐 배아 배양 성적과의 상호 연관성을 조사하였고, 아울러 배우자 정자를 이용하여 보조적 정도관리 방법으로 정자의 운동성검사를 실시하고 비교하였다.

2. 배양액의 제조

배양액의 수원으로는 초순수정제수(Burdick & Jackson)을 사용하였고, Dulbecco's phosphate buffer solution(DPBS)는 증류수 1L에 DPBS powder 9.6g과 CaCl_2 (GIBCO) 0.1g을 넣어 제조하였으며 Nutrient mixture F-10(Ham's F-10, GIBCO) 배양액은 증류수 1L에 Ham's F-10 powder 9.8g을 넣고 Penicillin G (0.075g, Sigma), Streptomycin(0.075g, Sigma), Calcium lactate(0.2452g, Calbiochem)을 첨가하였다. 배양액의 삼투압은 280-285mOsm/kg으로 조절하였으며 pH는 7.2-7.4로 조정하였고, 가압여과멸균한후 4°C 냉장고에 보관하여 제조후 2주 이내에 사용하였다.

신생아 제대혈청은 저자등이 이미 보고(인쇄중)한 바와 같이 취득한 신생아 제대혈을 원심분리(300×g, 30Min)하여 56°C에서 45분간 불활성화시키고 멸균 여과기(Acrodisc, 0.2μm)를 통해 멸균한 후 -20°C에서 보관하였다가 사용직전 녹여 배양액에 추가하였다.

3. 생쥐 배아의 체외배양

1) 과배란 유도

본 실험실에서 사육중인 생후 6-10주된 ICR 암컷 생쥐를 사용하여 난포의 성장을 촉진시키기 위해 pregnant mare's serum(PMSG, SIGMA) 5 IU를 복강 주사하였고 48시간 후 human chorionic gonadotropin(HCG, SIGMA) 5 IU를 다시 복강 주사하여 과배란을 유도 한 다음 동종의 수컷 생쥐와 합사시켰다.

2) 배아의 획득

HCG 주사후 44-48시간째 교미가 일어난 암컷을 경추파열법으로 도살한 후 양측 난관을 절취하였고, 세척방법은 해부현미경(dissecting microscope)하의 멸균된 배양접시에서 한쪽 난관 원위부를 수술검자로 고정시킨뒤에 30G 주사침을 이용하여 난관 원부에 Dulbecco's phosphate buffer solution(DPBS, GIBCO)에 5mg/ml Bovine serum albumin(BSA, SIGMA)을 첨가한 세척액을 1ml tuberculin주사기로 주입하여 난관을 세척한 후 배아를 회수하였다. 회수된 시간을 배양 0시간으로 간주하였고, 이때 회수된 2세포기의 배아를 무작위로 선택하여 각각의 실험에 이용하였다.

3) 배양방법 및 정도관리 성적의 산정 및 평가

배아는 멸균된 유리 피펫을 이용하여 배양접

시(Falcon, 3001)에 옮기고 배양방법은 3ml의 배양액이 담긴 배양접시에 2세포기 배아를 넣어 탄산가스 배양기(Forma scientific, Model C-3158)내에서 37°C, 95% 습도, 5% 탄산가스의 조건으로 72시간 배양하였다. 배아성장은 도립현미경(inverted microscope, Nikon)을 이용하여 각 배아의 난할정도로 관찰하였고 배양 72시간 후 2세포기 배아로부터 상실배와 배포기 이상 발육된 배아의 백분율을 구하여 정도관리 배양성적으로 산정하고 75%이상인 배양액만을 선택하여 합격된 것으로 간주하여 인간 난자의 배양에 사용하였다.

4. 인간 난자의 체외 수정 및 배양

1) 과배란 유도

주로 FSH/HMG/HCG병합 방법을 사용하였으나, 선행 FSH/HMG/HCG배란유도에 실패하였던 경우중, 나이가 많았거나 월경주기 제3일에 실시한기초 혈중 FSH치가 높아 난포의 성장과 발달이 불량했다고 판단했을 시는 FSH/HCG 투여방법을 사용하였고, 내인성 LH surge가 발생하거나 기초 혈중 FSH치 상승 이외의 원인에 의해 난포의 과배란 유도 반응이 좋지 않았던 경우에는 GnRH Ago.(Decapeptyl)/FSH/HMG/HCG방법을 선택 사용하였다.

과배란 유도시 난포 성장에 대한 추적은 저자등(1990)이 이미 보고하였던 바와같이 경질 초음파 진단기기(Combison 320, Kretztechnik, Austria)와 혈중 E_2 , LH, FSH, P₄치의 방사면역학적 측정 및 뇨중 LH측정을 위한 효소면역학적 측정방법을 이용하였다. 측정중 경질초음파 검사로 가장 큰 난포의 직경이 17mm이상이고 직경 14mm이상인 난포가 2개 이상 존재하는 경우 마지막 HMG를 투여한 28-32시간 후에 HCG 10,000 IU를 근육 주사하여 배란을 유도하였다.

2) 남자 채취

HCG를 투여한 34-36시간 후 경질 초음파의 감시하에 질벽을 통하여 난자를 흡입하였다. 채취시 난자를 포함한 난포액은 2ml의 DPBS를 함유한 시험관에 수집하여 즉시 배양실로 옮긴 후 해부현미경(dissecting microscope)으로 난자의 존재 여부를 확인하고 도립현미경(inverted microscope)으로 난자의 형태를 관찰하여 성숙도를 분별하였고 미성숙 난자를 제외한 중등도 이상의 성숙 난자만을 본 연구에 적용하였다.

3) 정자의 준비

정자 세정 후 swim up 방식을 채택하였으며, 남편이 3-5일간 금욕하고 수정 3-4시간전에 수음(masturbation)으로 50ml pyrex beaker에 정액을 수집하여 실온에서 액화시킨 후, 정액검사를 실시하고 동량의 수정 배양액으로 희석하여 원심 분리기에서 200×g으로 10분간 원심시킨 후 상층액을 제거하고, 다시 2.5ml의 수정 배양액을 첨가 혼합하여 동일한 방법으로 원심 분리시킨 후 상층액을 버리고 정자의 원침(pellet)을 얻은 다음 0.5ml의 수정 배양액을 추가하고 5% CO₂ 및 37°C의 조건으로 배양기 내에서 2시간 동안 배양시킨 후 상층액을 채취하였고 정자의 농도와 운동성을 측정하였다.

4) 체외 수정 및 배양

성숙 난자인 경우 6-8시간 배양후, 운동성이 있는 준비된 정자를 5×10⁴-10⁵/ml의 농도가 되도록 조절해서 첨가하여 수정시켰다. 수정 16-18시간후 성장 배양액으로 옮긴 다음 도립 현미경으로 2개의 전핵과 제2극체를 관찰하여 수정 상태를 확인하고 수정 40-44시간후에 난할을 확인하였다. 이때 수정된 난으로부터 2세포기 이상 진행된 경우만의 난할율을 구하여 본 연구의 비교에 이용하였다.

실험 결과

1. 정도관리 결과와 인간난자의 체외수정 및 배양성적의 비교(표 1)

생쥐 2-세포기 배아를 배양하여 배포까지의

난할율을 구한 후 이 배양액을 이용한 인간난자의 수정율, 난할율 및 정자의 운동성과의 상호연관성을 조사한 결과 전체적으로 생쥐 2 세포기 배아의 배포기까지의 성장율은 평균 85% 나타났으며 회수된 173개의 인간난자중 미성숙난자를 제외한 중등도이상의 성숙난자로부터 수정된 난은 97개로 58.2%의 수정율을, 수정된 난에서 2 세포기 이상의 난할까지는 74개로 76.3%의 난할율을 나타냈다. 75%이상의 정도관리 생쥐배아 난할성적으로 체외수정에 채택사용된 배양액 중 상대적으로 낮은 2번 배양액의 경우 76.9%의 생쥐 배아 성장율을 보였으나 인간 난자의 수정율 및 난할율은 각각 100%와 50%를 나타내었고, 3번 배양액은 78.6%의 생쥐 배아성장율에 인간 난자의 수정율은 매우 낮은 25%를 나타낸 반면 수정난의 난할율은 매우 높게 100%를 보였다. 이때 운동성 정자백분율로 측정된 정자의 운동성 검사는 2번과 3번 배양액에서 각각 95%, 69%로 큰 폭의 차이를 보였다. 5번과 10번 배양액은 공히 83.3%의 상대적으로 중등도의 생쥐배아 성적에 인간난자의 수정 및 난할율은 각각 71.4%, 80%와 42.9%, 100%로 수정율은 소폭의 차이만을 나타내었으나 난할율은 매우 큰 차이를 보였다. 역시 정자의 운동성도 91.7%, 77%로 상호간의 큰 차이를 보였다. 비교적 높은 91.7%, 90.0%의 생쥐 배아성장 성적을 보인 1번과 8번 배양액에서 인간 난자의 수정 및 난할율은 역시 마찬가지로 각각 80%, 50%와 38.5%, 60%의 상이한 체외수정 및 배양 성적을

Table 1. Comparison of the quality control data by using of 2-cell mouse embryo development and sperm motility and the data from human oocyte culture

| Media batch | Mouse embryo cleavage rate(%) | Oocyte aspiration (No.) | Recovered oocytes (No.) | Fertilized No. rate(%) | Cleaved No. rate(%) | Sperm motility (%) |
|-------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------|--------------------|
| 1 | 91.7 | 1 | 5 | 4(80) | 2(50) | 92 |
| 2 | 76.9 | 1 | 2 | 2(100) | 1(50) | 95 |
| 3 | 78.6 | 1 | 8 | 2(25) | 2(100) | 69 |
| 4 | 83.3 | 4 | 23 | 11(47.8) | 9(81.8) | 76.8 |
| 5 | 83.3 | 3 | 14 | 10(71.4) | 8(80) | 91.7 |
| 6 | 91.7 | 2 | 17 | 10(58.8) | 10(100) | 81.5 |
| 7 | 81.8 | 7 | 42 | 26(61.9) | 16(61.5) | 82.4 |
| 8 | 90.9 | 2 | 13 | 5(38.5) | 3(60) | 85 |
| 9 | 90.9 | 5 | 34 | 24(70.6) | 20(83.3) | 83.4 |
| 10 | 83.3 | 2 | 7 | 3(42.9) | 3(100) | 77 |
| Total | 85 | 28 | 165 | 97(58.8) | 74(76.3) | 83.4 |

보였고 정자의 운동성도 92%와 85%의 비교적 근소한 차이를 나타내었다. 이로써 2 세포기 생쥐 배아법에 의한 배양액에 대한 정도관리 배아 배양성과 인간난자의 수정 및 난할율간에는 여하한 상관관계가 없음을 알 수 있었고, 역시 정자의 운동성 검사와도 상호간의 유의한 관계를 찾을 수 없었다.

또한 동일 배양액에서 체외수정시 배우자 정자의 운동성과 인간난자의 수정율 및 난할율을 비교해 본 결과, 모두 90%이상의 높은 운동성 정자 백분율(92%, 95%, 91.7%)을 기록하였던 1, 2, 5번 배양액의 경우에 인간난자의 수정율과 난할율은 각각 80%, 100%, 71.4%와 50%, 50%, 80%로 서로 상이한 성적을 보였고, 상대적으로 비교적 낮은 69%와 76.8%의 정자운동성을 보인 3번과 4번 배양액에서도 인간난자의 체외수정율은 25%와 47.8%로 낮았으나 2 세포기 이상으로 성장된 배아 이식전까지의 배아 난할율은 100%와 81.8%로써 높은 운동성 정자를 나타낸 1, 2, 5번 배양액보다 오히려 양호한 배양성적을 보여 정자 운동성 검사 역시 인간난자의 수정 및 배양 성적과 불일치한 결과를 나타내었다.

고 찰

인간의 체외수정 및 자궁내 배아이식에 있어서 인간난자의 수정과 임신율을 높이기 위한 여러 측면에서의 연구와 개선이 있어 왔다. 그 중에서 생쥐 배아를 이용한 배양액의 정도관리가 인간의 체외수정 및 자궁내 배아이식술의 성공적인 수행에 필수적인 것으로 요구되어져 왔다(Trounson & Conti, 1984; Ackerman et al., 1984; Johnston et al., 1981). 또한 이러한 정도관리 프로그램은 인간배아 발달에 유해한 영향을 미치는 요인을 최소화 하기 위한 기회를 제공하였고, Johns등(1982)은 적절한 배양액의 정도관리가 일정한 임신율을 유지시키는데 필수적이라고 보고하였다.

현재까지 인간난자의 수정 및 배아배양을 위해 여러 종류의 배양액이 사용되었으나(Bavister, 1981) 복합 배양액인 Ham's F-10이 널리 이용되고 있다. 생쥐배아를 이용한 정도관리 방법으로 Quinn등(1984)은 체내에서 수정된 1-세포기 접합체를 체외배양시키는 방법을 제시했고 Ackerman등(1984)과 Condon-Mahony등(1985)은 생쥐 2 세포기 배아배양법과

함께 비교하고 각 배양액 정도관리는 3회 실시하고 3마리이상의 생쥐에서 최소한 5개의 정상적인 배아를 배양 시스템에 이용해야 함을 보고하였다(Ackerman et al., 1984). Trounson과 Conti(1984), Johnston등(1981), Quinn등(1984)은 2-세포기 생쥐 배아가 80% 이상 배포기까지 발달한 배양액만을 인간 체외수정 프로그램에 채택하였고, Ackerman등(1984)은 최소한 상실배 내지 배포기까지의 성장율이 75%에 이르러야 시험관 아기 프로그램에 사용해야 한다고 주장하였다.

본 연구에서도 인간의 체외수정 및 배아이식술에 대한 정도관리 방법으로 생쥐의 2 세포기 배아를 이용하여 상실배 내지 부화 배반포까지 75%이상의 발달율을 보였던 배양액만을 인간난자의 체외수정 및 배양에 사용하였다. 실제 관정통과된 배양액과 인간난자의 수정 및 난할율과의 상호연관성을 조사하여 본 결과, 상대적으로 낮은 76.9%와 78.6%의 생쥐 배아 성장성적을 보인 2, 3번 배양액에서 인간난자의 수정 및 난할율은 100%, 50%와 25%, 100%를 보였고, 정자 운동성은 95%와 69%를 보였다. 비교적 높은 생쥐배아 성적 91.7%, 90.9%를 보인 1, 8번 배양액에서의 경우에서도 인간난자의 수정 및 난할율은 80%, 50%와 38.5%, 60%를 보였으며 정자의 운동성은 92%와 85%를 나타내어 2 세포기 생쥐 배아 배양법에 의한 배양액에 대한 배아 난할성과 인간난자 체외수정율, 난할율 및 정자 운동성과의 사이에는 상호간의 상관관계가 없음을 알 수 있었다. Quinn등(1984)의 보고에 의하여도 인간의 체외수정 및 배아이식술에서의 수정, 난할 및 임신율과 생쥐 수정란을 70% 이상 배포에 이르게하는 배양액의 배아 성장율과는 상호 연관성을 발견할 수 없었다고 하였다.

또한 배양액 정도관리에 보조적으로 사용된 정자 운동성 검사 역시 마찬가지로 인간 난자의 체외수정이나 배양성과 불일치한 결과를 보여, 대부분 체외수정 실험실에서 흔히 사용되고 있는 일반적인 배양액 정도관리 방법인 2 세포기 생쥐 배양법이나 보조적으로 사용되고 있는 정자 운동성 검사 공히 체외수정 및 배아이식술 시행전에 해당 배양액에 대한 인간난자의 수정 및 배양성적을 예측하기에는 미흡하였다. 그러므로 향후 보다 정확하고 단순화 된 새로운 정도관리 방법의 모색과 동시에, 2세포기 배아 배양방법 이외의 생쥐 정도관리 방법

의 시도와 같은, 현재 흔히 사용중인 체외수정 배양액의 온도관리방법에 대한 재검토가 요망된다고 사료된다.

결 론

1990년 9월부터 1991년 3월까지 만 6개월동안 본 병원 체외수정 및 배아이식술에 있어 생쥐 2세포기 배아 배양법과 정자운동성 검사를 이용하여 얻은 배양액에 대한 온도관리 성적과 해당 배양액에 대한 인간난자의 수정 및 난할율과의 상호연관성을 조사하여 본 결과 각 배양액에 대한 생쥐배아 난할율 및 정자 운동성 백분율과 인간난자의 수정 및 난할율간의 사이에 유의할 만한 상관관계를 찾을 수 없었다.

인 용 문 헌

- Ackerman SB, Storckes GL, Swanson RJ, Taylor SP, Fenwick L: Toxicity testing for human in vitro fertilization programs. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1985, 2, 132.
- Ackerman SB, Swanson RJ, Stokes GHK, Veeck LL: Culture of mouse preimplantation embryos as a quality control assay for human in vitro fertilization. *Gamete Res* 1984, 9, 245.
- Bavister BD: Analysis of culture media for in vitro fertilization and criteria for success. In: Mastroianni L, Biggers JD, eds. Fertilization and Embryonic Development in vitro. *New York: Plenum Press*, 1981, 41.
- Caro CM, Trounson A: The effect of protein on preimplantation mouse embryo development in vitro. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1984, 1, 183.
- Condon-Mahony M, Wortham JWE Jr, Bundren JC, Witmyer J, Shirely B: Evaluation of human fetal cord sera, Ham's F-10 medium, and in vitro culture materials with mouse in vivo fertilization system. *Fertil Steril* 1985, 44, 521.
- Dandeker PV, Quigley MM: Laboratory set up for human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1984, 42, 1.
- Fukuda A, Noda Y, Shinich J, Matsumoto H, Yand J, Mori T: Influence of water quality on in vitro fertilization and embryo development for the mouse. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1987, 4, 40.
- Han HD, Kiessling AA: In vivo development of transferred mouse embryos conceived in vitro in simple and complex media. *Fertil Steril* 1988, 50, 159.
- Hoppe PC, Pitts: Fertilization in vitro and development of mouse ova. *Biol Reprod* 1973, 8, 420.
- Johns HW, Johnes GS: The program for in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 1982, 38, 14.
- Johnston I, Lopata A, Speirs A, Hout I, Kellow G, du Plessis Y: In vitro fertilization: the challenge of the eighties. *Fertil Steril* 1981, 36, 699.
- 이여일, 임영경, 변지수: 인간난자의 체외수정 및 자궁내 배아이식에 관한 연구: 호남지방 최초의 시험관아기 임신 및 분만. 전남대학교 논문집 1990, 35, 127.
- 임영경, 류무현, 이여일: 체외수정 배양액에 대한 제대혈청 및 단백질 첨가의 배아성장 자극 효과에 관한 연구. 대한산부회지, 인쇄중.
- Lopata A, Johnston IWH, Hout IJ, Speirs AL: Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by in vitro fertilization of a preovulatory egg. *Fertil Steril* 1980, 33, 117.
- Ogawa T, Ono T, Marrs RP: The effect of serum fractions on single-cell mouse embryos in vitro. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1987, 11, 153.
- Quinn P, Warnes GM, Kerin JF, Kirby C: Culture factors in relation of the success of human in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1984, 41, 202.
- Trounson A, Conti A: Research in human in vitro fertilization and embryo transfer. *Br Med J* 1982, 285, 244.