능력을 반영하는 성교후 검사 및 정자의 시험관내 점액질 침투능력검사, 정자내의 효소분석 및 ATP활성분석, 정자의 난황막 침투능력과 탈응축을 반영하는 햄스터 난자 침투분석법 (sperm penetration assay : SPA), Zona Binding Test, 형광염색법을 이용한 첨체반응분석법등의 여러 방법이 개발되고 있다. 그러나 이들 예시한 각 검사법들은 여러 단계의 수정과정중 일부분만을 평가하는 방법으로 어느 한검사법만으로 정자의 수정능을 판정하는것은 정확한 진단가치를 지니지 못하고 있으며 현재까지 각검사법에 있어서도 실험기법과 결과해석상의 적정화가 필요한 실정에 있다.

본 연구는 체외수정시술을 시행받은 환자를 대상으로 정자형태의 정밀분석과 형광염색법을 이용한 첨체반응분석 및 햄스터 난자침투분석법을 비교하여 각검사법의 체외수정시의 수정율에 대한 예측도를 비교분석하고 상관관계를 규명함으로써, 각검사법간의 상호보완성 여부와 체외수정시술시 수정율에 대한 예후지표로서의 유용성을 알아보기 위해 실시하였다.

1. 본 연구에서 수정율 30%를 기준으로 SPA의 난자침투지수에 있어 정상역을 3.0이상으로 설정하였을 때 SPA의 수정능예측에 대한 양성예측도, 음성예측도, 민감도 및 특이도는 각각 98.0%, 94.3%, 98.0%, 88.0% 로 나타났다.

2. ARIC value를 기준으로 정상역을 8.5% 이상으로 설정하여 ARIC test의 수정능예측에 대한 양성예측도, 음성예측도, 민감도 및 특이도는 각각 88.5%, 94.2%, 94.2%, 88.7% 로 나타났다.

3. 정밀기준에 의한 정자의 정상형태비를 기준으로 정상역을 6% 이상으로 설정하여 수정능예측에 대한 양성예측도, 음성예측도, 민감도 및 특이도는 각각 94.8%, 80.3%, 86.0%,92.2% 로 나타났다.

4. 체외수정시술시 수정율에 대한 예측도에 있어 각검사방법간 다소의 차이를 보였지만 유사한 정보를 제공하며, 검사법간의 상관성에 있어서도 높은 상관관계를 나타냈다.

이상의 결과로서 정자형태의 정밀분석이나 ARIC test는 체외수정시술시 수정능예측에 있어서 경제적이며 간편하게 이용할 수 있는 유용한 방법으로 사료된다. 또한 위의 검사방법들을 동시에 사용할 경우 상호보완적인 성과를 거둘 수 있으며, 정자의 수정실패에 대한 원인분석에 있어서 보다 정밀하게 접근할 수 있을것으로 생각된다.

- 12 -

IVF-ET Program에서 Blastocyst 수정란의 생산에 관한 기초연구 II. Cumulus cell을 이용한 공동배양과 Blastocyst의 발생

마리아 산부인과

윤산현 · 윤혜균 · 조현진 · 허용수
윤혜진 · 마충철 · 주재홍 · 박세필
김규현 · 이원돈 · 임진호

대규모 임상실험에서 GIFT가 IVF-UET보다 임신율이 높게 나타나는 것은 적합치 않는 배양체계에서 비롯되며 장기간의 체외환경에서도 나팔관환경에서와 같은 수정란의 발생이 이루어지도록 하는 Program이 절실히 요구되고 있다. 최근들어 가축의 ET Program(임신율 60-70%)과 같이 사람에서도 Blastocyst 수정란을 이식할 수 있도록 배양체계를 개선하려는 연구가 진행되고 있다. 전통적인 배양체계에서는 Blastocyst 발생률이 낮기(25-30%) 때문에 배양액의 개선을 시도하는가 하면 한편으로는 자타 종의 체세포를 분리하여 공동배양의 효과를 이용하려 하지만 여기에는 윤리적인 문제점은 물론 체세포 배양체계의 복잡성, 불안정성 및 불편함 때문에 대규모의 임상에는 적용하기 어려운 실정이다.

이에 본 연구의 목적은 glucose와 phosphate가 첨가되지 않은 배양액을 기본배양액(일명 YS 배양액)으로 하고 난포액을 10%되도록 혼합하여 여기에 수정된 2PN 난자를 난구세포와 4일 동안 공동배양하였을 때 Blastocyst stage까지의 발생률을 조사하고, 이들을 환자의 자궁에 이식하였을 때 착상율 및 임신율을 조사하기

위한 것이다. 본 실험에 사용한 YS 배양액은 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.8 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 mM $NaHCO_3$ 및 5 mM $KHCO_3$로 완충액을 만든 다음 0.2 mM Taurine, 1 mM Glutamine 및 0.1 mM Insulin을 첨가하고 30 mM Sodium lactate, 0.4 mM Sodium pyruvate 및 10 ml Antibiotics antimycotic solution을 넣었으며 MEM 수준의 non-essential amino acid, RPMI 1640 수준의 amino acid 및 MEM수준의 vitamin 을 첨가하고 잘 혼합하여 제조하였다. 난구세포(Cumulus cell)의 채취는 난자를 난포액으로부터 회수할 때 성숙된 난자의 방사관 주위의 난구세포괴를 30 gauge 바늘로 분리하고 잘 세척하였다. 0.0003%의 Hyaluronidase가 첨가되고 10% 난포액을 함유한 100-200 μL YS 배양액에서 난구세포괴를 모아 pipette으로 흡인, 배출하면 Granular cell(단일세포)이 되는데 약 10,000개의 Granular cell들을 10 μl의 미세소적에서 배양하다가 3-4시간 후에 2PN 수정란을 배양할 수 있는 10% 난포액이 들어 있는 YS배양액으로 교환하였다. 다음날 정상적으로 수정이 확인되면 미리 준비된 자신의 난구세포 미세소적에 2PN 수정란을 옮기고 24시간 간격으로 배양액을 교환하면서 난자채취 후 5일째까지 배양하고 Blastocyst 발생을 관찰하였다.

Blastocyst는 형태학적으로 Early Blastocyst(EB), Early Expanding Blastocyst(EEB), Middle Expanding Blastocyst(MEB) 및 Expanded Blastocyst(EdB)로 구분하였다. 한 환자에게 Blastocyst 수정란을 3개가 넘지 않도록 자궁에 이식하고 주기 6주(난자채취 약4주)후 G-sac수와 심장박동태아수를 관찰함으로써 착상율과 임신율을 조사하였다. 이상의 결과는 다음과 같다.

1. 난자채취 2일째에 4개이상의 수정란이 양호한 세포분열을 하고 있는 환자 360명 중 5일째에 최소한 1개의 Blastocyst도 발생하지 않은 환자가 9명(2.5%)이 관찰되었다.

2. 360명의 환자로부터 2929개의 2PN 수정란을 4일간 배양하였을 때 1728개의 Blastocyst (59%)를 관찰할 수 있었으며 EB, EEB, MEB 및 EdB는 각각 513개 (17.5%), 360개 (12.3%), 366개 (12.5%) 및 489개 (16.7%)로 조사되었다.

3. 351명의 환자에게 1015개의 Blastocyst를 이식함으로써 한 환자에게 평균 2.89개의 Blastocyst가 이식되었다.

4. G-sac수와 심장박동 태아수는 각각 297개와 225개로써 이식된 Blastocyst의 착상율과 착상 진행율은 각각 29.3%와 22.2%로 관찰되었다.

5. Blastocyst를 이식한 351명의 환자 중 176명의 환자에서 임신 (50.1%)이 되었고 131명의 환자가 임신이 유지 (37.3%)되고 있다.

6. 임신이 유지되고 있는 131명의 환자 중에서 단태아 임신, 쌍태아 임신 및 삼쌍태아 임신은 각각 58명 (44.3%), 52명 (39.7%) 및 21명 (16.0%)으로 조사되었다.

자신의 난구세포(autologous cumulus cells)를 공동배양에 이용할 수 있게 됨으로써 다른 체세포를 이용할 때에 sub-culture 과정이나 viral screening 을 생략할 수 있어 보다 쉽고 간편하게 되었다. 또한 10% 난포액을 첨가한 YS 배양액에서 2PN 수정란을 난구세포와 공동배양하고 이를 자궁에 이식하였을 때 높은 Blastocyst 발생률, 착상율 및 임신율을 얻을 수 있다는 것은 IVF-ET program에 효율적 가치가 있다는 것을 시사하고 있다.

- 13 -

Effects of extracellular potassium concentrations on acrosome reaction, polyspermy, and pronuclear formation during in vitro fertilization in the pig

Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

Joon-Gyo Lim · Nam-Hyung Kim Hoon-Taek Lee · Kil-Saeng Chung

Potassium concentrations in the mammalian oviduct and uterus are particularly interesting due to its unusual high concentration (12-25