

는 calcium alginate을 이용하여 capsul 형태로 만들어 6주간 체외배양 하였다. 6주간 배양 후 역전시중 합효소반응 (Oct-4, c-kit, TH2B, TP-1 gene)과 면역조직화학법 (anti-c-kit, peanut agglutinin)을 이용하여 발현정도와 발현부위를 관찰하였다.

**Results:** 고환의 세포들을 5회의 계대배양을 한 후 alkaline phosphatase 활성화 반응과 줄기세포의 표지유전자인 Oct-4 mRNA의 발현이 colonies내의 세포들에서 높게 나타났으며, 또한 줄기세포의 표지 인자인 (SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4)과 면역학적표지인자 (integrin  $\beta$ 1,  $\alpha$ 6)에서도 양성반응을 나타내었다. Re-encapsulation한 세포를 6주 동안 체외에서 배양한 결과 re-encapsulation한 세포내의 Oct-4 mRNA의 발현은 감소한 반면 정모세포 (spermatocyte)의 표지유전자와 단백질인 c-kit, TH2B mRNA와 peanut agglutinin은 증가하는 양상을 나타내었다. 정자세포의 표지유전자인 TP-1 mRNA의 발현은 3주전 까지는 나타나지 않았으나 그 이후부터 6주 배양군에서 나타났다.

**Conclusions:** 이상의 결과를 종합하면, 미성숙 생쥐의 고환으로부터 얻은 생식줄기세포가 본 연구의 체외배양조건 하에서 생식줄기세포로 증식, 유지됨을 알 수 있었다. 또한 이러한 생식줄기세포는 장기간 배양을 통하여 반수체의 생식세포로 분화할 수 있는 잠재력을 가지고 있음을 보았다.

---

본 연구는 21세기 프론티어 연구개발사업 세포응용연구사업단 (SC12011) 및 과학재단 특정기초 (RO1-2001-000-00144-0) 연구비 지원에 의해 수행되었음.

## 0-15 혼합가스와 GIII Series 배양액을 이용한 인간배아 체외배양시스템의 임상적 결과

한나여성의원

지희준 · 김강식 · 구정진 · 한세열 · 이주옥 · 장상식

**Background & Objectives:** 인간배아의 체외배양시스템은 지난 10여년 동안 배아의 대사과정에 기초한 체외배양액의 개발로 배양액 단독으로도 배반포까지의 체외발달이 가능할 정도로 눈부신 발전을 이루하였다. 따라서 체외배양시스템의 개선을 위한 앞으로의 연구는 활성화산소 (ROS, reactive oxygen species), 온도변화, 또는 공기오염 등 보다 기초적인 조건들을 최적화 시키기 위해 수행되어야 할 것이다. 이에 본 연구는 기본적인 단계의 연구로서 상용화된 체외배양액 (GIII Series)의 사용과 함께 활성화산소의 해로운 효과를 감소시킬 수 있는 혼합가스 (6% CO<sub>2</sub>, 4% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>)를 사용하였을 때 나타난 임상적 결과를 보고하고자 한다.

**Method:** 본 연구는 2002년 2월 1일부터 2003년 9월 30일까지 365명의 환자에게 수행된 436예의 시험판아기시술을 대상으로 하였다. 사용된 체외배양액은 Vitrolife사의 G1, G2 배양액과 GIII Series 배양액을 사용하였으며 CO<sub>2</sub> 단독가스 대신에 혼합가스를 사용하였다. 또한 modular incubator chamber를 사용함으로써 혼합가스 사용의 효율성과 경제성을 높이고자 하였다. 이들 436예의 시술을 사용한 배양액과 chamber 수에 따라 각각의 실험군으로 구별하였고 이들 군간의 임상적 결과를 비교하였다. 한편 배아이식 날짜에 따라 임상결과를 비교하였으며 배아이식용 배양액인 embryo glue를 사용한 군의 임상결과를 조사하였다. 그리고 환자의 나이 (40세 이상), 자궁내막 두께 (7 mm 이하), 수정에 사용된 난자의 수 (3개 이하) 그리고 배아의 질 (G1, G2, G3 이하) 등이 임신율에 미치는 효과를 비교

조사하였다.

**Results:** 같은 조건하에서 G1, G2 군의 임상적 임신율 (32.8%)과 착상율 (14.1%)에 비해 GIII 군은 각각 40.3%와 18.2%로서 다소 높은 성적을 나타내었으나 유의차는 인정되지 않았다. 이들 두 군간의 환자의 나이, 자궁내막 두께 그리고 배아의 질에서는 차이를 나타내지 않았으나 G1, G2 군에서 3개 이하의 난자를 사용한 시술의 비율이 26.4%로서 GIII 군의 10.5%에 비해 유의하게 높았다 ( $p<0.05$ ). 한편 GIII 배양액을 사용하면서 modular incubator chamber를 1개 사용한 군의 임신율 (40.3%)과 착상율 (18.2%)은 chamber 2개를 사용한 군의 임신율 (38.0%)과 착상율 (16.2%)과 차이를 나타내지 않았다. 그러나 chamber 2개를 사용한 군에서 1등급 (Grade 1)의 배아가 차지하는 비율 (25.7%,  $p<0.05$ )과 배반포 발달율 (47.6%)이 1개를 사용한 군 (10.6%, 39.8%)에 비해 높은 결과를 나타내었다. Day 3, Day 4 그리고 Day 5 배아이식 한 군들의 임신율은 각각 36.3, 37.2, 그리고 51.1%로 이식날짜가 길어짐에 따라 임신율의 증가를 나타내었으나 유의한 차이는 없었다. Embryo glue를 사용한 군과 사용하지 않은 군의 임신율은 각각 46.6%와 40.0%로서 차이를 나타내지 않았다.

**Conclusions:** 상용화된 GIII series 배양액을 혼합가스와 함께 사용하면서 보다 안정적인 임상적 결과를 얻을 수 있었고 modular incubator chamber 2개를 사용하는 것이 1개 사용에 비해 배아의 외부환경에 대한 노출을 줄임으로써 배아의 질, 배반포 발달율, 그리고 임신율의 향상에 도움이 된다는 것을 확인하였다.

## 0-16 미세정자주입술에 의한 임신과 정상적인 임신에서 얻어진 양수세포의 미토콘드리아에서 Common Deletion의 Competitive PCR을 이용한 정량분석

포천중문의대 차병원 유전학연구실<sup>1</sup>, 여성의학연구소 산부인과<sup>2</sup>,

보건복지부 지정 생식의학 및 불임 유전체 연구센터<sup>3</sup>,

세포유전자치료연구소<sup>4</sup>, 기초의학연구소<sup>5</sup>

조성원 · 이숙환<sup>1,2,3</sup> · 김현아<sup>1,3</sup> · 정혜진<sup>1,3</sup> · 배성미<sup>1</sup>  
정형민<sup>4,5</sup> · 곽인평<sup>2</sup> · 한지은<sup>2</sup> · 차광열<sup>2</sup>

**Background & Objectives:** 정자 미토콘드리아는 inter-specific hybrids와 인위적인 세포질 내 조합과 같은 정상적이지 않은 경우를 제외하고는 발생단계의 배아에서는 발견되지 않는다. 정자 미토콘드리아가 없어지는 과정에 대해서는 알려진 바가 없으나, 아마도 ubiquitin에 의해서 매개되어지는 것으로 보여 진다. 미세정자주입술 (intercytoplasmic sperm injection; ICSI) 과정에서 정자의 첨체는 사라지지 않고 난자세포질 내에 남아 있을 수 있다. 미토콘드리아 DNA (mtDNA)에 돌연변이가 있고 특히 common deletion이 있을 것으로 생각되어지는 비정상 정자는 과연 미세정자주입술 시술시 사용될 수 있는지에 대해 고려되어야 한다. 이 실험의 목적은 미세정자주입술에 의한 임신과 정상적인 임신에서 얻어진 양수세포에서 미토콘드리아 결실 양을 비교해 보는 것이다

**Method:** 정상핵형을 보이는 미세정자주입술에 의한 임신에서 얻은 106 태아 양수세포와 정상임신에서 얻어진 117 태아 양수세포를 대상으로 실험하였다. Genomic DNA는 15~23주 이후 채취된 양수세포로부터 얻어졌다. 정량분석하기 전에 nested PCR을 통해 common deletion을 관찰하였다. DNA 100