

난포액이 생쥐 및 인간수정란의 체외발생에 미치는 영향

윤혜균 · 윤산현* · 임진호* · 이훈택 · 정길생

건국대학교, 동물자원연구센터

Effects of Follicular Fluid on Development of Mouse and Human Embryos *In Vitro*

Yoon, H. G. , S. H. Yoon*, J. H. Lim*, H. T. Lee and K. S. Chung

Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

SUMMARY

These experiments were carried out to investigate the effects of human follicular fluid (hFF) as a protein supplement on development of mammalian embryo as well as to find out ways toward effective use of hFF. The developmental rates of mouse embryos to the blastocyst and implantation stages were significantly higher in T6 + hFF than T6 + hFCS. Classified hFF according to the maturity of contained oocytes (M-hFF and Im-hFF), and compared the rates of development of mouse embryo cultured in M-hFF or Im-hFF to culture medium T6. Total protein, albumin and estradiol concentrations were higher in M-hFF than Im-hFF ($P < 0.05$). The developmental rates of mouse embryos to the blastocyst and hatching blastocyst stages cultured in Im-hFF were significantly lower than those in M-hFF and the basic medium. In accordance of the results of human IVE, hFF has been divided into 4 groups. The developmental rates of mouse embryos to the blastocyst stage in presense of hFF from pregnant patients, who have good grade embryos, were significantly higher than those in hFF from patients who have poor grade embryos or were not pregnant. In addition, the rates of development of human embryo were compared in presense of BSA, hFF or hFCS. The developmental rates of human embryos cultured in Ham's F10 + hFF were significantly higher than those in the Ham's F10 + BSA. These results suggests that the culture system using hFF could improve the development ability of mammalian embryos and the viability of blastocysts cultured *in vitro*.

I. 서 론

일반적으로 포유동물의 수정란을 체외배양하는데 있어 fetal cord serum(FCS), preovulatory serum (POS), bovine serum albumin (BSA), human serum albumin (HSA) 등이 배양액의 단백질 첨가제로서 많이 이용되고 있다(Lopata, 1980). 이러한 첨

가제들은 포유동물의 난자성숙, 정자의 수정능획득, 수정란의 초기발달 및 부화과정에 필요한 영양성분들을 다량 함유하고 있는 것으로 알려져 있으나, 난자, 정자 및 수정란에 최적의 배양조건을 위한 첨가제의 종류 및 첨가수준은 아직 완전히 확립되어 있지 않다 (Kruger 등, 1987).

첨가제가 수정란의 발생에 미치는 영향에 대한 상반된 결과들이 보고되면서(Ogawa 등, 1987; Saito 등,

* 마리아병원 불임클리닉(Maria Infertility Clinic)

1984) 최근 첨가제로 많이 사용되는 혈청의 유해효과와 면역학적 문제를 감소시키고자 혈청을 대신할 첨가제에 대한 연구가 진행되고 있다. 현재 혈청의 대체제로서 주로 BSA, HSA 등이 이용되고 있는데(Menozo 등, 1984; Caro 등, 1984; Ashwood-Smith 등, 1984; Staissen 등, 1990), 이러한 albumin의 효용은 종에 따라 혈청보다는 효과가 적은 것으로 보고되고 있다(de Ziegler 등, 1987). 이렇게 혈청 이외에 적당한 배양첨가제가 없기 때문에 혈청이 여전히 소, 토끼 등의 가축과 인간수정란의 체외배양에 가장 많이 이용되고있는 실정이다.

난포액은 난모세포가 성숙되면서 수정 및 발생능력을 획득하게 되는 물리적, 생리적 환경이 될 뿐 아니라, 배란후 난관으로 유입되면서 정자의 수정능 획득, 난자와 정자의 수정 및 수정란의 발생에 직접적인 영향을 미친다(McNatty 등, 1979; Yanagimachi, 1970). 난포액 성분의 대부분은 혈장에서 유래하며, 난포막의 내·외부 세포들에 의해 합성된 steroid hormone들이 고농도로 존재한다(McNatty 등, 1975, 1975b). 난포액과 정자의 수정능획득에 있어서의 연관성은 이미 많은 연구자들에 의해 보고되었는데(Meizel, 1985; Tesarik, 1985; Mortimer 등, 1989), 난포액에는 정자의 acrosome reaction과 hyperactivation을 촉진하는 생리적 유도제가 존재한다는 것이다. 따라서 난포액은 체외수정시 정자의 수정능획득을 위한 처리에 많이 이용되고 있다. 또한, 근래에는 소 (윤, 1989)와 인간 (Yoon 등, 1989) 난자의 체외성숙에 성숙난포액을 이용하여 정상적인 수정란 발생을 유도하였으며, 이들을 자궁에 이식하여 임신에 성공한 보고 (Cha 등, 1990)도 있다. 또한 Leung 등 (1989)은 생식세포를 난관내에 이식할 때 난포액을 이용하여 양호한 결과를 얻었으며, Seppälä 등 (1984a, 1985b)은 난포액내에 착상시 자궁의 endometrium에서 분비되는 placental protein 5와 12가 존재하며, Gürgan 등 (1993)은 실험과정에서 발생되기 쉬운 세균의 증식을 난포액이 억제하는 특성이 있다고 하였다.

본 연구에서는 배양액 첨가제로서의 난포액의 이용가능성을 알아보기 위하여 생쥐와 인간수정란을 난포액 첨가 배양액에 배양하면서 BSA, 제대혈청 첨가 배

양액에서의 체외발생과 비교·조사하고, 난포액을 그 특성에 따라 구분하여 조성 및 생쥐수정란의 체외발생을 비교함으로써 난포액의 효율적인 이용법을 모색하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물 및 다배란유도

실험동물로서 암컷은 4~5주령의 F1 hybrid 및 ICR계통을 사용하였으며, 이들로부터 각각 1세포기 및 2세포기 수정란을 회수하여 실험에 이용하였다. 그리고수컷은 12~20주령을 교배용으로 이용하였다.

다배란유도는 5IU의 PMSG를 복강주사한 다음, 48시간후에 5IU의 hCG를 주사하였고, hCG주사후 즉시 수컷과 1:1의 비율로 합사하여 교미를 유도하였다. hCG주사시간을 기준으로 하여, hCG주사후 20시간 및 46시간에 경추분리(cervical isolation)방법으로 도살한 뒤 난관에서 관류법에 의해 각각 1세포기 및 2세포기수정란을 회수하였으며, 형태적으로 정상인 것만을 골라 실험에 사용하였다.

2) 배양액

기본배양액으로는 T6배양액을 제조하여 사용하였고, 단백질첨가제로는 BSA(Sigma, B-9647, USA)를 0.4% (W/V)농도로 하여 사용하였다. 마리아 불임 클리닉의 시험관아기 시술과정에서 회수한 난포액과 제대혈청은 원심분리하여 세포를 제거한 뒤 56℃에서 35분간 비동화시킨 후 0.22 μ m filter로 여과하여 사용하였다. 첨가제로서 난포액이나 제대혈청을 T6배양액에 각각 20% (V/V)나 10% (V/V)를 첨가하였다.

2. 실험방법

1) 배양방법

1세포기 수정란은 회수후 0.025% hyaluronidase 용액을 이용하여 난구세포를 제거한 후 2~3회 세척하고, 배양소적에서 배양하였으며, 2세포기 수정란은 난

관으로부터 관류하여 배양하였다. 배양소적은 15 μ l의 크기로 하였으며, 1개의 소적당 5~10개의 수정란을 넣고 5% CO₂ incubator에서 96시간동안 배양하면서 매 24시간마다 발달상태를 현미경하에서 관찰하였다.

2) 난포액과 제대혈청의 첨가가 생쥐수정란의 발생에 미치는 영향

생쥐 1세포기 수정란의 체외발생에 미치는 제대혈청과 난포액의 영향을 알아보기 위하여 hCG주사 후 20시간째 수정란을 회수하여 제대혈청 8개 시료와 성숙난포액 8개 시료를 배양액에 각각 첨가하여 만든 배양소적에 96시간 동안 배양하였다. 한편 배반포까지 발달한 수정란만을 회수하여 각각 새로운 배양액에 옮겨 7일 동안 체외배양하면서 egg cylinder와 somite stage를 현미경하에서 관찰하였다.

3) 성숙난포액과 미성숙난포액의 구분

Ben-Rafael 등 (1986)의 기준에 준하여, 성숙한 난자를 포함한 난포로부터 회수한 난포액을 성숙난포액 (M-hFF), 미성숙난자를 포함한 난포로부터 회수한 난포액을 미성숙난포액 (Im-hFF)으로 구분하였다.

4) 인간수정란의 체외발생에 따라 분류된 성숙난포액이 생쥐 수정란의 체외발생에 미치는 효과

성숙난포액을 난자의 분할상태에 따라서 2군으로 구분하였고, 난포액을 제공한 환자의 임신여부에 따라 다시 2군으로 구분하였다. Mohr 등 (1983)의 방법에 준하여 수정란이식시 수정란의 발생상태가 (Grade I)을 good grade로, 나쁜 군(Grade V)을 poor grade로 구분하였으며, 수정란을 이식한 4주후에 G-sac

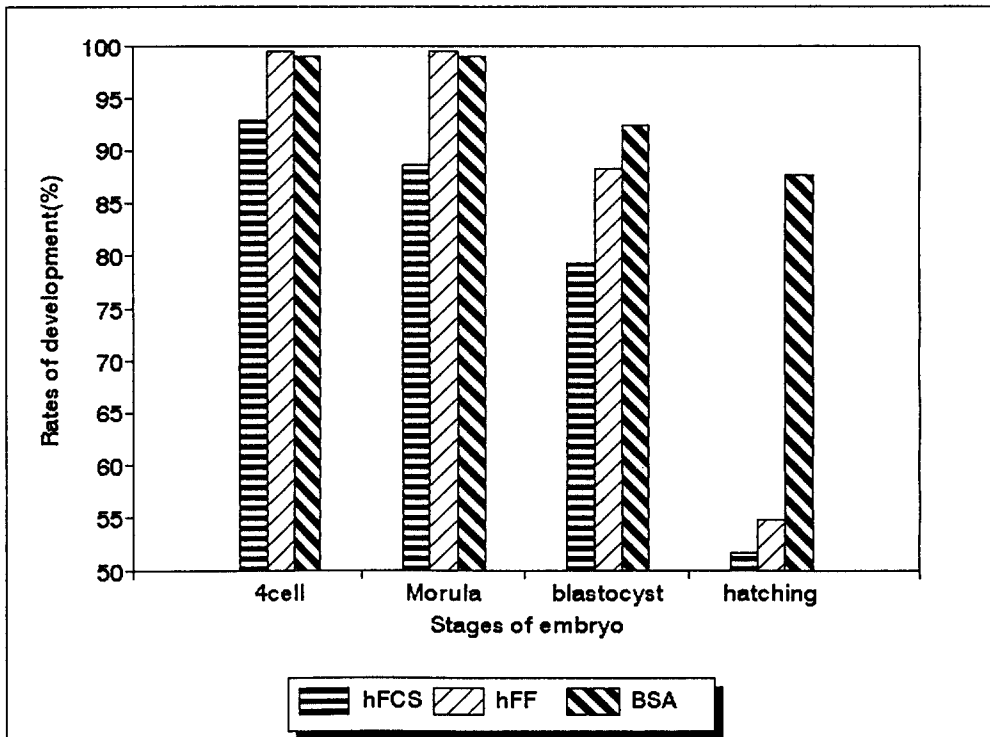


Fig. 1. Effects of different protein supplementations on mouse zygotes development to 4-cell through hatching blastocyst stage.

이 확인된 환자를 임신군 (pregnancy), 임신이 되지 않은 군을 비임신군(nonpregnancy)으로 구분하였다.

Good grade이면서 임신된 난포액, good grade면서 비임신 난포액, poor grade이면서 임신된 난포액과 poor grade이면서 비임신 난포액으로 구분하여 T6배양액에 각각 20%씩 첨가한 후 생쥐 2세포기 수정란을 배양하면서 체외발생율을 조사하였다.

5) BSA, 제대혈청 및 난포액을 첨가한 배양액에서 인간 수정란의 체외배양

시험관아기 시술시 다정자침입이 일어난 전핵단계의 수정란을 제대혈청 3개 시료, 성숙난포액 3개 시료 및 BSA첨가배양액에 배양하여 체외발생율을 조사하였다.

6) 통계분석

수정란의 체외발생율에 대한 실험결과는 백분율로 표시하였으며, 각 처리간에는 χ^2 -test를 실시하여 그 유의성을 비교하였다. 난포액 조성비교에서는 student t-test에 의해 유의성을 검정하였다.

III. 실험결과

1. 난포액과 제대혈청의 첨가가 생쥐 1세포기 수정란의 발생에 미치는 영향

생쥐 1세포기 수정란의 발생에 미치는 제대혈청과 난포액의 영향을 알아보기 위하여 hCG주사 후 20시간째 수정란을 회수하여 체외 배양한 결과를 Fig. 1에 제시하였다. 난포액 첨가군 188개, 제대혈청첨가군 18

Table 1. Effects of different protein supplementations on mouse zygotes development up to 4- cell through hatching blastocyst stage. Supplement in medium

Supplements in medium	Total no. of blastocysts	Postimplantation development rates(%) to	
		egg cylinder	somite stage
20% hFF	166	16.9*	9.0*
10% hFCS	146	6.2	2.0

*: hFF different from hFCS (P<0.05).



Fig. 2. The somite stage mouse embryo cultured in hFF (arrow: decidual tissue).

4개의 수정란을 비교한 결과, 배반포까지의 발생율이 있어 난포액군 (88.3%)이 체대혈청군 (79.3%)에 비해 유의하게 높게 나타난 반면, hatching blastocyst의 형성율은 각각 54.8와 51.6%로서 두 군에서 유사한 결과를 보였다.

배양 96시간 후에 배반포까지 발달한 수정란을 회수하여 새로운 배양액으로 옮긴 뒤 egg cylinder와 somite stage까지 체외배양하여 발달한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. Egg cylinder의 형성은 난포액군과 체대혈청군에서 각각 16.9와 6.2%, somite stage (Fig. 2)까지의 발달율은 각각 9.0와 2.0%로서 난포액을 첨가한 배양액에서 배양된 수정란의 체외발생율이 유의하게 높았다.

2. 성숙난포액과 미성숙난포액의 특성과 생쥐수정란의 발생에 미치는 영향

성숙난포액과 미성숙난포액의 단백질 및 steroid hormone 함량을 비교한 결과는 Table 2 및 3에서 보는 바와 같다. 총 단백질 함량은 성숙난포액과 미성숙난포액에서 각각 50.8 ± 0.7 과 42.3 ± 2.8 mg/ml, albumin의 함량은 35.0 ± 0.1 과 30.7 ± 1.2 mg/ml로서 성숙난포액에서 다소 높게 조사되었다. Steroid hormone에서 estradiol의 함량은 성숙난포액이 196 ± 11.1 ng/ml로 미성숙난포액의 71 ± 14.3 ng/ml보다 현저하게 많은 것으로 조사되었으나 ($P < 0.05$), progesterone은 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 2. Profiles of proteins in mature and immature follicular fluid

Maturity of follicular oocytes	mg/ml (mean \pm SE) in follicular fluid	
	Total protein	Albumin
Immature (n=5)	42.3 ± 2.8	30.7 ± 1.2
Mature (n=8)	$50.8 \pm 0.7^*$	$35.0 \pm 0.1^*$

* Mature follicular fluid different from immature follicular fluid ($P < 0.05$).

Table 3. Profiles of steroid hormones in mature and immature follicular fluid

Maturity of follicular oocytes	ng/ml (mean \pm SE) in follicular fluid	
	Estradiol	Progesterone
Immature (n=5)	71 ± 14.3	4667 ± 1201
Mature (n=8)	$196 \pm 11.1^*$	$5285 \pm 348^*$

* Mature follicular fluid different from immature follicular fluid ($P < 0.05$).

성숙난자가 들어 있던 난포액과 미성숙난자가 들어 있던 난포액을 첨가제로 이용했을 때 생쥐 1세포기 및 2세포기 수정란을 배양한 결과는 Table 4 및 5에서 보는 바와 같았다. 1세포기 수정란은 미성숙난포액 첨가군에서 배반포 발생율 40.6%와 부화배반포 발생율 25.8%가 성숙난포액 첨가군의 88.3와 54.8%에 비하여

Table 4. Effects of human follicular fluid containing mature or immature oocyte on *in vitro* development of mouse zygotes

Supplements in medium	No. of zygotes cultured	% of BL ¹ at day 4		% of BL at day 6	
		Exp ²	Total	Htg ³	Htd ⁴
BSA	105	89.5 ^a	92.4 ^a	87.6 ^a	81.0 ^a
M-hFF (n=8)	188	76.6 ^b	88.3 ^a	54.8 ^b	53.2 ^b
Im-hFF (n=5)	128	32.0 ^c	40.6 ^b	25.8 ^c	15.6 ^c

^{a, b, c}; Means with different superscripts with each column are significantly different, $P < 0.01$.

¹ Blastocyst

² Expanded blastocyst

³ Hatching blastocyst

⁴ Hatched blastocyst

Table 5. Effects of human follicular fluid containing mature or immature oocyte on *in vitro* development of mouse 2-cell embryos

Supplements in medium	No. of embryos cultured	% of BL ¹ at day 3		% of BL at day 5	
		Exp ²	Total	Htg ³	Htd ⁴
BSA	84	90.5 ^a	95.2 ^a	88.1 ^a	85.7 ^a
M-hFF	173	86.7 ^a	89.0 ^a	75.1 ^a	72.8 ^a
Im-hFF	168	53.9 ^b	57.7 ^b	44.6 ^b	44.6 ^b

^{a, b} ; Means with different superscripts with each column are significantly different, $P < 0.01$.

¹ Blastocyst

² Expanded blastocyst

³ Hatching blastocyst

⁴ Hatched blastocyst

Table 6. Effects of human follicular fluid grouped by embryo quality and consequent it's implantation (pregnant or non pregnant) on the development of 2-cell mouse embryos *in vitro*

Quality of embryo	Embryonic implantation	No. of mouse embryo cultured	% of BL ¹ at day 3		% of BL at day 5	
			Exp ²	Total	Htg ³	Htd ⁴
Good	pregnancy	337	85.5 ^a	90.8 ^a	79.8 ^a	71.2 ^a
	non pregnancy	385	80.3 ^{ab}	87.0 ^{ab}	71.7 ^b	61.6 ^b
Poor	pregnancy	252	80.6 ^{ab}	86.1 ^{ab}	73.8 ^{ab}	66.7 ^{ab}
	non pregnancy	296	76.7 ^b	84.1 ^b	67.2 ^b	60.1 ^b

^{a, b} ; Means with different superscripts with each column are significantly different, $P < 0.05$.

¹ Blastocyst

² Expanded blastocyst

³ Hatching blastocyst

⁴ Hatched blastocyst

유의하게 낮았다($P < 0.01$). 1세포기 수정란에서 나타난 이러한 유해효과는 대조군과 비교할 때 현저한 차이를 보였는데, 2세포기 수정란에 있어서도 같은 결과를 확인할 수 있었다. 또한, 성숙난포액 첨가군은 대조군에 비하여 1세포기 수정란에서 배반포 발생률에 있어서는 차이가 없었으나, 팽윤배반포 이후에는 유의하게 낮은 발생률을 나타내었으며 ($P < 0.01$), 2세포기 수정란은 대조군에 비하여 낮은 발생률을 보였으나, 유의차는 인정되지 않았다.

3. 인간수정란의 체외발생에 따라 분류된 성숙난포액이 생쥐 수정란의 체외발생에 미치는 효과

회수된 난포액을 인간 수정란의 발생상태와 임신여부에 따라 4군으로 나누어 생쥐 2세포기 수정란을 체

외 배양한 결과는 Table 6에서와 같다. 체외발생상태가 good grade면서 임신된 난포액을 첨가한 배양액에서 poor grade이거나 임신이 되지 않은 난포액을 첨가한 배양액에 비하여 유의하게 높은 발생률을 보였다 ($P < 0.05$).

4. BSA, 제대혈청 및 난포액을 첨가한 배양액에서 인간 수정란의 체외 배양

난포액, 제대혈청 및 BSA를 첨가한 배양액에서 다정자침입이 일어난 인간수정란을 배양한 결과는 Table 7에서 보는 바와 같다. 난포액, 제대혈청 및 BSA를 첨가한 배양액에서 배양된 인간수정란의 상실배의 발생률은 각각 75.6, 53.3 및 46.2%, 배반포의 발생률은 각각 50.0, 40.0 및 7.7%였으며, 부화율에

Table 7. Effect of different protein supplementations on the development of human 1-cell embryos fertilized *in vitro*

Supplement in Ham's F10 medium	No. of 1-cell embryos	% of embryos developed to		
		Morula	Blastocyst	Hatching blastocyst
hFF	24	75.6 ^a	50.0 ^a	25.0 ^a
hFCS	30	53.3 ^{ab}	40.0 ^a	13.3 ^{ab}
BSA	26	46.2 ^b	7.7 ^b	0.0 ^b

^{a,b} : Means with different superscripts with each column are significantly different, $P < 0.05$.

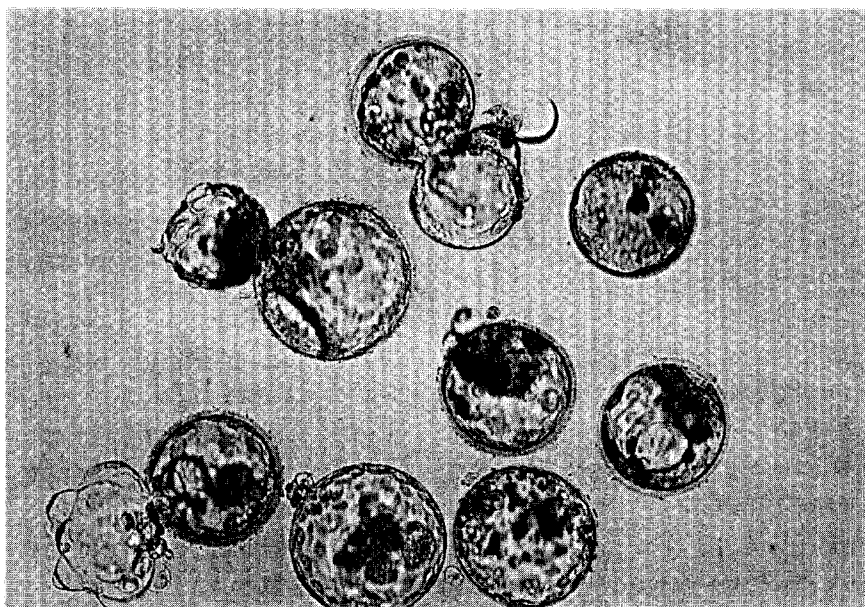


Fig. 3. Human blastocysts and hatching blastocysts cultured in hFF ($\times 100$).

있어서 25.0, 13.3 및 0.0%로서 모든 단계에서 BSA를 첨가한 군에 비하여 난포액을 첨가한 배양액에서 배양된 수정란의 발생률 (Fig. 3)이 유의하게 높았으나 ($p < 0.05$), 제대혈청 첨가군과는 유의차가 없었다.

IV. 고 찰

본 연구에서는 난포액을 포유동물 수정란의 체외배양에 있어 첨가제로서 가장 많이 사용되고 있는 제대혈청과 비교하기 위하여 생쥐 및 인간 수정란의 발생률을 비교하였으며, 난포액의 효율적인 사용방법을 모색

하기 위해 난포액을 난자의 성숙 정도, 분할 상태 및 착상 여부에 따라 구분하여 생쥐 수정란의 발생을 비교하였다. 난포액과 제대혈청을 첨가제로 사용하여 생쥐 수정란의 발생률을 비교한 결과, 분할율이나 배반포의 발생률이 난포액 첨가군에서 유의하게 높았다. 특히 본 연구의 배양체계에서 생쥐 수정란을 somite stage 까지 성공적으로 발달시켜 체외배양체계에서도 착상 이후의 배발달이 가능하다는 것을 확인하였는데, 난포액이 착상 이후의 배발달에도 유의한 효과가 있었다. 따라서 난포액이 난모세포의 성숙뿐 아니라 수정란의 viability를 촉진시키는 것으로 생각된다.

현재까지 난포액이 수정란의 발생에 미치는 영향에 대해서 여러 연구자들이 보고한 바에 의하면 (Hung 등, 1985; Richards 등, 1990), 난포액에는 수정란의 발생을 억제하는 물질이 존재하는 것이 제시되었다. 이들은 난포액을 난자의 성숙도 및 호르몬 농도에 의해 분류하여 억제효과를 비교하였다. Hung 등 (1985)은 생쥐 수정란의 체외발생을 억제하는 효과는 estradiol의 농도에는 비례하고 progesterone의 농도에는 반비례하는 것으로 나타났으며, 난포가 성숙함에 따라 증가한다고 하였다. 한편 Richards 등 (1990)은 난자의 수정여부와 환자의 임신여부에 따라 난포액을 구분하여 생쥐수정란의 발생율을 비교한 결과, 수정란의 발생을 억제하는 효과는 수정된 난포액을 첨가했을 경우에 낮게 나타났으며, 특히 임신된 환자의 난포액을 첨가한 경우에 낮게 나타났다고 하였다. 본 연구에서도 미성숙난자를 포함한 난포액과 성숙난자를 포함한 난포액으로 구분하여 생쥐 수정란을 체외배양한 결과, 미성숙난자를 포함한 난포액에서 낮은 발생율을 나타내었다 ($P < 0.01$). 특히 1세포기 수정란의 경우 BSA첨가군에 비해 미성숙난자가 들어있는 난포액군에서 수정란의 발생율이 현저히 낮게 나타났는데, 이러한 결과는 미성숙난포액 내에는 생쥐수정란의 발생을 억제하는 물질이 존재하고 난자가 성숙함에 따라 감소한다고 사료된다.

성숙난포액과 미성숙난포액에서 생쥐배의 발생을 억제하는 효과의 차이가 난포액의 조성과 연관성이 있는지를 본 연구에서 알아보기 위하여 단백질 및 steroid hormone의 농도를 비교하였다. 총단백질, albumin 및 steroid hormone 중 estradiol이 미성숙난포액군에서 유의하게 낮게 나타났다. Carson 등 (1982)과 Fischel 등 (1983)에 의하면 난자가 수정된 난포액에서 수정이 되지 않은 난자를 포함한 난포액에 비하여 estradiol과 progesterone의 농도가 유의하게 높게 나타났는데, 이러한 결과로 steroid hormone의 농도가 난자의 성숙도, 수정능력 및 발생율을 나타내는 뚜렷한 지표가 된다고 보고하였다. 본 실험에서 estradiol의 농도는 성숙난포액에서 미성숙난포액에 비하여 유의하게 높았으나, progesterone은 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 보고자들과의 차이는 미성숙난자의 성숙 정도, 혹은 호르몬 분석 방

법의 차이에서 기인한 것으로 생각된다.

체대혈청이나 난포액을 첨가한 배양액에서 배양한 생쥐 1세포기 수정란의 체외발생율은 BSA첨가군보다 유의하게 낮은 결과를 보였다. 이는 Ogawa 등 (1987)이 혈청의 small weight fraction부분에 생쥐 수정란의 발생에 toxic한 성분이 있으며, Richards 등 (1989)의 인간 난포액내에 생쥐배의 발생을 억제하는 inhibitor가 존재한다는 보고와 일치한다. 그러나, 이러한 결과는 인간수정란의 배양실험에서는 다르게 나타났다. Chi 등 (1988)은 종에 따라 수정란의 대사작용에 차이가 있음을 제시한바 있는데, 본 실험에서 인간수정란을 이용하여 체외발생율을 살펴 본 결과에 의하면 BSA를 첨가한 배양액에서 배양된 수정란의 상실배, 배반포 및 부화배반포 발생율이 난포액 첨가군에 비하여 유의하게 낮게 나타났다. 따라서 수정란의 체외발생조건은 종간에 큰 차이가 있는 것으로 생각된다.

성숙난포액을 첨가제로 이용하는데 있어 보다 효과적인 선별방법을 모색하기 위하여 난포액을 난포액에 포함되어 있는 인간수정란의 분할상태와 착상여부에 따라 분류하였다. 난포액을 분할상태에 따라 good grade와 poor grade로 분류하여 첨가한 배양액에서 생쥐수정란의 발생율을 비교한 실험결과, good grade면서 임신된 난포액을 첨가한 군이 poor grade이거나 비임신군의 난포액을 첨가한 군에 비하여 각 단계에서 유의하게 높은 발생율을 나타내었다. 이와 유사한 연구 결과는 아직까지 보고된 바가 없으나, 수정란과 난포액의 상태가 수정란의 발달 및 착상에 결정적인 영향을 미친다고 사료된다.

난포액이 수정란의 발생에 미치는 효과에 대하여 대부분의 연구보고들은 난포액이 생쥐수정란의 발생을 억제하므로 포유동물 수정란의 체외배양에 있어 첨가제로 부적당하다고 주장하였다 (Hung 등, 1985; Richards 등, 1990). 그러나 본 실험에서는 난포액을 첨가제로 사용하여 생쥐수정란을 체외에서 착상 후의 시기까지 발달시킬 수 있었으며, 인간수정란에 있어서는 BSA에 비해 유의하게 높은 발생율을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과들은 배양하고자 하는 수정란의 발생단계, 실험동물의 종류 및 난포액의 채취시기와 선별방법에 따라 난포액의 첨가 효과는 다양하다고 생각

된다. 따라서 소, 토끼 등의 가축과 인간배아의 체외 배양에 있어 배란직전의 난포액을 회수하여 수정 및 분할상태, 임신여부에 따라 선별하여 배양액 첨가제로 사용하는 것이 높은 발생율과 착상율을 얻을 수 있으리라 사료된다.

V. 적 요

본 연구는 포유동물 수정란의 체외배양에 있어 배양액 첨가제인 단백질원으로 난포액의 사용 가능성을 알아보고, 또한 난포액을 첨가제로서 효과적으로 이용할 수 있는 선별방법을 모색하고자 실시하였다. 첫번째 실험에서는 포유동물의 체외배양에 있어 첨가제로서 가장 많이 이용되고 있는 제대혈청과 난포액을 T6 배양액에 첨가한 다음 생쥐수정란의 발생을 비교하였다. 두번째 실험에서는 난포액을 성숙한 난자를 포함한 난포액과 미성숙난자를 포함한 배양액으로 구분하여 조성 및 생쥐수정란의 발생을 비교하였으며, 세번째 실험에서는 난포액을 인간 체외수정의 결과에 따라 4군으로 구분하여 수정란의 발생을 비교하였다. 또한 인간수정란을 이용하여 BSA, 제대혈청 및 난포액을 첨가한 배양액에서 체외배양시킴으로써 생쥐 수정란의 발생율과 비교하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 난포액과 제대혈청을 첨가제로 사용하여 생쥐 1세포수정란을 비교한 결과 배란포기까지의 발달율은 각각 88.3와 79.3%로서 난포액 첨가군에서 유의하게 높았으나, 부화배반포는 54.8와 51.6%로서 유사한 발생율을 보였다. Egg cylinder 와 somite stage까지의 발달율은 난포액군에서 높게 나타났다 ($P < 0.05$).
2. 성숙난포액과 미성숙난포액의 단백질 및 steroid hormone의 함량을 비교한 결과, 성숙난포액군에서 총 단백질함량, albumin, estradiol이 높게 나타났다 ($P < 0.05$). 성숙난포액과 미성숙난포액을 첨가제로 이용했을 때 생쥐 1세포기 및 2세포기 수정란을 배양한 결과, 미성숙난포액 첨가군에서 대조군과 성숙난포액 첨가군에 비하여 유의하게 낮은 발생율을 보였다.
3. 인간수정란의 발생상태와 임신여부에 따라 수정란의 체외발생상태가 good grade면서 임신한 난

포액, good grade면서 비임신 난포액, poor grade면서 임신한 난포액과 poor grade면서 비임신 난포액으로 분류하여 T6배양액에 각각 20% 씩 첨가한 후 생쥐 2세포기 수정란을 배양한 결과, good grade면서 임신한 난포액을 첨가한 배양액에서 poor grade이거나 임신이 되지 않은 난포액을 첨가한 군에 비하여 높은 발생율을 보였다 ($P < 0.05$).

4. 난포액, 제대혈청 및 BSA를 첨가한 배양액에서 인간 수정란을 배양한 결과 난포액 첨가군이 BSA첨가군에 비하여 유의하게 높은 발생율을 보였다.

이러한 결과로 난포액이 수정란의 발달에 미치는 효과는 실험동물 및 난포액의 채취시기와 선별방법에 따라 다르며, 양질의 난포액을 정밀하게 회수하여 첨가제로 사용하는 것이 포유동물 수정란의 발생 및 착상율을 증진시킬 것으로 사료된다.

VI. 인용문헌

1. Ashwood-Smith, M. J., P. Hollands and R. G. Edwards. 1989. The use of Albuminar (TM) as a medium supplement in clinical IVF. Human Reprod. 4:702-705.
2. Ben-Rafael, Z., G. S. Kopf, L. Blasco, R. W. Tureck and L. Jr. Mastroianni. 1986. Fertilization, and cleavage after reinsemination of human oocytes *in vitro*. Fertil. Steril. 45:58-62.
3. Caro, C. M. and A. O. Trounson. 1984. The effect of protein on preimplantation mouse embryo development *in vitro*. J. In Vitro Fert. Embryo Transfer. 1:183-187.
4. Carson, R. S., A. O. Trounson and J. K. Findlay. 1982. Successful fertilization human oocytes *in vitro* : Concentration of estradiol-17 β , progesterone and androstenedion in the antral fluid of donor follicles. J. Clin. Endocrinol. Metab. 55:798-803.
5. Cha, K. Y., S. H. Yoon, J. J. Ko, D. H. Choi, S. Y. Han and J. J. Koo. 1989. Preg-

- nancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from unstimulated cycles, their culture *in vitro* and their transfer in a donor oocyte program. 45th Annual Meeting the American Fertility Society.
6. Chi, M. M. Y., J. K. Manchester, V. C. Yang, A. D. Curato, R. C. Strickler and O. H. Lowry. 1988. Contrast in levels of metabolic enzymes in human and mouse ova. *Biol. Reprod.* 39:295-307.
 7. de Ziegler, D., M. I. Cedars, F. Hemilton, T. Moreno and D. R. Meldrum. 1987. Factors influencing maintaince of sperm motility during *in vitro* processing. *Fertil. Steril.* 48: 816-820.
 8. Fischel, E. B., R. G. Edwards and D. E. Walters. 1983. Follicular steroids as a prognosticator of successful fertilization of human oocytes *in vitro*. *J. Endocrinol.* 99:335-344.
 9. G rgan, T., B. Urmen, K. S. Diker, L. Delibasi and H. A. Kismisci. 1993. Human follicular fluid from preovulatory follicles in patients undergoing *in vitro* fertilization inhibits the *in vitro* growth of Gram positive microorganisms. *Human Reprod.* 8:508-510.
 10. Hung, T. T. and M. M. Millard. 1985. Identification of mouse embryo inhibiting factor in the human preovulatory follicular fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61:899-905.
 11. Kruger, T. F., F. S. Stander, K. Smith, J. P. Van der Merwe and C. J. Lombars. 1987. The effect of serum supplementation on the cleavage of human embryos. *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer.* 4:10-12.
 12. Leung, C. K. M., M. K. H. Leong, M. J. Tucker, Y. M. Chan, C. J. Y. Wong and S. Y. M. Chan. 1989. Use of follicular fluid for gamete transfer in GIFT. 6th World Congress *In Vitro* Fertilization and Alternate Assisted Reproduction, pp 44.
 13. Lopata, A. 1980. Success and failure in human *in vitro* fertilization. *Nature.* 288:642.
 14. McNatty, K. P. and R. S. Sawers. 1975. Relationship between the endocrine environment within the Graaffin follicle and the subsequent rate of progesterone secretion human granulosa cells *in vitro*. *J. Endocrinol.* 66:391-400.
 15. McNatty, K. P., D. M. Smith, A. Markris, R. Osathanonch and K. J. Ryan. 1979. The microenvironment of the human antral follicle : Interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte *in vivo* and *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49:851-860.
 16. McNatty, K. P., W. M. Hunter, A. S. McNeilly and R. S. Sawers. 1975b. Changes in the concentration of pituitary and steroid hormones in the follicular fluid of human Graafian follicles throughout the menstrual cycle. *J. Endocrinol.* 64:555-571.
 17. Meizel, S. 1985. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am. J. Anat.* 174:285-302.
 18. Menezo, Y., K. Testart and D. Perrone. 1984. Serum is not necessary in human *in vitro* fertilization, early embryo culture, and transfer. *Fertil. Steril.* 42:750-755.
 19. Mohr, L. R., A. O. Trounson, J. F. Leeton and C. Wood. 1983. Evaluation of normal and abnormal human embryo development during procedures *in vitro*. "Fertilization of the human Egg *In Vitro*". (H. M. Beier and H. R. Linder, eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp 211-221.
 20. Mortimer, D. and A. R. Camenzind. 1989. The role of follicular fluid in inducing the acrosome reaction in human spermatozoa incubated *in vitro*. *Human Reprod.* 4:169-174.

21. Ogawa, T., T. Ono and R. P. Marrs. 1987. The effect of the serum fractions on single-cell mouse embryos *in vitro*. J. In Vitro Fert. Embryo Transfer. 4:153-158.
22. Richards, D. W., P. Ruinn, B. A. Stone and R. P. Marrs. 1990. Effect of human follicular fluids from pregnant and nonpregnant patients on the development of mouse zygotes *in vitro*. J. In Vitro Fert. Embryo Transfer. 7:22-27.
23. Saito, H., T. Berger, D. R. Mishell and R. P. Marrs. 1984. Effect of variable concentration of serum on mouse on embryo development. Fertil. Steril. 41:460-464.
24. Seppälä, M., T. Wahlström, A. I. Koskimies, A. Tenhunen, E. M. Rutanen, R. Koistinen, I. Huhtaniemi, H. Bohn and U-H. Stenman. 1984a. Human preovulatory follicular fluid, luteinized cells of hyperstimulated preovulatory follicles and corpus luteum contain placental protein 12(PP12). J. Clin. Endocrinol. Metab. 58:505-510.
25. Seppälä, M., A. Tenhunen, A. I. Koskimies, T. Wahlström, R. Koistinen and U-H. Stenman. 1984b. Hyperstimulated human preovulatory follicular fluid contains placental protein 5(PP5). Fertil. Steril. 41:62-65.
26. Staissen, C., E. Van der Abbeel, M. Carle, I. Khan, P. Devroey and A. C. Van der Steirteghem. 1990. Comparison between human serum and Albuminar-20(TM) supplement for *in vitro* fertilization. Human Reprod. 5:336-341.
27. Tesárik, J. 1985. Comparison of acrosome reaction inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and inophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 74:383-388.
28. Yanagimachi, R. 1970. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. J. Reprod. Fertil. 23:193-196.
29. Yoon, S. H., J. J. Ko, J. J. Koo, D. H. Choi, S. Y. Han and K. Y. Cha. 1989. Graafian follicular fluid may be induced to mature, fertilize and develop immature oocytes from bovine and human follicles of non-stimulated cycle *in vitro*. 6th World Congress In Vitro Fertilization and Alternate Assisted Reproduction.
30. 윤산현, 고대환, 박세필, 박태균, 정길생. 1990. 우난포란의 체외성숙에 관한 연구. I. 난포란의 회수 및 체외배양. 한국축산학회지. 31:201-209.