

냉동보존된 생쥐배아를 이용한 정도관리에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실

한선남 · 김향미 · 정혜원 · 오승은 · 손영수 · 유한기 · 안정자 · 우복희

Studies on Quality Control by Frozen-Thaw 2-Cell Mouse Embryos

Sun-Nam Han, M.D., Hyang-Mee Kim, M.D., Hae-Won Jung, M.D., Seung-Eun Oh, M.S.,
Young-Soo Son, M.D., Han-Ki Yu, M.D., Jung-Ja Ahn, M.D. and Bock-Hee Woo, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ewha Woman's University, Seoul, Korea

= Abstract =

These studies were carried out to investigate the optimal freezing protocol for 2 cell mouse embryos and to find the probability of quality control with 2-cell embryos frozen.

The embryos showed the best survival by the protocol composed of a freezing solution with the cryoprotectants(1.5M propanediol + 0.1M sucrose), and a 2-steop thawing method(room temperature, 20 sec-37°C, 20 sec).

The developmental ability of frozen-thaw 2-cell embryos did not differ from that of fresh 2-cell embryos in m-KRB medium with 0.4% bovine serum albumin. But development of frozen-thaw embryos was depended on the supplements of the medium. In the albumin-free medium, the developmental rate(rate of blastocysts) was significantly reduced, compared with that in the medium with 0.4% BSA.

Also, when frozen-thaw embryos were cultured in the meduim with human fetal cord serum(HCS), the developmental rate of frozen-thaw embryos was sligtly reduced, compared with that of fresh 2-cell embryos.

Finally, frozen-thaw 2-cell mouse embryos were more sensitive to the toxic agent of disposable-plastic syringe. Therefore, toxicity of medium could be effectively detected by frozen-thaw 2-cell mouse embryos.

서 론

인간 난자의 체외 수정 및 배아의 자궁내 이식에 관계 되는 모든 배양 조건의 정도관리를 위해서 생쥐 배아를 이용한 생물학적 검증이 사용된다(Ackerman 등, 1984). 생쥐 배아의 발생 생리의 기본적인 기전이 포유동물의 특성을 지니고 있으므로, 인간 배아의 발생 생리와 유사한 점이 있어 이러한 특성을 이용하여 정도관리에 사용할 수가 있다. 연구자들은 생쥐 배아의 배양조건을 만족시키는 경우에 사람의 배아도 성장 시킬 것으로 믿고 있으며, 반대로 생쥐 배아의 발달을 정지시키거나, 저해하는 경우

에는 사람의 배아에도 마찬가지로 작용할 것이다(Wolf 등, 1985).

실험실에 따라서는 인간 정자나 햄스터 정자의 체외 생존 검증법으로 배양액의 정도관리를 시행하고 있으나, 정자는 생쥐 배아에 비하여 유해한 환경에서 더욱 잘 견딘다. 그리고 검사하는 기준이 정자의 생존율을 기준으로 할 경우에는 판단 기준이 애매 모호하다(Bavister 등, 1988).

생쥐 배아를 이용한 생물학적 검증은 시험관 아기 프로그램에서 사용되는 배양조건이 배아에 독성 작용을 나타내는지 검사할 수 있는 거의 유일한 방법이다(Ackerman 등, 1983). 생쥐 배아를 이용한 생물학적 검증법은 여러 단계를

거쳐서 준비를 하여야 하기 때문에 여기에 부수되는 많은 문제가 있다. 예를 들면, 과배란 유도후에도 생쥐의 체내에서 배란이 안되는 경우도 있으며, 짝 짓기가 이루어지지 아니하여 수정이 안되는 경우도 있고, 배아의 난황이 생체내에서 부적절하게 생기는 경우도 생각할 수 있으며, 2-세포기 block으로 난황이 진행되지 않는 경우도 발견된다. 이러한 일이 발생하면 정도 관리의 계획에 차질이 와서 시험관 아기 프로그램에 문제가 야기되기도 한다. 그러므로 배양액, 혈청 및 기타 배양에 사용되는 기구들의 정도 관리를 위해서 매년 많은 수의 생쥐를 희생 시키면서 생물학적 검증을 실시하는 것은 거의 불가능한 실정이다.

만약 냉동 보존된 생쥐 배아를 사용하여 정도관리를 실시하여도 동일한 결과를 얻을 수 있다면 냉동 보존된 생쥐 배아를 이용한 생물학적 검증방법은 모든 정도 관리에 쉽게 응용할 수 있을 것이다.

따라서 저자는 정도 관리에 사용되는 생쥐 2-세포기 배아의 유용성을 검토하고, 생쥐 2-세포기 배아를 냉동 보존후 동일 조건에서 배양액의 정도 관리에 사용할 수 있는지를 비교 분석하기 위해서 본 연구를 시도하였다.

연구재료 및 방법

1. 실험동물

생쥐는 한국과학 기술원 생물검정실에서 구입된 제1대 잡종(C57BL/6×CBA)을 이용하였다. 생쥐는 광량(dark:light=12:12), 온도(22℃) 및 환풍시설이 갖추어진 사육실에서 1-2주간 적응 후 6주령시에 사용하였다. 수컷은 한우리에 한마리씩 사육하면서 수정능력을 확인한 다음 4개월령시에 사용하였고, 수컷과 암컷은 1:1비율로 짝짓기 시켰다. 사료와 물은 자유급식 시켰다.

2. 과배란유도 및 2-세포기 배아의 회수

과배란 처리는 5IU의 임마혈청 성선자극호르몬(prnigant mare's serum gonadotropin, 이하 PMSG로 약함. Sigma No. G-4877)과 5IU의 임부유모성 성선 자극호르몬(human chorionic gonadotropin, 이하 HCG로 약함. Sigma No. CG-2)을 50시간 간격으로 각각 복강내 주사하였다. 주사용 호르몬은 생리식염수에 희석하여 1ml(50IU)씩 1회용 주사기에 분주한 후 냉동

실(-20℃)에 보존하여 사용하였다. HCG 주사후 즉시 암컷을 수컷 우리에 넣어 교배를 유도하였다.

후기 2-세포기 배아는 HCG주사 46시간후에 30 게이지 주사침이 부착된 일회용 튜버크린 주사기로 난관을 관류하여 회수하였다. 현미경은 실체현미경(Nikon, SMZ-10)을 이용하였으며, 배아의 회수액은 0.4% 소혈청알부민(bovine serum albumin, 이하 BSA로 약함)이 첨가된 인산완충액(Dulbecco's phosphate buffered saline 이하 d-PBS로 약함; GIBCO Cat, No. 450-1300)을 사용하였다. 회수 용기는 일회용 petri dish(35×10mm, FALCON 3001)를 사용하였다. 회수된 생쥐의 2-세포기 배아는 동일한 수로 각각의 처리군에 배치 하였다.

3. 동결보존액과 용해액

동결보존액과 용해액을 제조하기 위한 기본용액은 인산완충액에 20%(v/v)의 인간 태아 체대 혈청(human fetal cord serum 이하 HCS로 약함)을 첨가하였다. 동결보존액은 기본용액(10ml)에 1, 2-Propanediol(이하 ProH로 약함; Sigma Cat. No. P-1009)을 1.25ml 첨가하여 1.5M ProH용액을 만든 다음 여기에 0.1M sucrose(sigma Cat. No. S-0389)를 첨가하여 최종 동결 보존액으로 사용하였다.

용해액은 기본용액과 0.5M 및 1.0M ProH용액에 각각 0.1M sucrose를 혼합하여 제조하였다. 이와같이 제조된 동결보존액과 용해액은 각각 0.2μ millipore filter(Acrodisc 4192, Gelman)로 여과하여 멸균을 실시하였다.

동결보존액과 용해액은 동결 또는 용해 1-2시간 전에 제조된 신선한 용액을 실험에 사용하였다.

4. 동결 방법과 용해 방법

1) 배아의 탈수(dehydration)

배아의 세포질내에 존재하는 물을 제거하고, 제거된 양만큼 동해방지제(cryoprotectant)를 세포질내로 유입시키는 탈수과정은 다음과 같이 4단계로 실시하였다. 정상적으로 발달한 배아를 0.5M, 1.0M, 1.5M ProH용액과 1.5M ProH+0.1M sucrose용액에서 각각 5분, 5분, 10분 및 5분간 노출시킴으로써 단계적인 탈수를 실시하였다.

2) 스트로(straw)에 배아의 장진(loading)

마지막 탈수가 진행되는 동안 배아는 1.5M

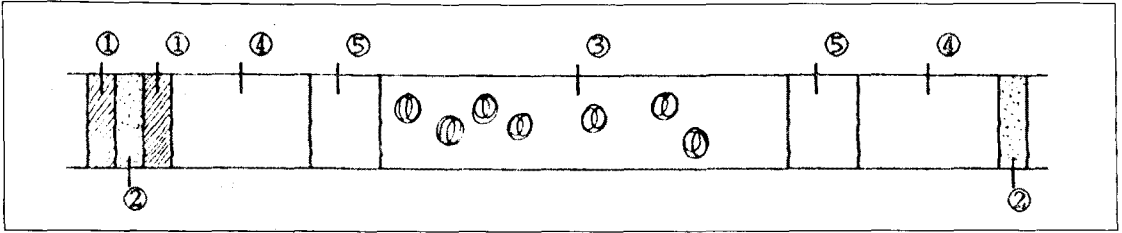


Fig. Loading of embryos and freezing solution in a 0.25ml straw.

① cotton, ② starch, ③ freezing solution and embryos, ④ freezing solution, ⑤ air

PrOH+0.1M Sucrose용액과 함께 0.25ml 프라스틱 스트로(A-201, IMV, France)에 미세 파스투르 피펫을 사용하여 넣었다.

스트로내에 배아와 동결보존액의 장진방법은 그림 1과 같다.

3) 배아의 동결과정

배아를 넣은 스트로는 마지막 탈수시간이 종료 되자마자 동결기로 옮긴 다음 컴퓨터 프로그램이 내장된 배아 동결기(KRYO 10, Planer)를 다음 같이 가열시켰다. 실온에서 영하 7°C까지 분당 2°C로 온도를 하강한 후, 영하 7°C에 도달하여 1분이 경과할때, 액체질소(영하 196°C)에서 건져낸 핀셀으로 스트로를 가볍게 집어 줌으로써 식빙(seeding)을 실시하였다. 식빙 후 5분간 동결기 내에 정지한 후 영하 30°C까지 분당 0.3°C로 온도를 하강시키고, 이 온도에서 10°C간 정지 시킴으로써 배아의 동결 보존을 완료 하였다. 그 다음 스트로를 액체 산소 탱크로 옮겨서 실험전까지 동결 보존 하였다.

5. 융해와 배아의 복수(rehydration)

동결된 스트로를 액체질소로부터 상온(25°C)으로 옮긴 후 상온에서 스트로를 20초간 노출시킨 다음 37°C 물에 담귀 20초간 융해 하였다. 그 다음 스트로의 물기를 거즈로 제거하고, 알콜거즈로 소독한 후 스트로내의 용액과 배아를 배양접시(FALCON 3001, Becton Dickinson)로 옮겼다.

배아를 용해액(1.0M PrOH+0.1M sucrose→0.5M PrOH+0.1M sucrose→PBS+0.1M sucrose)에서 각각 5분간 노출시킴으로써 탈수(dehydration)의 역과정을 거쳤다. 세포내의 동해방지제가 세포밖으로 빠져나가면서 물이 세포내로 침투하여 응축된 환구는 정상적인 형태로 복귀하는 것을 해부 현미경 아래서 관찰하였다. 복수 후 배아를 기본용액에서 3차례 씻어 준 다음 배양액으로 옮겼다.

6. 배양액과 혈청의 제조

배양액은 Ham's F10(GIBCO Cat. No. 430-1700)과 modified Krebs-Ringer bicarbonate(이하 m-KRB로 약함)를 사용하였다. 배양액 제조용 물은 Baxter회사의 고순도물(Cat. No. 367-4)을 사용하였다. 배양액과 혈청의 제조과정은 다음과 같다.

1) Ham's F10 배양액의 제조과정

- (1) 모든 용기는 배양액 제조 직전에 고순도 물로 2회 헹군다.
- (2) Volumetric flask에 물(약 600ml)을 붓고 Ham's F-10 분말을 넣어 자석 교반기에서 서서히 용해시킨다.
- (3) 100ml의 고순도 물에 2.1g의 sodium bicarbonate(Sigma, Cat. No. S5761)를 녹인다.
- (4) 100ml의 고순도 물에 0.2452g의 Ca-lactate(Calbiochem. Lot. 901244)를 넣어 자석교반기로 30분이상 용해시킨다.
- (5) 100ml의 고순도 물을 넣은 beaker에 각각 0.075g의 penicillin(Sigma, Stock. No. PEN-NA)과 streptomycin(Sigma, Stock. No. S-6501)을 넣고 잘 녹인다.
- (6) 용액(3)를 용액(4)에 혼합한 후 이 혼합액을 용액(5)에 첨가한다.
- (7) 용액(6)을 용액(2)에 조금씩 흔들면서 서서히 첨가한다.
- (8) 용액(7)에 고순도 물을 volumetric flask의 11 눈금까지 첨가한다.
- (9) 용액(8)을 잘 섞은 다음 삼투압을 측정 한 후 최종 삼투압을 280mOsm/kg으로 조정한다.
- (10) 용액(9)을 0.2μ millipore filter로 여과 후 4°C 냉장고에 보존한다.

2) m-KRB 배양액의 제조과정

- (1) 모든 용기는 배양액 제조 직전에 고순도

물로 2번 행군다.

(2) Stock I 용액의 제조

* Stock I 용액(100ml) 제조 시약과 첨가량

·NaCl	663.8mg
·KCl	432.0mg
·CaCl ₂ · 2H ₂ O	30.0mg
·KH ₂ PO ₄	19.4mg
·MgSO ₄ · 7H ₂ O	34.8mg

- ① Beaker I 에 40ml 정도의 고순도 물을 넣고 위의 stock I 에 기록되어 있는 정량의 시약을 순서대로 용해시킨다.
- ② Beaker II 에 40ml 정도의 고순도 물을 넣고 정량의 CaCl₂를 넣어 자석교반기로 30분이상 녹인다.
- ③ I 에 II 를 섞은 후 phenol red를 넣고, I + II 의 용액을 100ml의 volumetric flask 에 부어 고순도 물을 첨가하므로써 100ml 의 부피를 맞춘다.
- ④ Stock I 의 삼투압을 측정한다(230 ± 5m Osm/kg. H₂O).

(3) Stock II 용액의 제조

* Stock II 용액(50ml)의 제조 시약과 첨가량

·NaHCO ₃ · 7H ₂ O	1300.0mg
·Phenol Red	0.2mg

- ① Beaker III 에 40ml의 고순도 물을 넣고 NaHCO₃ · 7H₂O을 용해시킨다.
- ② III 에 phenol red를 넣은 후 50ml의 volumetric flask에 붓고 고순도 물을 첨가하므로써 50ml이 되게 한다.
- ③ Stock III 삼투압을 측정한다(270 ± 5mO sm/kg. H₂O).

(4) m-KRB 100ml의 제조

- ① Stock I 용액의 83.35ml과 Stock II 용액의 16.3ml를 혼합한다.
- ② 이 혼합액에 다음의 시약을 첨가한 후 서서히 용해한다.

·Glucose	100.0mg
·Streptomycin	5.0mg
·Penicillin	7.5mg
·Na-pyruvate	5.5mg
·Na-lactate	0.2mg

(5) m-KRB 100ml의 삼투압을 측정한다(270 ± 10mOsm/kg. H₂O).

3) 인간태아제대혈액의 제조과정

인간태아제대혈액을 채취한 후 4°C 냉장고에서 6-12시간 동안 보존하면서 응고시켰다. 그 다음 혈청성분을 원심분리(1,000r.p.m., 30분)

한 후 36°C 항온수조(56°C)에서 60분간 비동화시켰다. 마지막으로 0.45 마이크론 millipor filter로 여과하여 -20°C 냉동실에 보존하였다.

7. 배아의 배양 및 발생관찰

배아는 실험목적에 따라서 Ham's F10 또는 m-KRB에서 배양되거나 또는 이들 배양액에 BSA 또는 HCS를 첨가하여 배양 하였다. 첨가 농도는 대조군에서는 0.4% BSA와 10% HCS 이 이용되었다.

배아는 배양접시(Falcon 3037, Becton Dickinson)의 inner well에서 배양되었으며, 배양기는 5% CO₂, 99% moisture, 및 37°C의 배양기(Forma scientific)가 사용되었다.

배아의 발생관찰은 실체현미경(Nikon, type SMZ)의 80X 또는 역반사현미경(Inverted Microscope; Nikon 804239)의 100X, 200X, 400X 하에서 실시하였다. 발생관찰은 배양 후 1, 2, 3 및 4일째에 각각 수행하였으며, 필요한 경우에는 현미경 사진 촬영을 하였다.

8. 실험설계

본 연구는 다음과 같이 설계되어 수행하였다.

연구 I : 정도관리를 위한 동결시스템을 확립하기위하여 동결보존에 있어서 중요한 2가지 요인(비침투성 동해방지제의 농도, 용해방법)을 검토한 후 배아의 생존율을 처리간에 비교하므로써 본 연구에 적합한 동결시스템을 확립하였다.

연구 II : 동결-용해 후 2-세포기 배아의 체외발생능력을 검토하고, 적합한 배양조건을 규명하였다. 아울러 동결배아의 특성에 따른 효율적인 정도관리 방법을 모색하였다.

연구 III : 동결-용해된 2세포기 배아를 이용하여 인위적으로 유해인자를 오염시킨 배양액의 정도관리를 실시하므로써 동결-용해된 배아의 이용 효율성을 검토하였다.

연구 성적

1. 정도 관리를 위한 동결시스템의 확립

동결배아(frozen embryos)에 의한 정도관리 연구를 수행하기에 앞서 생쥐 세포기 배아의 동결시스템을 확립하기 위하여, 배아의 동결에 중요한 영향을 미치는 동결방지제(cryoprotectant, CP)의 농도와 용해방법에 있어서 자체적인 검토를 수행하였다. 동결방지제로는 침투

성 동해방지제 (permeating cryoprotectant)인 PrOH의 농도를 1.5M로 고정하고, 비침투성 동해방지제(nonpermeating cryoprotectant)인 sucrose의 농도를 0.05, 0.1, 0.15 및 0.2M로 한 결과, 동결-융해 후 배아의 생존율은 생쥐 2세포기 배아의 완만냉각동결에 있어서는 0.1M의 sucrose 용액을 사용하였을 때 가능 높은 배아의 생존율(84.0%)을 보였다($p < 0.05$)(표 1).

동결후 융해 방법에 따른 배아의 생존율을 비교하기 위해서 1단계 방법(동결보존된 스트로를 37°C의 물에서 40초간 융해)과 2단계 방법(동결보존된 스트로를 상온에서 20초간 방치후 37°C의 물에서 20초간 융해)을 비교하였다(그림 2).

동결 보존된 생쥐 2세포를 융해하는 방법에 있어서는 2단계 방법(80%)이 1단계 방법(42%)보다 통계적으로 유의하게 더 높은 생존율을 보였다($p < 0.05$)(표 2).

2. 동결-융해된 배아의 체외발생능과 이용가능성

동결-융해된 생쥐 2세포기 배아(frozen-thaw 2-cell embryos)의 체외 발생능력은 신선배아(fresh 2-cell embryos)와 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다(92.5%:97.5%), 특히, 팽윤 배반포(expanded blastocysts)이상 발달한

배아의 비율(82.5%:95.0%)에 있어서 동결-융해된 배아가 신선배아보다 낮은 경향이 있지만, 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다(표 3).

따라서 동결-융해된 생쥐 2세포기 배아는 정도관리(quality control)를 위해 신선배아 만큼 이용가능성이 있음을 알 수 있었다. 그러나, 동결-융해된 배아의 체외발생능은 체외 배양조건에 매우 민감한 반응을 보였다. 즉, m-KRB배양액에 0.4% 소혈청 알부민을 첨가한 경우에는 동결배아와 신선배아간에 차이가 없었지만, 동일한 배양액에 알부민을 전혀 첨가 않는 경

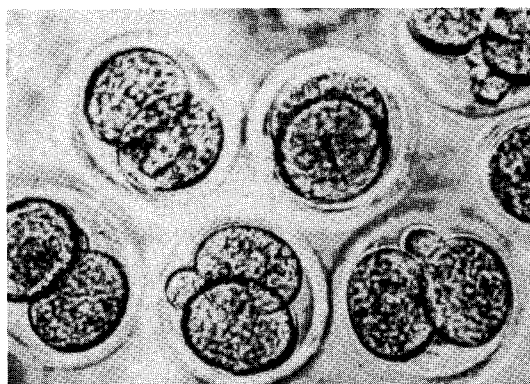


Fig. 2. Two-cell mouse embryos frozen-thaw by slow-cooling and 2-step thawing methods.

Table 1. Effect of concentration of non-permeating cryoprotant(sucrose) on the survival of 2-cell mouse embryos in a slow-cooling freezing protocol

Cryoprotectant(Mol.)		No. of embryos frozen	No.(%) of embryos recovered	No.(%) of Intact embryos		
Permeating ^a	Non-permeating ^b			Whole ^c	Partial ^d	Total
1.5	0.05	25	16(60)	7(28)	4(16)	11(44)
1.5	0.10	25	23(92)*	19(76)*	2(8)*	21(84)*
1.5	0.15	25	18(72)	11(44)	5(20)	16(64)
1.5	0.20	25	9(36)	2(8)	3(12)	5(20)

^a 1, 2-propanediol, ^b sucrose, ^c 2-blastomeres, ^d 1-blastomere.

* Within each column, there is significantly different, compared with means with no superscript.

Table 2. Effect of thawing methods on the survival of frozen 2-cell mouse embryos

Thawing methods	No.(%) of embryos frozen	No.(%) of embryos recovered	No.(%) of Intact embryos		
			Whole	Partial	Total
1-step ^a	50	31(62)*	16(32)**	5(10)	21(42)***
2-step ^b	50	48(96)*	38(76)**	2(4)	40(80)***

^a Frozen straws were directly thaw in 37°C water bath for 40 seconds, ^b Frozen straws were exposed at room temperature for 20 seconds and then thaw in 37°C water bath for 20 seconds.

*:**:***: $p < 0.05$.

우에는 동결배아(50.0%)는 신선배아(95.0%)보다 발생율(배반포의 비율이 현저히 낮았다($p < 0.05$). 이와 같이 albumin-free 배양액에서 동결배아의 발생율이 낮은 것은 초기 난할기의 발생중지율(20.0% vs. 0%)과 상설배기의 발생중지율(30% vs. 5%)이 높는데 기인하였다.

배양조건에 있어서 동결배아의 이러한 민감도는 배양액에 첨가되는 단백질원(알부민, 혈청등)의 정도관리에 효율적으로 이용될 수 있음을 알 수 있었다. 또한 동결배아의 발생생리에 있어서 본 연구에 사용한 알부민(지방산이 함유된 알부민)은 매우 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

배양액에 첨가되는 인간태아제대혈청 HCS에 대한 신선배아와 동결배아의 반응은 각각 표 4와 같다.

신선배아뿐만 아니라 동결배아도 대조군(알부민 첨가배양액)보다 혈청 첨가군서 낮은 발생율을 보였다($p < 0.05$). 더욱 팽윤 배반포 이상 발달한 배아의 비율에 있어서 두 처리(알부민 vs. 혈청)간의 차이는 신선배아(96% vs. 78%)보다 동결배아(80%:52%)에서 더욱 두드

러졌다. 이러한 사실은 신선배아 보다는 동결배아가 혈청의 유해효과에 더욱 민감한 반응을 보임을 알 수 있었다.

그러므로 동결배아는 배양조건(알부민 또는 혈청첨가)에 대해 신선배아보다 더욱 민감한 작용을 나타내므로 이러한 동결배아의 특성을 고려한다면 정도관리를 더욱 효율적으로 수행할 수 있을 것이다.

3. 동결배아에 의한 배양액의 정도관리

배양액에 유해인자를 인위적으로 오염시킨 후 신선배아와 동결배아의 배양 결과는 표 5와 같다.

유해인자의 오염방법은 일회용 플라스틱 주사기에 m-KRB 배양액을 2시간 노출시켰으며(처리군), 이 노출된 배양액의 절반에는 0.4% 소혈청알부민(BSA)을 첨가하였다. 한편 대조군(노출되지 않은 배양액)도 0.4% BSA 첨가군과 무첨가군을 배치하여 배아의 체외발생을 처리군과 비교하였다. 모든 배아는 처리군과 대조군에서 2일간 배양한 후 ham's F10+0.4% BSA 배양액으로 옮겨 배양하였다. 신선배아는

Table 3. In vitro development of fresh and frozen mouse 2-cell embryos cultured for 2 days in m-KRB medium with or without 0.4% BSA

Addition of 0.4% BSA	Treatment of embryos	No.(%) of embryos cultured	No.(%) of embryos arrested ^a	No.(%) of morulae	No.(%) of blastocysts	
					> Expanded	Total
With	Fresh	40	1(2.5)	2(5.0)	38(95.0)	39(97.5)
	Frozen	40	0(0)	1(2.5)	33(82.5)	37(92.5)
Without	Fresh	40	0(0)	1(5.0)	35(87.5)*	38(95.0)**
	Frozen	40	8(20.0)	12(30.0)	13(32.5)*	20(50.0)**

^a arrested before the stage of morulae, *: **: $p < 0.05$.

Table 4. Effect of medium supplements on development of fresh and frozen-thaw 2-cell mouse embryos cultured for 2 days

Embryos	Supplements of medium	No.(%) of embryos cultured	No.(%) of embryos arrested	No.(%) of morulae	No.(%) of blastocysts	
					> Expanded	Total
Fresh	Albumin ^a	50	0(0)	2(4.0)	48(96.0)*	48(96.6)*
	Serum ^b	50	2(4.0)	6(12.0)	39(78.0)*	42(84.0)*
	Albumin ^a	50	2(4.0)	4(4.0)	40(80.0)**	44(88.0)**
Frozen	Serum ^b	50	4(8.0)	10(20.0)	26(52.0)**	36(72.0)**

^a 0.4% (w/v) bovine serum albumin was added in m-KRB, ^b 10% (v/v) human fetal cord serum was added in m-KRB, *: **: Within each column, the means with same superscript differ($p < 0.05$).

배양 2일째 발생률(배반포의 비율)에 있어서 처리군과 대조군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 배양 3일째 발생률(부화배반포의 비율)에 있어서 알부민을 첨가하지 않는 처리군은 0%를 보인 반면에 알부민을 첨가한 처리군(70%)은 알부민을 첨가한 대조군(75%)과 유의적인 차이를 보이지 않았다(그림 3). 그러므로 주사기의 유해인자와 함유된 배양액에서 배아의 생존은 체외 배양 3일째 치명적인 영향(손상)을 받았다. 한편 이러한 유해효과는 주사기에 노출된 배양액에 알부민을 첨가함으로써 현저히 감소시킬 수 있었다(그림 3-6).

한편 동일한 실험조건에서 배양된 동결배아는 유해인자에 대해 신선배아보다 더욱 민감한 반응을 보였다. 배양 2일째 발생률(배반포의 비율)은 처리군(KRB)군과 대조군(KRB+BSA)

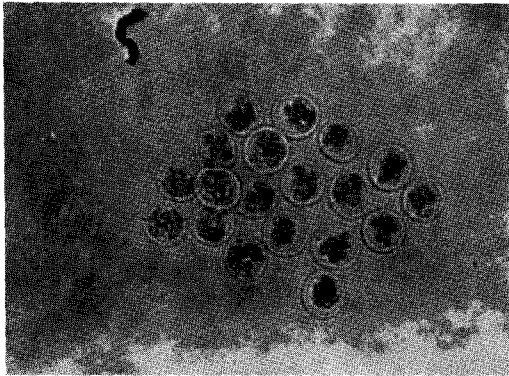


Fig. 3. Toxicity of disposable plastic syringe (DPS) to the fresh 2-cell mouse embryos.

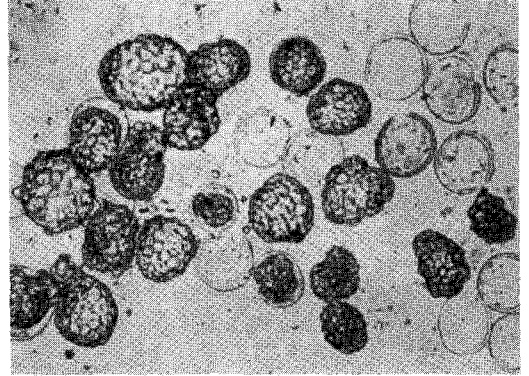


Fig. 4. Toxicity of disposable plastic syringe (DPS) to the fresh 2-cell mouse embryos and effect of protein to the toxicity.

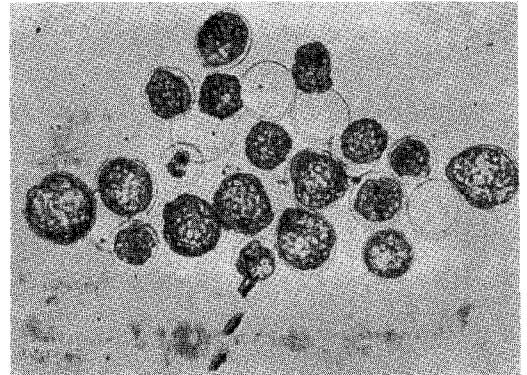


Fig. 5. In vitro development of fresh 2-cell mouse embryos, compared of that in the exposed medium with toxicity of DPS.

Table 5. Development of fresh and frozen-thaw 2 cell mouse embryos cultured for 2 days in m-KRB medium exposed or not with disposable plastic syringe for 2 hours

Embryos	Exposure of syringe	Medium and supplement	No.(%) Embryos at day 2			No.(%) Embryos at day 3*	
			Morula	Blastocysts		Degenerated	Hatched blastocyst
Fresh	Exposed	KRB	6(15)	30(75)	34(85)	40(100)	0(0)
		KRB+BSA	0(0)	38(95) ^a	40(100) ^c	4(10) ^e	28(70) ^g
	Non-exposed	KRB	2(5)	36(90)	38(95)	10(25)	12(30)
		KRB+BSA	0(0)	38(95) ^a	40(100) ^c	4(10) ^e	30(75) ^g
Frozen	Exposed	KRB	14(28)	0(0)	2(4)	48(96)	0(0)
		KRB+BSA	10(20)	12(24) ^b	16(32) ^d	26(52) ^f	6(12) ^h
	Non-exposed	KRB	12(24)	14(28)	26(52)	34(68)	6(12)
		KRB+BSA	10(20)	28(56)	38(76) ^b	10(20) ^f	10(20) ^h

Fresh embryos(n=40) of each group were transferred into Ham's F10 with 0.4% BSA from four treatments(m-KRB+0.4% BSA) after 2 day-culture. Frozen-thaw 50 embryos were arranged at each group, (a:NS, b:p<0.05), (c:NS, d:p<0.05), (e:NS, f:p<0.05), (g:NS, h:NS).

NS:Not significant.

간에 현저한 차이가 있었다(4% vs. 76%)(그림 7-8).

이러한 차이는 신선배아에서 두 처리간에 배양 2일째의 생존율에 있어서 유의적인 차이가 없었던 것과는 대조적이었다. 따라서 동결배아는 신선배아보다 유해인자에 대해 더욱 빨리 반응하고 있음을 알 수 있었다. 또한 유해인자에 노출된 배양액에 알부민을 첨가할 경우에 신선배아(그림 4)는 배양 2일과 3일의 생존율에 있어서 대조군(KRB+BSA)과 차이를 보이지 않았지만, 동결배아(그림 8)는 2일째의 발생율(32% vs. 76%)뿐만 아니라 3일째의 퇴행율(52% vs. 20%)에 있어서 현저한 차이를 보였다. 따라서 유해인자가 오염된 배양액에 알부민을 첨가하여도 신선배아는 이를 극복할 수 있지만 동결배아는 치명적인 영향(손상)을 받고 있음을 알 수 있었다. 이를 달리 설명하면

배양액에 오염된 유해인자는 0.4% 알부민에 의해 완전히 제거될 수 없음을 증명할 수 있었

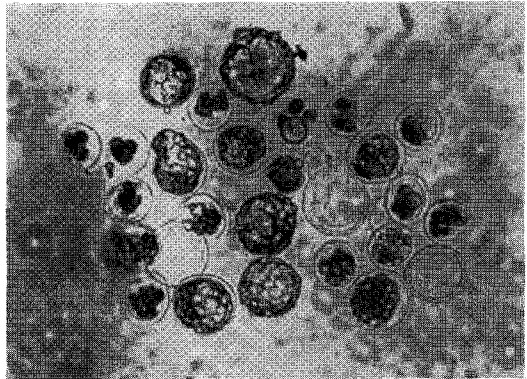


Fig. 8. Toxicity of disposable plastic syringe (DPS) to the frozen-thaw 2-cell mouse embryos and effect of portein source to the toxicity.

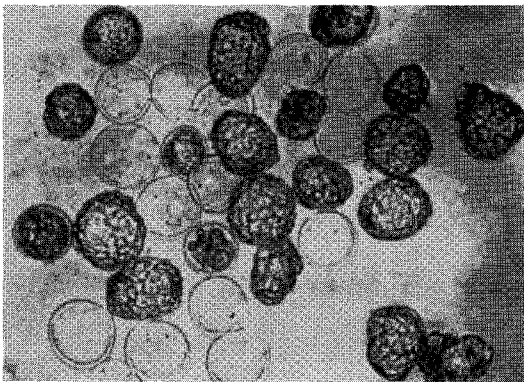


Fig. 6. In vitro development of fresh 2-cell mouse embryos, compared of that in the exposed medium with toxicity of DPS.

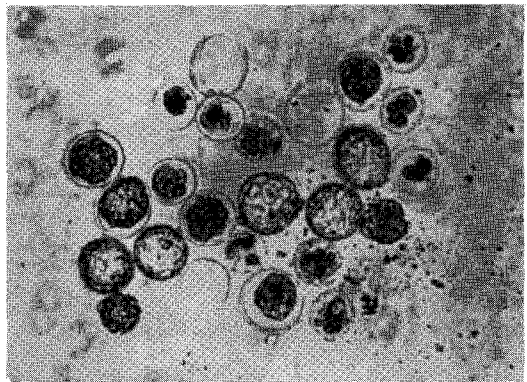


Fig. 9. In vitro development of frozen-thaw 2-cell mouse embryos, compared of that in the exposed medium with toxicity of DPS.

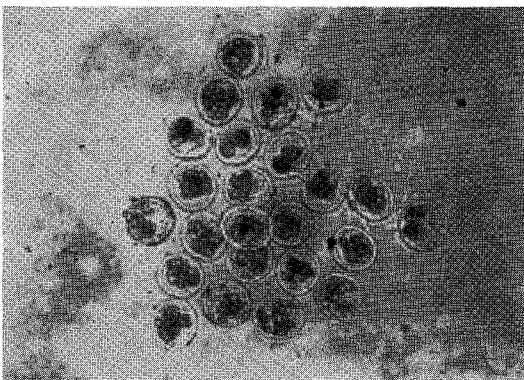


Fig. 7. Toxicity of disposable plastic syringe (DPS) to the frozen-thaw 2-cell mouse embryos.

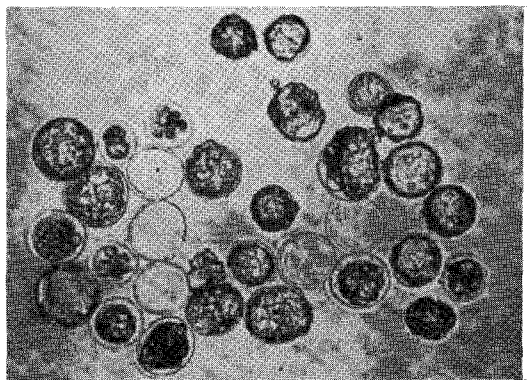


Fig. 10. In vitro development of frozen-thaw 2-cell mouse embryos, compared of that in the exposed medium with toxicity of DPS.

다. 또한 이와 같은 결과는 배양액의 유해인자를 검사하기 위해서 신선배아보다는 동결배아가 더욱 효율적으로 이용될 수 있음을 제시하고 있다.

고 찰

세포를 냉각 시키고 다시 가온하여 생기는 효과를 관찰하기 시작한 것은 1776년 Spallanzani가 겨울에 정자가 추위에 노출되었다가 다시 온도가 올라가면서 정자의 운동성이 되살아나는 것을 관찰한데서 부터 시작된다. 1972년 Whittingham등과 Wilmut등이 각각 연구한 결과로 생쥐 배아의 냉동 보존이 성공하게 되었다.

배아를 냉동 보존하기 위해서는 단계별로 동결 보존액을 첨가하여 세포내에 존재하는 물을 제거한 다음, 천천히 냉각 시켜서 일정온도에 도달한 후, 세포질내에 빙결점이 이루어 지도록 Seeding을 하여, 최후에 냉동 온도에서 보존을 하여야 한다. 융해할 때에는 일정한 온도의 조건에서 융해 시키므로써 생존율을 증가 시킬 수가 있는 것이다.

Whittingham의 연구 결과로 배아의 냉동 보존기술이 급격하게 진보되어 생쥐, 토끼, 양등의 배아의 냉동보존이 이루어지게 되었으며, 냉동보존되었던 사람의 배아에서 정상출산을 보고하게 되었다(Trounson등, 1993).

이제까지 시험관 아기 프로그램의 정도관리를 위해서는 1-세포기 또는 2-세포기 생쥐 배아를 주로 사용하여왔다(Quinn등, 1982; Ogawa등, 1987; Davidson등, 1988). 그밖에 인간 정자의 생존실험이나 햄스터 정자를 사용하여 정도관리를 시행하는 방법이 보고되고 있다(Ackerman등 1983; Arny등 1987).

실험실에 따라서는 정자의 생존 검증법으로 혈청이나, 배양액의 정도관리를 시행하고 있다(Dandekar등 1984). 그러나 정상적인 정자는 생쥐 배아에 비해서 나쁜 배양조건에서 더욱 잘 견딘다. 그러므로 정도관리를 시행하여 나쁜 배양조건을 선택적으로 골라내기는 쉽지가 않다. 그리고 정자 생존 검증법은 정자의 운동성을 기준으로 판단하므로 생쥐 배아를 이용할 때 보다 더 주관적이다. 그래서 이 방법은 거의 사용되지 아니한다(Bavister와 Yanagimachi 1977). 아마도 정자의 생존 검증법은 정자의 운동성, 운동속도, ateral head displacement를 객관적으로 평가할 수 있는 컴퓨터 방법을 이

용하면 다시 활기를 띄게 될 수 있을 것이다(Bavister등 1988; Stewart등 1988; Rinehart등 1988).

최근에는 햄스터 정자를 이용한 생물학적 검증방법이 보고되고 있으며, 이는 생쥐를 이용한 생물학적 검증법과 비교할때 더 예민하고, 경제적이라는 보고도 있다(Gorill등 1991).

또한 생존한 배아를 확인하는 방법으로 배아에서 분비되는 platelet activation factor를 이용한 생물학적 검증법도 보고되고 있다. 이 검증법은 배아의 생존여부를 알 수 있으므로 배아의 자궁내 이식후 성공여부를 예견할 수 있는 지표로 사용할 수 있다.

냉동 보존된 생쥐 배아를 사용하여 생물학적 검증을 시행할 수도 있다. 그러나 8-세포기에 냉동 보존된 경우에는 초기에 독성 물질에 대해서 예민한 시기를 지나서 있으므로, 사용하는데 문제점이 있다. 매주 쥐를 잡아서 생물학적 검증을 거쳐서 배양액 및 혈청의 정도관리를 한다는 것은 경제적 손실이 크고, 실험실 연구원의 업무가 폭주하여 어려운 점이 많다.

새로만든 모든 배양액은 생쥐의 배아를 이용한 생물학적 검증을 거쳐서 사용하여야 한다. 한달이상 보관된 Ham's F-10 배양액도 생쥐 배아의 발달을 방해 하지 아니하지만, 사람의 배아의 발달에 미치는 영향에 대해서는 아직도 결론이 없다. 그러나 물의 순도는 시간이 경과함에 따라서 저하하므로 시험관 아기 클리닉에서는 만든지 2주가 경과하면 배양액은 사용하지 아니한다(Fukuda등 1989).

난자의 체외 수정에 사용되는 모든 혈청은 57°C로 가열하여 비활성화 시킨후 필터를 사용하여 소독한 다음, 생쥐의 배아를 이용하여 생물학적 검증을 시행한다. 생물학적인 검증결과 배양액보다는 혈청에서 문제점이 발견되어 사용하지 않고 버리게 된다(Leung등 1984).

배양액은 대개 5% 정도에서 정도관리를 통과하지 못하고, 혈청의 경우에는 25-30%에서 생물학적 검증을 통과하지 못한다. 체외 수정에 사용하는 혈청을 생물학적인 검증을 하지 않는 실험실에서는 배아에 해로운 혈청이 사용되어 성공율이 저하하게 되며 일정한 성공율을 유지할 수가 없다(Caro와 Trounson 1984; Rinehart 1988). 생쥐 배아를 이용한 생물학적인 검증법은 혈청의 사용가능이나 불가능을 이야기하는 것은 아니다. 실험한 혈청중 어떤것이 4-세포기, 8-세포기, 또는 unhatched blastocyst까지

발육을 도와 준다. 인간 난자의 체외수정에 사용한 혈청중 비록 배아의 성장은 성공적으로 도와 주나, 배아 이식후 배아의 성장을 억제시킬 수도 있다. 인간의 난자가 체외 수정되어 배아 이식을 할 수 있는 4-포기에 도달하였다 하더라도, 생쥐의 배아를 이용하여 생물학적 검증을 아니 하였으면, 이 혈청이 안전하다고 이야기 할 수는 없다.

과배란 유도 주기에 만든 혈청의 생물학적 검증은 시간이 오래 걸리기 때문에 시행하지 못하는 경우도 있다. 또한 과배란 유도로 크로미펜을 사용하는 경우에는 크로미펜 자체가 배아에 독성작용을 가지고 있다(Laufer등 1983). 만약 모체의 혈청을 단백질원으로 사용한다면, 생물학적 검증을 마치기 위해서 과배란을 유도하기 이전에 만들어 놓아야 한다.

난자의 체외 수정에 사용되는 모든 기구는 배아의 독성을 가지고 있는지 여부를 항상 검사하여야 한다. 검증을 하기 위해서는 미리 검사된 배양액을 사용하여 새로운 기구를 검사한다. 프라스틱인 경우에는 15번 검사를 시행하면 한번 꼴로 검증에서 실격되었다.

검증에 사용되는 실험 생쥐의 배아가 2-세포기로 부터 배양을 시작하여 72시간이내에 hatched blastocyst로 가지 아니하면 실험 동물로 사용하면 아니된다.

생물학적 검증의 한계에 대해서 지나쳐 버리는 경우가 종종 있다. 이러한 생물학적 검증방법은 단지 육안으로나, harshly하게 배아에 독성을 나타내는 것을 검증할 수가 있는 것이다. 이 실험으로는 배아의 성장을 촉진시키는 인자에 대한 설명은 불가능하다. 아마도 시험관 아기 프로그램에서 임신이 되는 경우는 혈청내에 생쥐 배아의 생물학적 검증법으로는 검사가 안되는 배아의 성장을 촉진 시키는 인자가 우연히 들어있는 경우에 되는 것일지도 모른다. 배양액내에 혈청을 첨가하면 아미노산 Ham's F-10 배양액에서 하듯이 배아에 독성이 있는 물질을 흡수하는지도 모른다. 그러나 생쥐 배아를 잘 발달시키는 조건하에서 인간의 배아가 발육이 지연되거나, 정지될 수도 있다. 인간의 시험관 아기 프로그램에서는 배아를 2-세포기나, 4-포기 정도에 배아이식을 시행한다(Jones 등 1982; Condone-Mahony 등 1985).

결론적으로, 난자의 체외 수정에 사용되는 배양액, 혈청, 배양용기등을 생물학적으로 배아의 발육에 독성이 있는지 또는 성장을 촉진하

는 인자를 가지고 있는지 검증할 수 있는 객관적이고, 예민하며, 반복하여도 동일 결과를 얻을 수 있는 방법의 개발이 요망된다. 생쥐 배아를 이용하여 정도관리를 한다는데에는 한계가 있는 것이 분명하다. 그러나 현재로는 이 방법이 최상의 방법이므로 이를 사용하여 정도관리를 하여 시험관 아기 프로그램의 성공율을 높이도록 하여야 한다.

결 론

본 연구는 배양시스템의 정도관리를 효율적으로 수행하기 위해 동결시스템의 확립에 의한 동결된 배아의 체외발생능과 배양 조건의 영향 및 동결-융해된 배아에 의한 배양액과 혈청의 정도관리 가능성을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 생쥐 2세포 배아의 완만냉각동결에 있어서는 0.1M의 sucrose의 용액을 사용하였을 때 가장 높은 배아의 생존율(84.0%)을 보였다($p < 0.05$).

2. 동결보존된 생쥐 2세포 배아를 융해하는 방법에 있어서는 2단계방법(80.0%)이 1단계방법(42.0%)보다 더 높은 생존율을 보였다($p < 0.05$).

3. 동결보존된 배아와 신선배아의 체외발생율(팽윤배반포이상 발생한 배아의 비율)은 0.4% 소혈청알부민이 함유된 m-KRB에서는 차이를 보이지 않았으나(95.0% vs 82.5%), 소혈청알부민이 포함되지 않는 m-KRB 배양액에서는 동결배아의 체외발생율이 신선배아에 비해 현저히 감소하였다(87.5% vs 32.5%)($p < 0.05$).

4. 신선배아의 체외발생율(팽윤배반포이상 발생한 배아의 비율)은 0.4% 소혈청알부민을 첨가해준 경우와 10% 태아제대혈청을 첨가해준 경우 사이에 유의한 차이가 없었으나(96.0% vs 78.0%), 동결보존된 배아의 체외발생율(팽윤배반포이상 발생한 배아의 비율)은 10% 태아제대혈청을 첨가한 경우에 0.4% 소혈청알부민을 첨가한 경우에 비해서 유의하게 낮게 나타났다(80.0% vs 52.0%)($p < 0.05$).

5. 유해인자에 노출된 배양액에 소혈청알부민을 첨가하여도 신선배아는 배양 2일과 3일의 생존율에 있어서 대조군(m-KRB + BSA)과 차이를 보이지 않았지만, 동결배아는 2일째의 발생율(24% vs 56%)과 3일째의 퇴행율(52% vs 20%)에 있어서 현저한 차이를 보였다($p <$

0.05).

이상의 연구결과, 동결배아는 신선배아보다도 체외배양조건에 더욱 민감한 반응을 보였으므로, 배양액의 유해인자를 정도관리 하는데 더욱 효율적임을 알 수 있었다.

인 용 문 헌

- Ackerman SB, Swanson RJ, Adams PJ, Wortham JWE Jr: Comparison of strains and culture media used for mouse in vitro fertilization. *Gamete Res* 1983, 7, 103.
- Ackerman SB, Swanson RJ, Stokes GK, Veeck LL: Culture of mouse preimplantation embryos as a quality control assay for human in vitro fertilization. *Gamete Res* 1984, 9, 145.
- Arny M, Nachtigall L, Quagliarello J: The effect of preimplantation culture conditions of murine embryo implantation and fetal development. *Fertil Steril* 1987, 48, 861.
- Bavister BD, Andrews JC: A rapid sperm bioassay procedure for quality control testing of water and culture media. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1988, 5, 75.
- Bavister BD, Yanagimachi R: The effect of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reactions of hamster spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 1987, 19, 228.
- Caro CM, Trounson A: The effect of protein on preimplantation mouse embryo development in vitro. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1984, 1, 183.
- Condon-Mahoney M, Wortham JWE Jr., Bundren JC, Witmyer J, Shirley B: Evaluation of human fetal cord sera, Ham's F-10 medium, and in vitro culture materials with a mouse in vivo fertilization system. *Fertil Steril* 1985, 44, 521.
- Dandekar PV, Quigley MM: Laboratory setup for human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1984, 42, 1.
- Davidson A, Vermesh M, Lobo RA, Paulson RJ: Mouse embryo culture as quality control for human in vitro fertilization: the one-cell versus the two-cell model. *Fertil Steril* 1988, 49(3), 516.
- Fukuda A, Nova Y, Tsukui S, Matsumoto H, Yano 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(1), 40.
- Gorrill MJ, Rinehart JS, Tamhane AV, Gerrity M: Comparison of the hamster sperm motility assay to the mouse one-cell and two-cell embryo bioassay as quality control tests for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1991, 55, 345.
- John DP, Kiessling AA: Improved pronuclear mouse embryo development over an extended pH range in Ham's F-10 medium without protein. *Fertil Steril* 1988, 49(1), 150.
- Jones HW Jr., Jones GS, Andrews MC, Acosta A, Bundren C, Garcia J, Sandow B, Veeck L, Wilkes C, Witmyer J, Wortham JE, Wright G: The program for in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 1982, 38, 14.
- Laufer N, Pratt BM, DeCherney AH, Naftolin F, Merino M, Markert CL: The in vivo and in vitro effects of clomiphene citrate on ovulation, fertilization, and development of cultured mouse oocytes. *Am J Obstet gynecol* 1983, 147, 633.
- Leung PCS, Gronow MJ, Kellow GN, Lopata A, Speirs AL, McBain JC, du Plessis YP, Johnston I: Serum supplement in human in vitro fertilization and embryo development. *Fertil Steril* 1984, 41, 36.
- Ogawa T, Marrs RP: The effect of protein supplementation on single-cell mouse embryos in vitro. *Fertil Steril* 1987, 47(1), 156.
- Quinn P, Warnes GM, Kerin JF: Kirby Culture factors in relation to the success of human in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1984, 41, 202.
- Rinehart JS, Bavister BD, Gerrity M: Quality control in the in vitro fertilization laboratory comparison of bioassay systems for water quality. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1988, 5, 335.
- Spallanzani L: Opuscoli di fisca animale, e vegetabile: Opuscolo II. Osserazioni, e sperienze intorno ai vermicelli spermatiei dell'

uomo edegli animali. *Moderna*.

Stewart-Savage J, Bavister BD:Deterioration of stored culture media as monitered by a sperm motility bioassay. *J Vitro fert Embryo Transfer* 1988, 5, 76.

Trounson A, Mohr L:Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983, 305, 707.

Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P:Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -

296°C . *Science* 1972, 178, 411.

Wilmut I:Effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life sci* 1972, 11, 1071.

Wolf DP, Bavister BD, Gerrity M, Kopf GS:In vitro Fertilization and Embryo Transfer:A Manual of Basic Techniques. *Plenum Press* 1985, 57.