

## 배아밀도와 배양액 용량이 착상전후의 생쥐배아의 체외 성장에 미치는 영향

울산대학교 의과대학 산부인과학교실

강병문 · 전용필 · 김지영 · 김정희 · 이지윤 · 채희동 · 김정훈 · 장윤석 · 목정은

### Effect of Embryo Number and Incubation Volume on the Development of Pre- and Post-implantation Mouse Embryos In Vitro

Byung Moon Kang, Yong Pil Cheon, Ji Young Kim, Jeong Hee Kim, Ji Yun Lee, Hee Dong Chae, Chung Hoon Kim, Yoon Seok Chang and Jung Eun Mok

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, University of Ulsan, Asan Medical Center Seoul, Korea*

#### = Abstract =

The effects of embryo number and incubation volume on the development of mouse embryos were evaluated. The growth rate of two-cell mouse embryos to attached blastocyst stage and the growth rate of blastocysts to early somite stage were assessed after culture in different incubation volumes and embryo densities. Embryos were collected from ICR female mice superovulated with pregnant mare serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin and mated by ICR males.

In experiment 1, groups of one, five, ten, twenty 2-cell embryos were cultured in 10-, 50-, 500-, 1000- $\mu$ l drops of BWW media under mineral oil at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. As the incubation volume decreased, significantly ( $p < 0.05$ ) higher rates of embryos reached morular and blastocyst stage on day 3 and 4 culture, respectively.

In experiment 2, groups of one, five, ten, twenty blastocysts were cultured in 1- and 2-ml volumes of CMRL 1066 media under same condition as in experiment 1. However the reverse was the result. Decreasing the number of embryos incubated per volume from 1 to 20 significantly ( $p < 0.05$ ) increased the number of blastocysts reaching the late egg cylinder (LEC) and early somite (ES) stage on day 6 and 8 culture, respectively, regardless of incubation volume. Blastocysts cultured in 2ml had higher ( $p < 0.05$ ) development rates to LEC and ES stage on day 6 and 8 culture, respectively, than embryos cultured in 1ml.

Our results suggest that the effects of embryo number and incubation volume on the development of mouse embryos are stage specific and the shifting point was between hatching and EEC stage.

**Key Words:** Embryo number, Incubation volume, Blastocyst, Early somite

\* 이 연구는 1997년도 아산생명과학연구소의 연구비 (97-168) 지원에 의한 결과임.

## 서 론

포유류 배아의 체외배양시 성장과 생존율은 생체내의 결과와 비교할 때 매우 감소한다. 착상 이전의 배아인 경우는 생체내 성장과 차이가 덜하지만 착상 이후의 배아를 체외배양할 경우는 그 정도가 더욱 심하다 (강, 1996). 이런 사실은 현재 사용되고 있는 체외배양체계가 많은 문제점을 내포하고 있고, 특히 착상 이후 배아의 발생을 뒷받침하는 배양체계에 대한 이해가 미흡함을 의미한다. 따라서 생체내의 배아 성장환경과 체외의 배양환경과는 많은 차이가 있을 수 있는데 그 중 한가지가 배양액의 용량과 배아의 밀도이다.

저자 등은 포배의 체외배양시 배아의 밀도가 배아의 성장에 미치는 영향에 관한 최근 연구에서, 배아의 밀도가 높을수록 배아의 성장에 나쁜 영향을 주는 반면 배아의 밀도가 낮으면 초기체절기 (early somite stage) 까지의 성장률이 높아지는 것을 보고하였다. 그리고 그 이유로써 배아의 밀도가 증가하면 배양액내의 한정된 필수 영양요소들이 빠르게 소모되고 반대로 배아가 배출해내는 대사물질이 또한 빠르게 축적되기 때문이라고 가정하였다 (Kang *et al.*, 1997). 포배가 성장함에 따라 외부에서 공급되는 성장인자들이 필요하다는 것은 과거의 체외배양 연구에서도 밝혀진 바 있다 (Hsu, 1980).

그러나 착상 후 배아의 발생과는 달리 착상전 초기 배아를 이용한 체외배양에서는 배아의 밀도가 높을수록 그리고 배양액의 부피가 적을수록 배아의 성장에 좋은 영향을 주는 것으로 되어 있어 (Lane *et al.*, 1992; Salahuddin *et al.*, 1995), 포배의 체외배양 연구와는 많은 차이점을 보이고 있다. 그리고 그 이유로는 착상전 초기배아의 배양시 배아 자체에서 분비되는 미지의 성장자극인자 때문에 배양액의 용량이 적고 배아의 밀도가 높을수록 인자의 효과가 이웃한 배아의 성장에 미치는 영향이 클 것이라고 추정을 하고 있다 (Canseco *et al.*, 1992; Lane *et al.*, 1992).

따라서 양측 연구가 모두 오류가 없다면, 배아의 밀도가 배아성장에 미치는 효과는 성장단계에 따른 특이성을 보인다는 (stage specific) 가설이 성립하게 된다. 이에 저자 등은 첫째 배양액용량을 소량에서부터 다량까지 다양하게 하고 둘째 착상기 이전과 착상기 이후의 배아의 숫자를 여

러 가지로 변화시켜 체외배양하여 발생과정을 비교 분석함으로써 저자 등이 추측하는 가정이 합당한지 아니면 저자 등의 보고나 혹은 타 연구자들의 연구결과에 오류가 있었는지를 검증하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 배아의 준비

본 실험에 사용한 동물은 광주기가 명 14시간/암 10시간으로 (명 5 AM - 7 PM, 암 7 PM - 5 AM) 유지되고 물과 먹이가 충분히 공급되며 SPF한 표준 동물장에서 사육된 ICR계 생쥐를 사용하였다. 암컷은 5~8주령의 것을, 수컷은 10~12주령의 생식력 있는 건강한 것을 사용하였다. 과배란을 유도하기 위하여 pregnant mare's serum gonadotropin을 (PMSG, Sigma, St. Louis, MO, USA) 5IU 복강주사하고 48시간 후에 human chorionic gonadotropin을 (hCG, Sigma St. Louis, MO, USA) 5IU 복강주사하였다. 교미를 유도하기 위해서 생식력있는 건강한 수컷과 합사하고 다음날 아침에 질전을 확인하여 수정여부를 판단하였다.

후기 2-세포기 배아를 획득하기 위해서는 hCG 주사 50시간 후에 경추 파괴로 도살한 후 수란관과 자궁의 일부를 적출하였다. 그리고 적출물의 내부를 BWB (Biggers *et al.*, 1971) 배양액으로 관류하여 건강한 후기 2-세포기 배아를 획득한 후 실험에 사용하였다. 포배단계의 배를 획득하기 위해서는 hCG 주사 92시간 후에 경추골 파괴로 도살하고 자궁과 수란관의 일부를 적출하였다. 이후 CMRL 1066 (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) 배양액으로 관류하여 배를 획득한 후 실험에 사용하였다.

### 2. 배아의 배양

2-세포기 배아를 위한 기본 배양액으로 0.4% bovine serum albumin을 (BSA, Sigma, St. Louis, MO, USA) 함유한 BWB 배양액을 사용하였고, 포배를 위한 기본 배양액으로는 1mM glutamine (Sigma St. Louis, MO, USA), 1mM sodium pyruvate (Sigma St. Louis, MO, USA), 50IU/mL penicillin (Sigma St. Louis, MO, USA). 그리고 50mg/mL streptomycin을 (Sigma St. Louis, MO, USA) 첨가한 CMRL 1066을 사용하였다.

제 1실험은 착상전 배아를 (2-세포기) 사용하여

배양을 시행하였다. 배양접시에 (60mm, Falcon, Lincoln Park, NJ, USA) 10, 50, 500 및 1000 $\mu$ l의 BWW 배양액을 떨균 후 기본 배양액으로 평형시킨 mineral oil을 (Sigma St. Louis, MO, USA) 덮어 사용하는 방법을 사용하였다. 각 용량의 배양액내 배아의 숫자는 1, 5, 10, 20개로 하였으며 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 100% 습도, 그리고 37°C를 유지하는 배양기 내에서 배양하였다. 배양액은 실험기간 중에 교환하지 않았다. 배아의 발생양상은 hCG 주사 후 144시간까지 배양하면서 도립현미경으로 (Olympus IX 50, Japan) 포배이전의 배아, 포배기 배아, 그리고 부화한 배아로 구분하여 관찰하였다.

제 2실험은 포배를 사용하였으며 각 용량의 배양액내 배아의 숫자는 제 1실험과 같은 개수이었다. 1ml와 2ml 두가지 용량의 배양액을 넣은 35mm 배양접시에 (Falcon, Lincoln Park, NJ, USA) 포배를 분주하고, 기본 배양액으로 평형시킨 mineral oil을 덮어 사용하였다. 최초 4일간에는 배양액에 20% fetal calf serum을 (FCS, Gibco, Gaithersburg, MD, USA) 첨가하여 배양하였으며, 그 후에는 20% human cord serum을 (강, 1996) 사용하였다. 처음 2일간에는 배양액을 교환하지 않았고, 포배의 착상 후에는 매일 준비한 새로운 배양액으로 24시간마다 교체하였다. 배의 성장과 분화는 24시간 단위로 해부현미경하에서 관찰하며 Witschi에 (1972) 의해 마련된 in vivo 상의 기준에 따라 분류하였다. 부착은 (attachment) 제 1실험에서와 같이 영양배엽이 배양용기에 붙어 고착되어 있는 것으로 규정하였고, early egg cylinder는 (EEC) 배 발생단계 9나 10의 상태인 배아로 규정하였다. Late egg cylinder는 (LEC) 배 발생단계 11, 12, 13에 이른 배아로 하였고, early somite는 (ES) 14나 15 발생단계에 이른 배아로 규정하였다.

실험군 사이의 통계적 유의성은 Chi-square test를 이용하여 검증하였고 p-value가 0.05이하일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

1. 착상전 배아의 배양시 배아수와 배양액용량이 배아의 성장에 미치는 영향

본 실험에서는 120마리의 생쥐에서 876개의 형태적으로 정상적인 2세포 배아를 획득하여 사용

하였다.

### 1) 배양 제 3일

876개중 상실배 (morula stage) 미만의 성장을 보인 배아는 88개였으며 (10.0%) 나머지는 (90.0%) 정상적인 발달을 보였다. 배아의 숫자가 배의 성장에 미치는 효과는 모든 배양액의 용량에서 (10 $\mu$ l, 50 $\mu$ l, 500 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l 각각) 유의한 차이가 없었다. 배양액용량이 배의 성장에 주는 영향을 평가하기 위하여 동일 용량에서의 배아수는 모두 합산하여 통계처리를 하였다. 이와같이 계산하였을 때 배양액용량이 배의 성장에 주는 영향은 용량군의 설정 조합에 따라 통계학적으로 유의한 차를 보였다. 즉, 10 $\mu$ l군과 500 $\mu$ l군, 10 $\mu$ l군과 1000 $\mu$ l군, 50 $\mu$ l군과 500 $\mu$ l군, 그리고 50 $\mu$ l군과 1000 $\mu$ l군의 단독용량군을 비교하였을 때 유의한 (p<0.05) 차이가 있었다. 또한 10 $\mu$ l군과 50, 500, 1000 $\mu$ l의 합산군 그리고 1000 $\mu$ l군과 10, 50, 500 $\mu$ l의 합산군을 비교할 때 유의한 (p<0.05) 차이를 보였다. 그러나 통계학적으로 가장 유의한 차이를 보인 것은 10 $\mu$ l와 50 $\mu$ l를 제 1군으로 (상실배 미만 29개, 상실배 429개) 하고 500 $\mu$ l와 1000 $\mu$ l를 제 2군으로 (상실배미만 60개, 상실배 378개) 하여 비교하였을 때로서 배양액의 용량이 적은 제

**Table 1.** Effect of embryo number and media volume on the development of 2-cell embryo on day 3 culture in vitro

Day 3	(총 배아수)	< morula	morula	
1개/10 $\mu$ l	14	1 7.1%	13	92.9%
5개/10 $\mu$ l	35	2 5.7%	33	94.3%
10개/10 $\mu$ l	70	5 7.1%	65	92.9%
20개/10 $\mu$ l	100	4 4.0%	96	96.0%
1개/50 $\mu$ l	14	2 14.3%	12	85.7%
5개/50 $\mu$ l	35	3 8.6%	32	91.4%
10개/50 $\mu$ l	70	4 5.7%	66	94.3%
20개/50 $\mu$ l	100	7 7.0%	93	93.0%
	합 (438)	28*	410*	
1개/500 $\mu$ l	14	2 14.3%	12	85.7%
5개/500 $\mu$ l	35	4 11.4%	31	88.6%
10개/500 $\mu$ l	70	10 14.3%	60	85.7%
20개/500 $\mu$ l	100	14 14.0%	86	86.0%
1개/1000 $\mu$ l	14	3 21.4%	11	78.6%
5개/1000 $\mu$ l	35	5 14.3%	30	85.7%
10개/1000 $\mu$ l	70	12 17.1%	58	82.9%
20개/1000 $\mu$ l	100	10 10.0%	90	90.0%
	합 (438)	60*	378*	

\*p=4.0x10<sup>-4</sup>.

**Table 2.** Effect of embryo number and media volume on the development of 2-cell embryo on day 4 culture in vitro

Day 4	(총 배아수) < blastocyst	blastocyst		
1개/10μl	14	1	7.1%	13 92.9%
5개/10μl	35	2	5.7%	33 94.3%
10개/10μl	70	6	8.6%	64 91.4%
20개/10μl	100	7	7.0%	93 93.0%
1개/50μl	14	2	14.3%	12 85.7%
5개/50μl	35	3	8.6%	32 91.4%
10개/50μl	70	4	5.7%	66 94.3%
20개/50μl	100	7	7.0%	93 93.0%
합 (438)	32*	406*		
1개/500μl	14	3	21.4%	11 78.6%
5개/500μl	35	4	11.4%	31 88.6%
10개/500μl	70	11	15.7%	59 84.3%
20개/500μl	100	14	14.0%	86 86.0%
1개/1000μl	14	3	21.4%	11 78.6%
5개/1000μl	35	5	14.3%	30 85.7%
10개/1000μl	70	13	18.6%	57 81.4%
20개/1000μl	100	15	15.0%	85 85.0%
합 (438)	68*	370*		

\* $p=2.0 \times 10^{-4}$ .

1군에서 더 많은 상실배까지의 발달을 보여주었다 ( $\chi=12.14$ ,  $p=4.9 \times 10^{-4}$ ) (Table 1).

## 2) 배양 제 4일

포배기 (blastocyst stage) 미만의 성장을 보인 배아는 100개이었고 (11.4%), 776개의 (88.6%) 배아는 포배이상 발달하였다. 배아의 숫자가 배의 성장에 미치는 효과는 배양 제 3일제와 마찬가지로 유의한 차이를 보이지 않았다. 배양액용량이 배의 성장에 주는 영향은 배양 제 3일제와 마찬가지로 50μl이하와 (1군) 500μl이상의 (2군) 두군으로 나누었을 때 가장 유의한 차이가 있었다. 즉, 배양액의 용량이 적은 제 1군에서 (포배미만 33개, 포배이상 425개) 제 2군보다 (포배미만 68개, 포배이상 370개) 유의하게 ( $\chi=13.83$ ,  $p=2.0 \times 10^{-4}$ ) 높은 포배기 이상의 성장을 보여주었다 (Table 2).

## 3) 배양 제 5일

부화기 (hatching stage) 미만의 성장을 보인 배아는 270개이었고 (30.8%), 606개의 (69.2%) 배아는 부화기까지 발달하였다. 배양 제 3, 4일과는 달리 배아의 숫자나 배양액용량 모두 배의 성장에 유의한 영향을 미치지 않았다 (Table 3).

**Table 3.** Effect of embryo number and media volume on the development of 2-cell embryo on day 5 culture in vitro

Day 5	(총 배아수) < hatching	hatching		
1개/10μl	14	5	35.7%	9 64.3%
5개/10μl	35	11	31.4%	24 68.6%
10개/10μl	70	20	28.6%	50 71.4%
20개/10μl	100	33	33.0%	67 67.0%
1개/50μl	14	4	28.6%	10 71.4%
5개/50μl	35	9	25.7%	26 74.3%
10개/50μl	70	19	27.1%	51 72.9%
20개/50μl	100	40	40.0%	60 60.0%
합 (438)	141	297		
1개/500μl	14	5	35.7%	9 64.3%
5개/500μl	35	10	28.6%	25 71.4%
10개/500μl	70	22	31.4%	48 68.6%
20개/500μl	100	30	30.0%	70 70.0%
1개/1000μl	14	5	35.7%	9 64.3%
5개/1000μl	35	10	28.6%	25 71.4%
10개/1000μl	70	20	28.6%	50 71.4%
20개/1000μl	100	27	27.0%	73 73.0%
합 (438)	129	309		

## 2. 착상시기 배아의 배양시 배아수와 배양액용량이 배아의 성장에 미치는 영향

본 실험에서는 35마리의 생쥐에서 220개의 형태적으로 정상적인 포배를 획득하여 사용하였다. 정상적인 발생에서 영양배엽은 (trophoblast) 성장하면서 거대세포로 분화하였으며 inner cell mass는 egg-cylinder를 형성하였다. 그리고 egg-cylinder 내 배아 (embryo) 부분은 배아의 특성을 갖는 조직으로 분화한 반면 배외 (extra-embryo) 부분은 배외막인 난황막으로 (yolk sac) 발생하였다.

### 1) 배양 제 2일

220개중 배양용기에 부착이 되지 않은 배아는 1개였으며 219개 (99.9%)는 정상적인 발달을 보였다. 배아의 숫자는 배양액의 용량이 1ml이거나 2ml일 때 모두 배아의 성장에 유의한 영향을 미치지 않았다. 배양액용량이 배의 성장에 주는 영향도 2ml군이나 (착상기미만 0개, 착상기이상 110개) 1ml군에서 (착상기미만 1개, 착상기이상 109개) 유의한 차이가 없었다 (Table 4). 제 1실험에서와 마찬가지로 배양액용량이 배의 성장에 주는 영향을 평가하기 위하여 동일 용량에서의 배아수는 모두 합산하여 통계처리를 하였다.

### 2) 배양 제 4일

EEC 단계 미만의 성장을 보인 배아는 20개이

**Table 4.** Effect of embryo number and media volume on the development of blastocyst in vitro culture

Day 2 culture	(배아수)	< attachment		attachment	
1개/1ml	20	0	0.0%	20	100.0%
5개/1ml	20	0	0.0%	20	100.0%
10개/1ml	30	0	0.0%	30	100.0%
20개/1ml	40	1	2.5%	39	97.5%
합 (110)		1		109	
1개/2ml	20	0	0.0%	20	100.0%
5개/2ml	20	0	0.0%	20	100.0%
10개/2ml	30	0	0.0%	30	100.0%
20개/2ml	40	0	0.0%	40	100.0%
합 (110)		0		110	
Day 4 culture		< EEC		EEC	
1개/1ml	20	2	10.0%	18	90.0%
5개/1ml	20	2	10.0%	18	90.0%
10개/1ml	30	4	13.3%	26	86.7%
20개/1ml	40	4	10.0%	36	90.0%
합 (110)		12		98	
1개/2ml	20	1	5.0%	19	95.0%
5개/2ml	20	1	5.0%	19	95.0%
10개/2ml	30	3	10.0%	27	90.0%
20개/2ml	40	3	7.5%	37	92.5%
합 (110)		8		102	
Day 6 culture		< LEC		LEC	
1개/1ml	20	9 <sup>a</sup>	45.0%	11 <sup>a</sup>	55.0%
5개/1ml	20	14 <sup>a</sup>	70.0%	6 <sup>a</sup>	30.0%
10개/1ml	30	21 <sup>a</sup>	70.0%	9 <sup>a</sup>	30.0%
20개/1ml	40	33 <sup>a</sup>	82.5%	7 <sup>a</sup>	17.5%
합 (110)		77 <sup>a</sup>		33 <sup>a</sup>	
1개/2ml	20	6 <sup>b</sup>	30.0%	14 <sup>b</sup>	70.0%
5개/2ml	20	9 <sup>b</sup>	45.0%	11 <sup>b</sup>	55.0%
10개/2ml	30	20 <sup>b</sup>	66.7%	10 <sup>b</sup>	33.3%
20개/2ml	40	27 <sup>b</sup>	67.5%	13 <sup>b</sup>	32.5%
합 (110)		62 <sup>a</sup>		48 <sup>a</sup>	
Day 8 culture		< ES		ES	
1개/1ml	20	17 <sup>c</sup>	85.0%	3 <sup>c</sup>	15.0%
5개/1ml	20	19 <sup>c</sup>	95.0%	1 <sup>c</sup>	5.0%
10개/1ml	30	30 <sup>c</sup>	100.0%	0 <sup>c</sup>	0.0%
20개/1ml	40	40 <sup>c</sup>	100.0%	0 <sup>c</sup>	0.0%
합 (110)		106 <sup>#</sup>		4 <sup>#</sup>	
1개/2ml	20	14 <sup>d</sup>	70.0%	6 <sup>d</sup>	30.0%
5개/2ml	20	17 <sup>d</sup>	85.0%	3 <sup>d</sup>	15.0%
10개/2ml	30	27 <sup>d</sup>	90.0%	3 <sup>d</sup>	10.0%
20개/2ml	40	38 <sup>d</sup>	95.0%	2 <sup>d</sup>	5.0%
합 (110)		96 <sup>#</sup>		14 <sup>#</sup>	

\*p=0.05 #p=0.03 <sup>a</sup>p=0.03 <sup>b</sup>p=0.02 <sup>c</sup>p=0.02 <sup>d</sup>p=0.05

EEC: early egg cylinder, LEC: late egg cylinder, ES: early somite.

있고 (9.1%), 200개의 (90.9%) 배아는 EEC나 그 이후 단계까지 발달하였다. 배아의 숫자가 배의 성장에 미치는 효과는 배양 제 2일째와 마찬가지로 유의한 차이를 보이지 않았다. 배양액용량이 배의 성장에 주는 영향도 배양 제 2일째와 마찬가지로 2ml군과 (EEC미만 8개, EEC이상 102개) 1ml군 (EEC미만 12개, EEC이상 98개) 사이에 유의한 차이가 없었다 (Table 4).

### 3) 배양 제 6일

LEC 단계 미만의 성장을 보인 배아는 139개이었고 (63.2%), 81개의 (36.8%) 배아는 LEC나 그 이후 단계까지 발달하였다. 배아의 숫자가 배아의 성장에 미치는 효과는 1ml군과 2ml군에서 모두 유의한 차이를 보여 배양단위당 배아의 개수가 증가함에 따라 성장율의 감소를 나타내었다 ( $\chi=8.93, p=0.03; \chi=10.01, p=0.02$ ) (Table 4). 배양액용량이 배아의 발달에 주는 영향을 보면 2ml군에서 (LEC미만 62개, LEC이상 48개) 1ml군보다 (LEC미만 77개, LEC이상 33개) 유의하게 ( $\chi=3.83, p=0.05$ ) 높은 성장율을 보여주었다 (Table 4).

### 4) 배양 제 8일

ES 단계 미만의 성장을 보인 배아는 202개이었고 (91.8%), 18개의 (8.2%) 배아는 ES나 그 이후 단계까지 발달하였다. 배아의 숫자가 배의 성장에 미치는 효과는 배양 제 6일째와 같이 1ml군과 2ml군에서 모두 유의한 차이를 보여 배양단위당 배아의 개수가 증가함에 따라 성장율의 감소를 나타내었다 ( $\chi=10.12, p=0.02; \chi=7.82, p=0.05$ ) (Table 4). 배양액용량이 배의 발달에 주는 영향을 보면 2ml군에서 (ES미만 96개, ES이상 14개) 1ml군보다 (ES미만 106개, ES이상 4개) 유의하게 ( $\chi=4.90, p=0.03$ ) 높은 성장율을 보여주었다 (Table 4).

## 고 찰

본 연구의 첫 번째 실험결과를 보면 착상전 배아의 배양시 배아수가 포배까지의 성장에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 나타났다. 즉, 배양액의 용량이 같은 조건에서는 배양 제 3, 4, 5일 모두 배아성장이 배아수의 변화에 따라 차이가 없었다. 이는 타 연구에서 (Salahuddin *et al.*, 1995; Canseco *et al.*, 1992; Lane *et al.*, 1992), 동량의 배양액에서 배아를 배양할 경우 배아수를 1개에서 20개까지 증가시킴으로서 포배까지의 성장율을 증가시켰다는 보고와는 매우 차이가 있는 결과

였다.

한편 배양액용량이 배아의 성장에 미치는 영향은 배양 제 3, 4일에 나타나 균의 여러가지 설정 조합에 따라 통계학적으로 유의한 차를 보였다. 그러나 통계학적으로 가장 유의한 차이를 보인 것은 10 $\mu$ l와 50 $\mu$ l를 제1군으로 하고 500 $\mu$ l와 1000 $\mu$ l를 제2군으로 하여 비교하였을 때로서 배양 제 3, 4일의 상실배와 포배까지의 발달이 배양액의 용량이 적은 제1군에서 더 높은 성장율을 보였다. 이 결과는 배양액의 용량을 320 $\mu$ l에서 20 $\mu$ l로 감소시켰으므로 더 높은 포배까지의 성장율을 보여준 Canseco (1992) 등의 결과와 유사하였다. 본 실험 결과의 통계처리 과정에서 동일 용량에서의 배아수는 모두 합산 처리하였는 바, 그 근거는 동일 용량군에 할당된 배아수는 14, 35, 70, 100개로 일정하기 때문이었다. 이것은 착상기 이후의 배아에서도 적용되었다.

본 연구에서 착상전 배아의 체외배양시 배양액용량을 10 $\mu$ l, 50 $\mu$ l, 500 $\mu$ l, 그리고 1000 $\mu$ l의 4가지 용량군을 사용한 이유는 2가지 이유 때문이었다. 첫째는 보통 많이 사용되는 착상전 배아의 micro-drop culture의 용량이 50 $\mu$ l이하로서 주로 10 $\mu$ l이고 그것과 대비하여 착상기 포배의 체외배양시 주로 사용되는 용량이 1~2ml이기 때문이었다. 따라서 착상기 전후의 배아의 체외배양시 주로 사용되는 용량의 비교실험을 위하여 우선 10 $\mu$ l, 50 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l 실험용량군을 선정하였다. 둘째로 배양액용량중 착상기 포배의 체외배양시 사용되는 2ml 대신 500 $\mu$ l를 사용한 이유는 2ml 용량은 micro-drop culture를 하기에는 과량이기 때문에 50 $\mu$ l와 1000 $\mu$ l 사이 용량으로서 500 $\mu$ l를 선택하였다.

위의 결과를 보면 포배까지의 성장율이 배양액용량의 변화에 따라 유의한 차이를 나타낸 것은 타 연구자의 결과와 유사하나 (Canseco *et al.*, 1992) 배아숫자의 변화에 따른 차이를 보이지 않았던 것은 타 연구자들의 결과와 상이하였다 (Salahuddin *et al.*, 1995; Lane *et al.*, 1992). 이것에 대해서는 본 실험 결과만을 가지고는 적절히 설명할 수가 없으나 사용한 배양액이나 실험용구가 달랐던 것을 한가지 이유로 추정할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 본 실험 결과에서 배아의 성장율이 배양액용량에 변화에 의해서는 유의한 차이를 보였지만 배아숫자의 변화에 의해서는 유의한 차이를 보이지 않은 것은 부분적인

설명이 가능하였다. 즉, 본 실험에서 배아개수의 변화는 1개에서 20개로 20배이나, 배양액용량의 변화는 10 $\mu$ l에서 1000 $\mu$ l로 100배이다. 따라서 배아개수에 의한 것 보다는 배양액용량의 변화에 의한 영향이 더욱 클것으로 사료된다.

본 연구의 두 번째 실험결과를 보면 배양액의 용량이 배아성장에 미치는 효과는 배양 제 2, 4일에는 거의 없었으나 배양 제 6, 8일에는 배양액의 용량이 많은 군에서 더 높은 LEC, ES 단계 배아까지의 성장율을 보여주었다. 그리고 첫 번째 실험에서와는 달리 배아수가 배아의 성장에 미치는 영향도 배양 제 2, 4일에는 거의 없었으나 배양 제 6, 8일에는 나타나 1ml군과 2ml군 두군 모두에서 배양용기내 배아의 숫자가 증가함에 따라 배아의 성장율이 유의하게 감소하는 결과를 보여주었다. 이 결과는 저자 등이 1997년에 포배의 체외배양시 배양용기내 배아의 숫자와 배양기간이 증가함에 따라 배아의 성장율이 감소하였다고 보고하였던 결과와 일치하였다 (Kang *et al.*, 1997). 제 1실험에서는 용량변화에 대해서만 유의한 차이를 보였으나 제 2실험에서는 용량뿐 아니라 배아개수의 변화에 따라 유의한 차이를 보인 것은 다음과 같이 설명할 수 있을 것이다. 생쥐배아의 크기는 2세포기에서 포배기까지 별 변화없이 대개 직경이 60~80 $\mu$ m이다. 이것을  $4/3\pi R^3$ 으로 계산하여 부피로 환산하면 약  $10^{-12}m^3$ 이다. 실험에 사용된 배양액의 부피는 계산시 물과 같이 취급하여도 배아의 크기를 감안하면 큰 오차가 생길 정도는 아니다. 따라서 배양액 최소용량인 10 $\mu$ l를 기준으로 하더라도 배아 1개 부피와 배양액부피는 대략  $10^7$ 배가 차이가 난다. 그러나 LEC나 ES 단계의 배아의 크기는 좁쌀알에서 작은 콩정도의 크기로 (약  $10^{-7}$ 에서  $10^{-5}m^3$ ) 육안으로도 관찰이 가능하며 배양액용량 1~2ml를 기준으로 할때  $10^4$  내지  $10^2$  배 정도만 차이가 난다. 그러므로 배아 1개가 확보할 수 있는 공간이 제 1실험에서 제 2실험보다  $10^3 \sim 10^5$ 배 정도 크고 제 2실험중에서도 ES보다 LEC가 크다. 따라서 착상전 배아의 경우는 배아개수의 변화에 따른 영향이 작으나 LEC와 ES 단계 배아는 배아가 차지하는 용적이 상대적으로 매우 크므로 배아개수의 변화에 민감한 변화를 보였다. 결론적으로 제 1실험과 제 2실험의 결과가 차이가 나는 것은 타당성이 있는 것으로 사료된다.

본 연구에서는 실험 방법모델상 한가지 지적

하여 할 점이 있다. 그것은 배양액용량의 차이는 10 $\mu$ l에서 1000 $\mu$ l로 100배 차이가 나는데 배아의 숫자는 1개에서 20개로 20배밖에 차이가 나지 않는다는 것이다. 따라서 배아의 숫자의 변화에 따른 통계학적인 차이가 유의하지 않았던 본 실험의 결과도 배아의 숫자의 차이를 크게 하면 달라질 수 있다는 점이다. 이에 따라 저자 등은 배아의 숫자변화를 크게하는 실험을 현재 시도 중이다.

실험결과를 요약하면, 제 1실험의 경우 배양제 3, 4일에 배양액용량이 배아의 성장에 미치는 영향은 유의한 차를 보였으나 배양제 5일째는 배아의 개수에 의한 것은 물론이고 배양액의 용량에 의해서도 유의한 차이를 보이지 않았다. 제 2실험에서는 배아수나 배양액의 용량이 배아 성장에 미치는 효과가 배양제 2, 4일에는 거의 없었으나 배양제 6, 8일에는 배양액의 용량이 많은 군에서 그리고 배아용기당 배아수가 적은 군에서 더 높은 LEC, ES 단계 배아까지의 성장을 보여주었다. 따라서 위의 두 실험결과는 배아의 밀도나 배양액용량이 배아 성장에 미치는 효과가 성장단계에 따른 특이성을 보인다는 (stage specific) 가설을 성립하게 하며, 구성세포수가 증가하고 out-growth가 진행되는 부화기에서 gastrulation이 왕성한 EEC 단계 사이가 필요한 배양액용량이나 적절한 배아밀도가 변하는 전환점인 것으로 추정된다.

## 결 론

저자 등은 본 연구에서 착상전 배아의 경우는 배양액의 용량이 적을수록 각 발달단계까지의 성장율이 높았으나 착상 후 배아의 경우는 반대로 배양액의 용량이 많거나 배양단위당 배아의 개수가 적을수록 각 발달단계까지의 성장율이 높았음을 관찰하였다. 따라서 배아의 밀도, 특히 배양액의 용량이 배아 성장에 미치는 효과는 성장단계에 따른 특이성을 보인다는 (stage specific) 가설이 성

립하게 되었으며, 이때 변환점은 (shifting point) 부화기와 EEC 단계 사이인 것으로 나타났다.

## 인 용 문 헌

- 강병문: Growth and degeneration of mouse blastocyst in vitro. 대한산부인과학회잡지 1996, 39(1), 121-126.
- Biggers JD, Whitten WK, Whittingham BD: The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC ed., *Method in Mammalian Embryology*. Freeman San Francisco 1971, 86-116.
- Canseco RS, Sparks AET, Pearson RE, Gwazdauskas FC: Embryo density and medium volume effects on early murine embryo development. *J Assist Reprod Genet* 1992, 9(5), 454-457.
- Hsu YC: Embryo growth and differentiation factors in embryonic sera of mammals. *Develop Biol* 1980, 76, 465-474.
- Kang BM, Kim CH, Chang YS: Effect of population density on the early post-implantation mouse embryo growth in vitro. *J Obstet Gynecol Res* 1997, 23, 119-124.
- Lane M, Gardner DK: Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro. *Hum Reprod* 1992, 7, 558-562.
- Salahuddin S, Ookutsu S, Goto K, Nakanishi Y, Nagata Y: Effect of embryo density and co-culture of unfertilized oocytes on embryonic development of in-vitro fertilized mouse embryos. *Hum Reprod* 1995, 10, 2382-2385.
- Witchi E: Characterization of development stage, Part II. Rat. In: *Biology Data Book*, 2nd ed. Washington, D.C.: Federation of American Societies of Experimental Biologists, 1972; Vol. I. 178-180.