

생쥐 난소에서 Preantral Follicle의 단순 분리법*

대구대학교 축산학과¹, 경북대학교병원 산부인과학교실²

김주환¹ · 박기상^{1,2} · 송해범¹ · 전상식²

A Simple Isolating Method of Preantral Follicles from Mouse Ovaries

Ju Hwan Kim¹, Kee Sang Park^{1,2}, Hai Bum Song¹, Sang Sik Chun²

¹Department of Animal Science, Taegu University ²Department of Obstetrics and Gynecology, Kyungpook National University Hospital

Objective: Our present studies were conducted to examine more effective isolating method of preantral follicles from mouse ovaries.

Methods: ICR mice (3-6 weeks old) were sacrificed through cervical dislocation and their ovaries were removed and put into watch glasses containing Hams F-10 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Preantral follicles were isolated by three different methods; 1) enzymatical method and 2) mincing method, and 3) scraping method. Enzymatical method was carried out as following. Ovaries were bisected with a pair of fine 30G needles. Bisected ovaries were incubated at 37°C and 5% CO₂ incubator in 2-well dish containing Hams F-10 supplemented with collagenase 600 IU/ml and DNase 20 IU/ml. After 20 min., follicles were isolated by repeated pipetting. Isolated preantral follicles were collected, and the remnant of tissues was placed in incubator and previous procedure was repeated. Mincing method was carried out with a pair of fine 30G needles attached to 1 ml syringes and minced ovary. Scraping method was carried out with a pair of fine 30G needles and scratched to surface of ovary. The differences between isolating methods were analyzed using Student's *t*-test and Chi-square. Results were considered statistically significant when *p* value was less than 0.05.

Results: In handling time, mincing or scraping method (28±3.42 min or 16±1.58 min) were significantly (*p*<0.00001) shorter than enzymatical method (72±1.69 min), and scraping method was significantly (*p*<0.01) shorter than mincing method.

Total number of isolated follicles was significantly (*p*<0.0001) higher in enzymatical method (49.8±3.91) than in mincing or scraping method (25.3±2.33 or 20.5±1.75). Isolated follicles in ≤90 μm were significantly (*p*<0.005) higher in enzymatical method (15±1.71) than in mincing or scraping method (7.8±0.98 or 8.1±1.31). In 91~130 μm, isolated follicles were significantly (*p*<0.0005) higher in enzymatical method (33±3.27) than in mincing or scraping method (16.3±1.82 or 10.7±1.38). In ≥131 μm, isolated follicles were not significantly differences between all groups.

In equal sizes, the rate of isolated follicles in ≤90 μm was highest in scraping method (39.6% vs. enzymatical method: 30.1%, *p*<0.05; mincing method: 30.9%, *p*=0.11719, NS). Rate of follicles in 91~130 μm was significantly (*p*<0.05) lower in scraping method (52.7%) than in

* 이 논문은 1999학년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

enzymatical or mincing method (66.3% or 64.5%). Rate of follicles in $\geq 131 \mu\text{m}$ was highest in scraping method (8.3% vs. enzymatical or scraping method: 3.6%, $p < 0.05$ or 4.6%, $p = 0.19053$, NS).

Conclusions: This study suggests that scraping method is simple and useful for isolation of preantral follicles, because this method reduced handling time and recovered enough follicles. The recovered rate of isolated follicles in diameter of $91 \sim 130 \mu\text{m}$ was highest in all methods.

Key Words: Preantral follicles from mouse ovaries, Enzymatical method, Mincing method, Scraping method

생쥐에서 preantral follicles을 배란 단계 이상으로 성장시키는 방법이 최근 몇 년 동안에 발달되어, 배란이 유도된 성숙난자를 체외수정·배양하고 나서 이식하여 산자를 생산하는 일련의 배양 기법이 소개되고 있다.^{1~4} Roy와 Treacy (1993)⁵가 사람에서는 처음으로 체외에서 preantral follicle을 배양하는데 성공하였다. 이들은 premenopausal (폐경전) 여성의 난소에서 preantral follicle을 enzymatic digestion으로 분리하였으며, 이 중에서 몇 개는 antral 단계까지 배양하는데 성공하였다. 이 연구에서는 human preantral follicle을 분리하는데 collagenase와 DNase를 사용하였다.⁵ 사용된 효소의 양과 type은 다르지만, rat,^{6,7} hamster,⁸ 생쥐⁹에서도 난소에 효소를 처리하여 preantral 단계의 난포를 분리하고 있다.

효소를 처리하여 follicle을 분리하는 방법은 크기가 다양하고 많은 수의 난포를 회수할 수 있는 장점이 있다. 그러나 이 방법은 처리시간이 길어서 follicle의 정상적인 성장을 저해하고, E₂ 생산에 필수적인 theca layer를 손상시켜 follicle의 발생 능력을 저하시키게 되므로 계속되는 장기간의 체외배양에 영향을 줄 가능성이 높아서,^{10,11} 최근에는 사람,¹² 양,¹³ 소,¹⁴ 생쥐¹⁵ 등에서 난포를 분리할 때 기계적인 방법도 제시되고 있다. 그러나 preantral follicle을 체외에서 분리할 때 사용할 수 있는 방법에 대한 자료가 매우 제한되어 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 생쥐 난소로부터 preantral follicle을 분리할 때 빠르고 단순한 분리방법을 찾기 위하여 효소 처리방법과 기계적인 방법으로 나누어 follicle을 분리하는데 소요되는 시간, 회수된 난포의 수와 크기를 비교·분석하였다.

연구 대상 및 방법

1. 공시 동물

본 연구에 사용된 생쥐는 3~6 주령 사이의

ICR 계통으로 온도 (20~22°C)와 명암 (12 hrs: 12 hrs)이 조절되는 곳에서 사육되었으며, 사료와 물은 무제한으로 급여하였다.

2. 배양액의 준비

난소와 난포의 세척은 20% FBS가 첨가된 Ham's F-10 (F-10, 11550-043, Gibco, USA)에서 실시하였다. 모든 배양액은 0.5% antibiotics (Streptomycin sulfate, S-9137; Penicillin-G, P-3032, Sigma, USA)를 첨가한 다음 삼투압 측정기 (Osmomat 030, Gonotec, Germany)를 이용하여 삼투압을 280 mOsm/kg로 보정하였다. 삼투압을 보정하고 나서 0.2 μm 의 여과기 (Millex-GV, Millipore, USA)로 제균하면서 14 ml tube (2001, Falcon, USA)에 분주한 다음 4°C에서 보관하다가 사용하였다. 효소 처리에 의한 분리는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; 11966-025, Gibco, USA)에 600 IU/ml (0.0036 g/ml) collagenase (Type I; 17100-017, Gibco, USA)와 20 IU/ml DNase I (18047-019, Gibco, USA)를 첨가하여 사용하였다. 실험에 사용할 배양액은 실험을 시작하기 최소한 6시간 전에 37°C, 5% CO₂ incubator에 넣어두었다가 사용하였다.

3. 난포의 분리방법

생쥐를 경추탈골법으로 도살한 후 복부를 개방하여 나팔관과 지방이 되도록 따라오지 않도록 주의하면서 난소를 적출하였다. 적출된 난소는 소독된 거즈 위에서 난소 표면에 부착된 이물질과 혈액을 깨끗이 제거하였다. 1 ml의 washing medium (20% FBS를 함유한 Ham's F-10)이 들어 있는 watch glass로 난소를 옮겨놓은 다음 현미경 하에서 forceps과 30G syringe needle (320310, BD, USA)을 이용하여 여분의 지방 조직을 제거하고 나서, 난포를 회수하는 방법에 따라 각기 다르게 난소를 처리하였다.

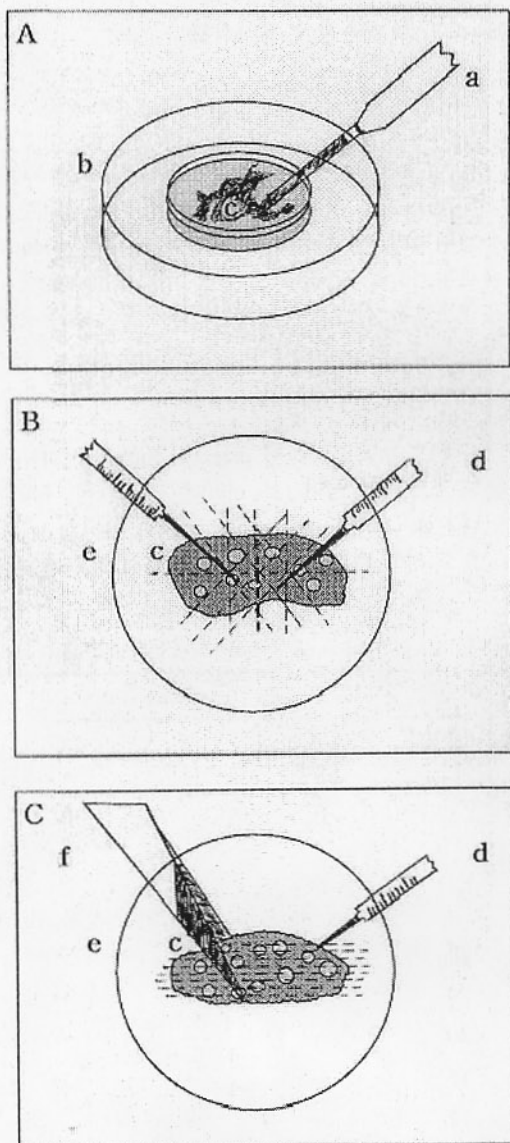


Figure 1. Procedure for isolation of mouse preantral follicles by (A) enzymatical digest, (B) mince or (C) scrape ovary. Notes: a = pasteur pipette; b = two-well dish; c = ovary; d = fine 30G syringe needle; e = watch glass; f = forceps.

1) 방법 1 (Enzymatical method, Group I)

Watch glass로 옮겨진 난소는 20배율 ($\times 20$)의 실체현미경을 보면서 두 개의 30G syringe needle을 이용하여 여러 조각으로 나누었다. 조각난 난소의 조직은 collagenase와 DNase I이 첨가된 배양액이 들어 있는 배양접시 (3037, Falcon, USA)로 옮겨 37°C, 5% CO₂ incubator에서 digestion시켰다.

20분 후 배양접시를 배양기에서 꺼낸 다음, 알코올 램프를 이용하여 가늘게 뽑은 (ID: $\approx 200 \mu\text{m}$) pasteur pipette (4642, BD, USA)으로 강하게 흡입과 배출을 반복하면서 난소 조직으로부터 난포를 분리하였다 (Figure 1A). 난소 조직에서 난포를 최대한 분리하기 위해서 난소 조직을 위의 방법을 반복하면서 난포를 분리·회수하였다. 분리된 난포는 즉시 회수하여 washing medium이 들어 있는 배양접시에서 세척하였다.

2) 방법 2 (Mincing method, Group II)

Watch glass로 옮겨진 난소는 20배율 ($\times 20$)의 실체현미경 하에서 두 개의 30G syringe needle을 이용하여 최소한의 크기 ($\approx 1.0 \text{ mm}^3$)로 잘라 난소의 표면에 광범위하게 존재하고 있는 난포를 분리시켰다 (Figure 1B). 이 방법에서는 난포를 분리할 때 collagenase나 DNase와 같은 효소는 사용하지 않았다. 분리된 preantral 단계의 난포는 pasteur pipette으로 회수하여 washing medium이 들어 있는 배양접시에서 1회 세척하였다.

3) 방법 3 (Scraping method, Group III)

Watch glass로 옮겨진 난소는 20배율 ($\times 20$)의 실체현미경 하에서 forceps으로 난소를 움직이지 않도록 고정시킨 후 30G syringe needle로 난소의 표면을 터뜨리듯이 긁어내었다 (Figure 1C). 부유물이 가라앉을 때까지 잠시 기다렸다가 watch glass의 바닥에 있는 난포를 회수하여 washing medium이 들어 있는 배양접시에서 세척하였다.

4. 난포의 분리방법에 따른 처리시간의 측정

세 가지 방법 (Enzymatical, Mincing, Scraping method)으로 난소에서 난포를 완전히 분리하는 동안 걸린 시간 (분, min)을 측정하여 기록하였다.

5. 회수된 난포의 크기측정과 크기별 분류

세 가지 방법으로 분리된 난포는 primordial, preantral, antral 단계의 follicle로 나눌 수 있으나, 본 연구에서는 preantral 단계의 난포만을 대상으로 하였다.

분리·회수한 난포는 세척한 다음, 실체현미경 하에서 난포의 개수를 세어 기록하였고, 난포의 직경은 현미경 ($\times 200$)의 접안렌즈에 부착된 micrometer를 사용하여 측정하였다.

난포의 크기는 직경에서 장축과 단축을 더하여 나온 수치에 1/2를 곱한 것으로 하였는데, $\leq 90 \mu\text{m}$, 91~130 μm , $\geq 131 \mu\text{m}$ 등 세 가지로 분류하

여 조사하였다.

회수된 난포에서 크기에 따른 회수비율은 각각의 분리방법에 따라 회수된 전체 난포 수에 각 크기별로 나온 난포 수를 나누고 여기에 100을 곱해 백분율로 환산하여 계산한 다음, 같은 group 내에서 크기별로 비교하고, 같은 크기 내에서 group 간에 비교하였다.

6. 통계 분석

난포의 분리방법에서 handling time (분, min)과 회수된 난포 수에 대한 유의성 검정은 Student's *t*-test (two-tails, d.f. = 1)를 이용하였다. 난포의 크기에 따른 회수비율의 유의성 검정은 Chi-square (χ^2 -test)를 이용하였다. 유의성은 5% 수준에서 검정하였다. 각각의 실험결과에서 불연속변수에 대한 표준오차 (\pm SEM)와 표준편차 (SD)는 Microsoft

Excel 97을 이용하여 처리하였다.

결 과

본 연구는 생쥐 난소로부터 preantral 단계의 난포를 간단하고 쉽게 분리하는 방법을 모색하고자 수행하였다. 실험에 사용한 난소의 수는 Group I에서는 10개, Group II에서는 6개, Group III에서는 7개였는데, 한번 실험에 1개의 난소를 이용하였다.

1. 분리방법에 따른 처리시간

각각의 분리방법에서 preantral follicle을 회수하는데 소요되는 시간 (분, min)은 Table 1에 나타내었다.

효소 처리군 (Group I)과 단순 처리군 (Group II,

Table 1. The comparison of isolating methods of preantral follicles from mouse ovaries and handling time

Variable	Study group			<i>p</i> -value*		
	Group I [†]	Group II [‡]	Group III [§]	A	B	C
No. of examination	10	6	7	-	-	-
No. of ovaries	10	6	7	-	-	-
Handling time (min)						
Examination						
1	70	40	20	-	-	-
2	75	40	20	-	-	-
3	80	22	20	-	-	-
4	70	23	15	-	-	-
5	66	25	17	-	-	-
6	65	20	10	-	-	-
7	70	-	10	-	-	-
8	73	-	-	-	-	-
9	68	-	-	-	-	-
10	82	-	-	-	-	-
Range	65-82	20-40	10-20	-	-	-
SD	5.3563	8.3798	4.1747	-	-	-
Mean \pm SEM	71.9 \pm 1.69	28.3 \pm 3.42	16.0 \pm 1.58	<0.00001	<0.00001	0.00997

Note: A = Group I versus Group II; B = Group I versus Group III; C = Group II versus Group III.

**p* < 0.05 was considered statistically significant (Student's *t*-test; two-tails, d.f. = 1).

[†]Group I = Enzymetical method, [‡]Group II = Mincing method, [§]Group III = Scraping method, ^{||}SD = Standard deviation

Group III)으로 나누어 처리시간을 비교하여 보았을 때, 효소 처리군 (Group I: 71.9±1.69분)이 단순 처리군 (Group II: 28.3±3.42분; Group III: 16.0±1.58분) 보다 현저하게 ($p<0.00001$) 길었다. 단순 처리군에서는 난소를 mincing하는 방법 (Group II)이 scraping하는 방법 (Group III) 보다 처리시간이 현저하게 ($p=0.00997$) 길었다.

따라서 생쥐 난소에서 preantral follicle을 분리·회수할 때 단순 처리군이 효소 처리군 보다 처리

시간이 짧았다. 그 중에서 처리시간이 가장 짧은 것은 난소를 scraping하는 방법 (Group III)이었다.

2. 분리방법에 따라 회수된 난포의 수

난포를 분리하는 각각의 방법에 따라 회수되어 나온 난포의 수는 Table 2에 나타내었다.

효소 처리군 (Group I)과 단순 처리군 (Group II, Group III)으로 나누어 회수된 총 난포의 수를 비교하여 보았을 때, 효소 처리군 (Group I: 49.8±

Table 2. The comparison of number of collected preantral follicles and isolating methods of preantral follicles from mouse ovaries

Variable	Study group			p-value*		
	Group I [†]	Group II [†]	Group III [‡]	A	B	C
No. of examination	10	6	7	-	-	-
No. of ovaries	10	6	7	-	-	-
No. of Total collected follicles						
Total	498	152	144	-	-	-
Range	31-76	17-33	15-27	-	-	-
SD	12.3677	5.7057	4.6246	-	-	-
Mean±SEM	49.8±3.91	25.3±2.33	20.5±1.75	0.00009	0.00001	0.08289
No. of collected follicles by sizes						
≤90 μm						
Total	150	47	57	-	-	-
Range	9-26	4-10	2-12	-	-	-
SD	5.4037	2.4094	2.9966	-	-	-
Mean±SEM	15±1.71	7.8±0.98	8.1±1.31	0.00219	0.00340	0.42643
91~130 μm						
Total	330	98	75	-	-	-
Range	20-52	11-22	6-16	-	-	-
SD	10.3344	4.4597	3.6533	-	-	-
Mean±SEM	33±3.27	16.3±1.82	10.7±1.38	0.00050	0.00003	0.02430
≥131 μm						
Total	18	7	12	-	-	-
Range	0-15	0-2	0-4	-	-	-
SD	4.4452	0.8975	1.4846	-	-	-
Mean±SEM	1.8±1.41	1.2±0.37	1.7±0.56	0.34420	0.47909	0.23423

Note: A = Group I versus Group II; B = Group I versus Group III; C = Group II versus Group III.

* $p<0.05$ was considered statistically significant (Student's *t*-test; two-tails, d.f. = 1).

[†]Group I = Enzymetrical method, [†]Group II = Mincing method, [‡]Group III = Scraping method, ^{||}SD = Standard deviation

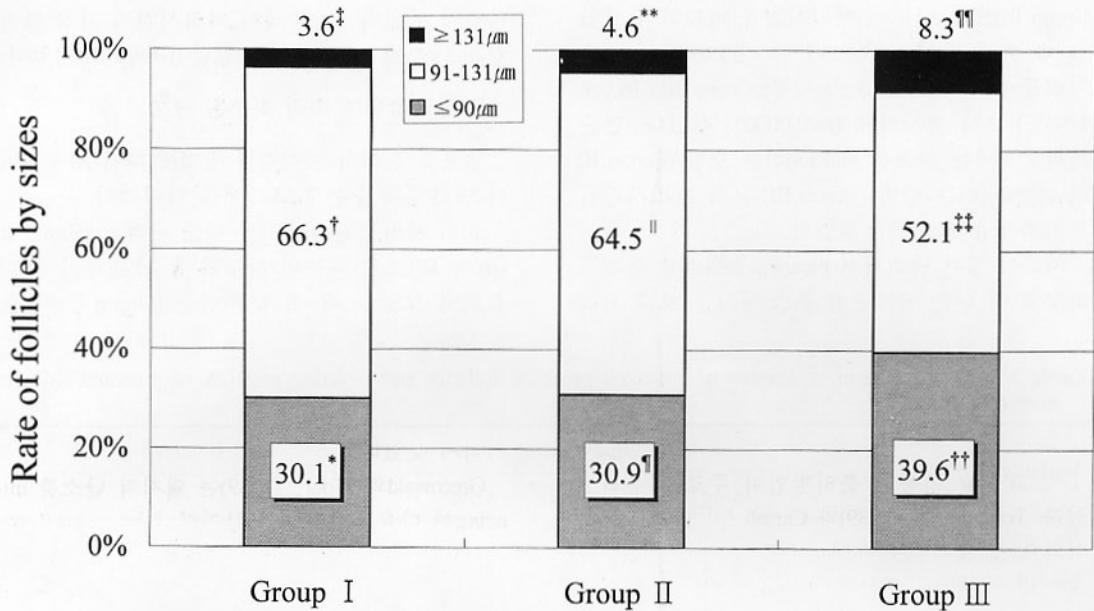


Figure 2. Rate of collected preantral follicles by sizes in different groups. $p < 0.05 = *$; ††; ‡; ¶; ||: ††. $p < 0.005 = *$; †, ‡; ‡: †, ††; ¶: ||, **; ||: **, ¶¶: ††, †† (χ^2 -test).

3.91개)이 단순 처리군 (Group II: 25.3 ± 2.33 개, $p = 0.00009$; Group III: 20.5 ± 1.75 개, $p = 0.00001$) 보다 회수된 난포의 수가 많았다. 단순 처리군에서는 난소를 mincing하는 방법 (Group II)과 scraping하는 방법 (Group III) 간에 회수된 난포의 수는 큰 차이가 없었다 ($p = 0.08289$, NS).

분리된 난포를 크기별 ($\leq 90 \mu\text{m}$, $91 \sim 130 \mu\text{m}$, $\geq 131 \mu\text{m}$)로 나누어 보았을 때, 난포의 크기가 $\leq 90 \mu\text{m}$ 인 경우, 효소 처리군 (Group I: 15 ± 1.71 개)이 단순 처리군 (Group II: 7.8 ± 0.98 개, $p = 0.00219$; Group III: 8.1 ± 1.31 개, $p = 0.00340$) 보다 회수된 난포의 수가 많았으나, 단순 처리군에서는 Group II와 Group III 간에 차이가 없었다 ($p = 0.42643$). 난포의 크기가 $91 \sim 130 \mu\text{m}$ 인 경우, 효소 처리군 (Group I: 33 ± 3.27 개)이 단순 처리군 (Group II: 16.3 ± 1.82 개, $p = 0.00050$; Group III: 10.7 ± 1.38 개, $p = 0.00003$) 보다 회수된 난포의 수가 많았고, 단순 처리군에서는 Group II가 Group III 보다 ($p = 0.02430$) 많았다. 난포의 크기가 $\geq 131 \mu\text{m}$ 인 경우, 처리군 간에 차이가 없었다 (Group I, 1.8 ± 1.41 개; Group II, 1.2 ± 0.37 개; Group III, 1.7 ± 0.56 개).

따라서 생쥐 난소에서 preantral follicle을 분리·회수할 때 효소 처리군 (Group I)에서 회수되는 난포의 수가 가장 많았다. 그러나, 단순 처리방법

(Group II, Group III)으로도 많은 수의 난포를 회수할 수 있었다.

3. 난포의 크기별 회수비율

난포를 크기별로 나누어 회수비율을 Group 간에 비교한 결과를 Figure 2에 나타내었다.

같은 Group 내에서 난포를 크기별로 나누어 회수비율을 비교하였을 때, 모든 Group에서 난포의 크기가 $91 \sim 130 \mu\text{m}$ 사이에서 회수비율 ($52.1 \sim 66.3\%$)이 가장 높았다. 난포의 크기가 $\leq 90 \mu\text{m}$ 인 것은 회수비율이 $30.1 \sim 39.6\%$ 였고, $\geq 131 \mu\text{m}$ 인 것은 $3.6 \sim 8.3\%$ 로 회수비율이 가장 낮았다.

같은 크기의 난포에서 회수비율을 Group 간에 비교하였을 때, 크기가 $\leq 90 \mu\text{m}$ 인 난포의 회수비율은 Group III (39.6%)에서 가장 높았다 (Group I: 30.1% , $p = 0.02566$; Group II: 30.9% , $p = 0.11719$, NS). 크기가 $91 \sim 130 \mu\text{m}$ 인 난포의 회수비율은 Group III (52.7%)에서 가장 낮았다 (Group I: 66.3% , $p = 0.00434$; Group II: 64.5% , $p = 0.02944$). 크기가 $\geq 131 \mu\text{m}$ 인 난포의 회수비율은 Group III (8.3%)에서 가장 높았다 (Group I: 3.6% , $p = 0.01655$; Group II: 4.6% , $p = 0.19053$, NS).

따라서 생쥐 난소에서 preantral follicle을 분리·회수할 때, 약간의 차이는 있으나 모든 처리군에

서 가장 회수비율이 높은 난포의 크기는 91~130 μm 였다.

고 찰

난소로부터 분리한 난포를 체외에서 배양하기 위한 연구가 많이 이루어지고 있지만 난소 조직에서 난포를 분리할 때 매우 복잡한 방법을 사용하고 있으므로,^{2,5,10,14,16} 난포를 쉽고 간단하게 분리할 수 있는 방법을 마련하기 위하여 본 실험을 실시하였다.

포유 동물의 난소로부터 충분한 수와 다양한 단계의 난포를 분리·회수할 수 있다는 장점 때문에 효소를 이용한 분리방법이 주로 사용되고 있다. Torrance 등⁹ (1989)과 Carroll 등¹⁷ (1991)은 생쥐의 난소 조각을 collagenase (Type I) 1.5 mg/ml과 DNase I 40 IU/ml을 함유한 Hepes-buffered medium M199에 넣어 37°C incubator에서 30분간 정치한 후 꺼내어 원심분리를 하여 조직을 digestion하고 나서 125 μm nylon mesh로 여과하여 난포를 회수할 수 있다고 하였다. Roy와 Greenwald⁸ (1996)는 생쥐의 난소 조각을 collagenase 750 IU/ml과 DNase I 100 IU/ml을 함유하고 있는 KRBG 배양액이 들어있는 실리콘 처리된 유리병에 넣어 37°C에서 20분 동안 정치한 후 10분 간격으로 pasteur pipette으로 휘저어준 후 nylon mesh로 여과하여 난포를 회수하였다. 본 연구에서는 생쥐의 난소 조각을 collagenase (Type I) 600 IU/ml과 DNase I 20 IU/ml가 함유되어 있는 DMEM에 넣어 37°C incubator에서 20분간 정치시킨 후 가늘게 뽑은 pasteur pipette으로 흡입과 배출을 반복하여 난포를 분리하였다.

사람의 난소에서 난포를 분리하여 배양하는 연구도 지속적으로 이루어지고 있다. Roy와 Treacy⁵ (1993)가 사람에서는 처음으로 효소를 처리하여 분리한 preantral follicle을 체외에서 장기간 동안 성장시켰다. Abir 등¹⁸ (1999)은 효소 처리방법으로 사람의 난소에서 분리한 초기 단계의 난포를 collagen gels에서 배양하였으나 성장하지는 않았다고 하였다.

이 외에도 rat,^{6,7} hamster,⁸ 생쥐⁹에서도 난소에 효소를 처리하여 preantral follicle을 분리하였지만 이 방법은 난소 조직을 효소에 노출시켜 난포를 분리할 때 난포 조직 자체도 효소에 노출되는 시간이 길어지게 되므로 체외에서 난포의 정상적인

성장이 저해되고 E₂ 생산에 필수적인 theca layer가 손상되어 결과적으로 난포의 발생능력이 떨어지게 된다.^{10,11} 포유 동물의 난소에 효소를 처리하여 분리된 난포들은 배양액 droplet 하에서 장시간 동안 배양이 어렵기 때문에 gel을 이용한 체외배양이 많이 이용되고 있다. Agar gel¹⁹과 Matrigel²⁰을 이용한 체외성장에서 theca-free 난포가 체외배양에서 antral 단계까지 성장할 수 있었다. Collagen gels에서는 preantral 단계까지 성장이 유도되었지만,⁹ oocyte 성숙 단계까지는 발달을 시키지 못한다고 하였다.²¹ 또한 2개 또는 여러 개의 granulosa cells 층을 가진 human follicles은 collagen gels에서 자라지 못했다.¹⁸

Greenwald와 Moor²² (1989)는 돼지의 난소를 mincing한 다음 collagenase 처리하여 60 μm 이하인 200,000개의 primordial follicles을 회수하였으며, Hirao²³ (1994)는 collagenase를 처리하면서 microdissection하여 100~250 μm 크기의 난포를 100개 정도 회수하였다. 또한 Wandji 등²⁴ (1996)은 소의 난소에 효소를 처리하여 30~50개 정도의 preantral follicle (60~179 μm)을 얻을 수 있다고 하였다. 반면, Figueiredo 등²⁵ (1994)은 소의 난소를 mechanical chopping 방법으로 100 μm 보다 작은 preantral follicle을 37개 회수하였다. Cortvrindt와 Smits²⁶ (1998)는 생쥐의 early preantral follicle (100~130 μm)을 체외에서 배양하여 oocyte의 성장과 granulosa-cell의 분열을 조사한 연구에서 한 개의 난소에서 30~40개의 배양 가능한 난포를 회수할 수 있다고 하였고, Katska와 Ryńka¹⁴ (1998)는 생쥐 난소를 microdissection하여 late preantral ~ early antral follicle을 17개 회수할 수 있다고 하였다. 따라서 여러 종의 동물 난소에서 난포를 분리하는 방법 중에서 효소 처리 방법이 기계적인 처리방법보다 많은 수의 난포를 확보할 수 있다. 본 연구에서도 효소 처리 방법이 기계적인 처리방법보다 회수된 난포의 수가 많아 유사한 결과를 나타내었지만 (Table 2), handling time이 길어지는 단점이 있었다 (Table 1).

이와 같이 효소를 처리하여 난소에서 난포를 분리하는 방법은 크기가 다양하고 많은 수의 난포를 분리할 수 있다는 장점이 있지만, 난포를 분리·회수할 때 효소에 노출되어 난포의 일부가 손상되어 난포의 발생능력이 저해현상을 유발시킬 수도 있고, 효소에 노출되는 시간이 길어지면서 unknown harmful effect의 가능성이 증가할 수

있음을 간과할 수 없다. 따라서 최근에는 사람,¹² 양,¹³ 소¹⁴ 그리고 생쥐¹⁵ 등에서 난포를 분리할 때 기계적인 방법도 제시되고 있다. 본 연구에서는 preantral follicle을 분리할 때 효소 처리 방법 (Figure 1A) 외에도 두 가지의 기계적인 처리 방법으로 난포를 분리하였는데 (Figure 1B, C), 한 가지는 실체현미경 ($\times 20$) 하에서 30 gauge needle로 난소 조직을 최소단위로 자른 후 watch glass의 바닥에 흩어져 있는 난포를 회수하는 방법이며 (mincing method), 또 한 가지는 난소의 표면을 30 gauge needle의 끝 부분으로 긁어내는 동작을 반복한 후 watch glass의 바닥에 흩어져 있는 난포를 회수하는 방법이다 (scraping method). 난소를 mincing하는 방법은 난포를 분리할 때 많은 연구자들이 사용하고 있으나 (Boland 등, 1993; Boland와 Gosden, 1994; Abir 등, 1997; Cecconi 등, 1999),^{2,12,13,27} 난소를 scraping하는 방법은 현재까지 자료가 없는 실정이다.

난포를 분리할 때 사용한 다양한 분리방법으로 회수한 난포를 크기별로 회수비율을 보았을 때, 가장 많은 것은 91~130 μm (52.1~66.3%) 였고, $\leq 90 \mu\text{m}$ (30.1~39.6%)가 그 다음이었고, $\geq 131 \mu\text{m}$ (3.6~8.3%)인 것이 가장 적다는 것이 공통적이었다 (Figure 2). 그러나, 난포의 분리방법이 차후의 체외성장에 미치는 영향에 대해서는 연구가 지속적으로 수행되어야 할 것이다.

결론적으로, 생쥐에서 preantral follicle을 분리·회수할 때 효소 처리 방법으로 가장 많은 수의 난포를 회수했지만, 기계적으로 처리하는 방법만으로도 충분한 수의 난포를 회수하면서도 처리시간은 크게 단축시킬 수 있었다. 그 중에서도 난소를 scraping하는 것은 더욱 쉽고 간단하게 사용할 수 있는 단순 분리법이 될 것이다. 회수되는 난포에서 가장 회수비율이 많은 난포의 크기는 91~130 μm 였다.

본 실험의 결과로 나타난 난포의 단순 분리법은 난포 동결을 통한 생식세포의 영구보관, 회귀종의 보존 등 여러 가지 목적에 간단하고 편리하게 이용될 수 있을 것이다. 임상적인 측면에서 볼 때, 난소와 관련된 질병이 있거나 난소 절제술을 받아야 되는 여성 등에서도 효과적으로 응용될 수 있는 기초자료가 될 것이다.

감사의 글

본 실험은 경북대학교병원 불임연구실과 의학연구소에서 수행되었음을 밝혀두며, 감사의 말씀

을 드립니다.

참 고 문 헌

1. Eppig DG, Schroeder AC. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. Biol Reprod 1989; 41: 268-76.
2. Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ, Gosden RG. Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles *in vitro*. Biol Reprod 1993; 48: 798-806.
3. Gosden RG, Boland NI, Spears N, Murray AA, Chapman M, Wade JC, et al. The biology of follicular oocyte development *in vitro*. Reprod Med Rev 1993; 2: 129-52.
4. Spears N, Boland NI, Murray AA, Gosden RG. Mouse oocytes derived from *in vitro* grown primary ovarian follicles are fertile. Hum Reprod 1994; 9 (Suppl 3): 527-32.
5. Roy SK, Treacy BJ. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. Fertil Steril 1993; 59 (Suppl 4): 783-90.
6. Gore-Langton RE, Daniel SAJ. Follicle-stimulating hormone and estrogen regulate antrum-like reorganization of granulosa cells in rat preantral follicle cultures. Biol Reprod 1990; 43: 65-72.
7. Cain L, Chatterjee S, Collins TJ. *In vitro* folliculogenesis of rat preantral follicles. Endocrinology 1995; 136: 3369-77.
8. Roy SK, Greenwald GS. Methods of separation and *in-vitro* culture of pre-antral follicles from mammalian ovaries. Hum Reprod Update 1996; 2: 236-45.
9. Torrance C, Telfer E, Gosden RG. Quantitative study of the development of isolated mouse preantral follicles in collagen gel culture. J Reprod Fertil 1989; 87: 367-74.
10. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. Endoc Rev 1996; 17: 121-54.
11. Gilling-Smith C, Willis DS, Beard RW, Franks S. Hypersecretion of androstenedione by isolated

- thecal cells from polycystic ovaries. *J Clin Endoc Metab* 1994; 79: 1158-65.
12. Abir R, Moore PA, Franks S, Margara RA, Moberley MA, Winston RML. Mechanical isolation and *in vitro* growth of preantral and small antral human follicles. *Fertil Steril* 1997; 68: 682-8.
 13. Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli M. *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biol Reprod* 1999; 60: 594-601.
 14. Katska L, Rynka B. The isolation and *in vitro* culture of bovine preantral and early follicles of different size classes. *Theriogenology* 1998; 50: 213-22.
 15. Nayudu PL, Osborn SM. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1992; 95: 349-62.
 16. Roy SK, Greenwald GS. Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long term culture. *J Reprod Fertil* 1989; 87: 103-14.
 17. Carroll J, Whittingham DG, Wood MJ, Telfer E, Gosden RG. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J Reprod Fertil* 1991; 92: 197-207.
 18. Abir R, Roizman P, Fisch B, Nitke S, Okon E, Orvieto R, Ben Rafael Z. Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 hours. *Hum Reprod* 1999; 14: 1299-301.
 19. Qvist R, Blackwell LF, Bourne H, Brown JB. Development of mouse ovarian follicles from primary to preovulatory stages *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1990; 89: 169-180.
 20. Hartshorne GM, Clark C. Growth and endocrine responses of mouse ovarian follicles *in vitro*. 48th Annual Meeting of the American Fertility Society, New Orleans, Louisiana, USA, 31 October-5 November 1992; P-0286: p77.
 21. Merriman JA, Carroll J, Whittingham DG. Maturation and fertilization of oocytes grown *in vitro* and *in vivo*. *J Reprod Fertil Abstr Ser* 1993; 11: 1.
 22. Greenwald GS, Moor RM. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *J Reprod Fertil* 1989; 87: 561-71.
 23. Hirao YN. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *J Reprod Fertil* 1994; 100: 333-9.
 24. Wandji SA, Eppig JJ, Fortune JE. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology* 1996; 45: 817-32.
 25. Figueiredo JR, Hulshof SCJ, Van den Hurk R, Nusgens B, Bevers MM, Ectors FJ, et al. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology* 1994; 41: 1333-46.
 26. Cortvrindt R, Smits J. Early preantral mouse follicle *in vitro* maturation: Oocyte growth, meiotic maturation and granulosa-cell proliferation. *Theriogenology* 1998; 49: 845-59.
 27. Boland NI, Gosden RG. Effects of epidermal growth factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles. *J Reprod Fertil* 1994; 101: 369-74.