

## 체외에서의 생쥐배아의 성장\*

제명 대학교 의과대학 산부인과학교실

### 이 두 풍

#### =Abstract=

In vitro growth of mouse embryos in 20% Ham's F-10 medium

Du Ryong Lee, MD

Department of Obstetrics and Gynecology, Keimyung University  
School of Medicine, Taegu, Korea

These experiments were done to obtain basic information necessary for quality control and in vitro culture of mouse embryos.

Mouse eggs were obtained by superovulating ICR mice.

Total 132 of two cell mouse embryos were subjected to be cultured in a 20% Ham's F-10 medium under the gas phase 5% CO<sub>2</sub>, in air at 37°C for 60 to 78 hours. Of total 132 of two cell embryos, 107 embryos were developed to blastocyst and rates of culture were 81 percent.

### 서 론

### 재료 및 방법

#### 1. 실험동물

실험동물은 제명대학교 의학대학 동물사육실에서 사육된 ICR 계 생쥐로 제명대학교 의과대학 동물사육실에서 3주일 이상 환경에 적응시킨 후, 암컷은 생후 6~8주일 이상 된것을 사용하였으며, 숫컷은 생식능력이 왕성한 3~10개월 된것을 사용하였다. 실험에 사용한 모든 생쥐는 실온에서 조명과 암흑을 인위적으로 하지 않고 자연적인 낮과 밤을 이용하였고, 사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

#### 2. 배양액

Ham's F-10 cglutamate 9.81g을 이용하여 250ml의 5차 중류수 Q Water로 monthly stock media를 만들고, penicillin G(Sigma) 75mg, streptomycin sulfate(Hoechst) 75mg을 첨가한 후, 충분히 용해하

인간의 체외수정 및 배아의 자궁내 이식이 성공되기 위해서는, 배아(embryo)는 체외에서 수정되어 배양되어야 한다. 그러므로 배아의 완전한 성장을 촉진시키기 위하여 적정한 배양조건을 확립하는 것이 매우 중요하다. 특히 생쥐배자(胚子)의 배양법은 이들을 연구하기에 알맞는 방법을 Brinster<sup>1)</sup>가 개발 하였고, 인간난자의 체외수정에 사용하는 배양액에는 모체의 혈청이나 신생아 체대혈청을 첨가하여 사용하였다<sup>2,3)</sup>. 이에 저자는 초기배(初期胚) 배양에 관한 활발한 연구추세 속에서 초기배의 배양에 관한 기본지식을 얻을 목적으로 Hams' F-10 배양액을 사용하여 생쥐의 2세포기 배(胚)를 배양하므로서 배양액의 배양조건과 배양상태 등을 점검하기 위해 시도하였든바, 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

\* 이 논문은 1987년도 제명대학교 동·산의료원 특수과제 연구비로 이루어 졌음.

도록 철저히 혼돈후, 0.2 micron Nalgene filter를 통하여 여과시킨후 4°C 냉장고에 보관하였다. 이와 같이 만들어진 monthly stock media 25ml에 5차 종류수 Q Water 75ml을 혼합하고, lactic acid, ca salt (Hoechst) 27.87mg과 NaHCO<sub>3</sub> (Mallinckrodt) 210.6mg, phenol red (Grand Island Biological Company) 25micro liter를 첨가한후, pH는 7.4에 맞추고, 심투압은 280~284 mOsm이 되도록 하여 CO<sub>2</sub> incubator에 넣어 뚜껑을 헐렁하게 막아 pH를 조정하였다. 0.2micron Nalgene filter를 통하여 여과시킨 후 CO<sub>2</sub> incubator 안에 보관해두었다가, 신생아 제대혈청의 농도가 20%가 되도록 혈청을 침가하여 실험에 사용하였다. 본 실험에서는 모든胚子회득시에 Ham's F-10을 사용하였다. Ham's F-10 배양액을 Falcon 조직배양접시에 넣고, 실험 24시간 전에 5% CO<sub>2</sub> 배양기 속에서 37°C로 보존하여 본 실험에 이용하였다.

### 3. 신생아 제대혈청

제명대학교 동산의료원 분만실에서 빙혈이나 임신 중 합병증이 없는 건강한 산모가 질식(腫式)분만후, 무균멸균된 튜브로 무균적으로 채취하였다. 채취된 신생아 제대혈은 4°C 냉장고에 2시간이상 보관하였다가 1000rpm으로 혈청을 원심분리한후, 56°C에서 1시간 불활성화시켜 즉시 0.2 micron filter를 통하여 여과멸균을 하고 실험직전까지 -20°C 냉장고에 보관하였다.

### 4. 과배란유도

생후 6~8주(週)된 암컷생쥐를 동물사육실의 사육우리에서 입의로 추출하여, 생쥐의 발정주기에 관계없이 5 I.U.의 PMSG(pregnant mare serum gonadotropin)와 5 I.U.의 hCG(human chorionic gonadotropin)을 48시간 간격으로 복강내주사 하여 배란을 유도하였다. HCG 주사직후 암컷과 수컷을 같은 사육통에 넣어 교미가 이루어 지도록 하였으며, 교미가 이루어 졌는지의 여부는, 다음날 아침 암컷 쥐의 질(陰) 접액전(粘液栓) 형성여부를 관찰하여 판정하였다<sup>4)</sup>.

### 5. 배자(胚子)의 획득

HCG 주사 40~44시간후에 생쥐를 경추탈구법(cervical dislocation)으로 희생시키고, 무균조작으로 개복하여 자궁, 난관, 난소를 노출시켜서 지방조직을 제거한후, 양측난관만 떼어내어 4ml의 Ham's F-10 배양액이 담긴 40mm의 배양접시에 보관하였다. 해

부현미경(dissecting microscope)하에서 30Gauge 주사침을 사용하여 난관을 조심스럽게 압착(squeeze)하여 2세포기의 배자를 얻었다. 이렇게 하여 얻어진 배자는 역반사현미경(inverted microscope)으로 관찰하여, 변형되었거나 또는 퇴화된 배자 및 1세포기(細胞期)의 배자는 제외하고 정상적으로 보이는 2세포기의 배자만을 모아 20% Ham's F-10 배양액이 담긴 배양접시에 10개씩 넣고 배자의 성장을 관찰하였다. 배자의 성장은 24시간 간격으로 역반사현미경을 사용하여 관찰하고, 매일 모든 배자를 2세포기, 3~4세포기, 6~8세포기, 16~32세포기, 상실배기(桑實胚胎·morula), 배포기(胚胎期·blastocyst), 퇴화 또는 변형된 배자 등으로 분류하여 기록하였다.

### 6. 신생아 제대혈청의 적합성 검사

인간난자의 체외수정에 사용할 신생아 제대혈청의 품질을 판타하기 위해서는 배양 78시간후 상실배기 또는 배포기에 도달한 배자의 수를 실험에 사용한 2세포기 배자의 수로 나누어 난활률(卵割率·cleavage rate)을 계산하였다<sup>4)</sup>.

### 실험 성적

본연구에 사용된 생쥐의 2세포기 배자의 배포기로의 발달과정과 성적은 Figure 1~5와 Table 1에서 보는바와 같다. 조직배양용 disposable petri-dish (Falcon plastics, #3037 U.S.A.)에 배양액 20% Ham's F-10 3ml을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> incubator에 넣어 배양을 시행하였다. 생쥐로부터 채취된 2세포기 배자(胚子)를 10개씩 넣어 60시간에서 78시간 배양하면서 2세포기 배자의 발달 상태를 관찰하

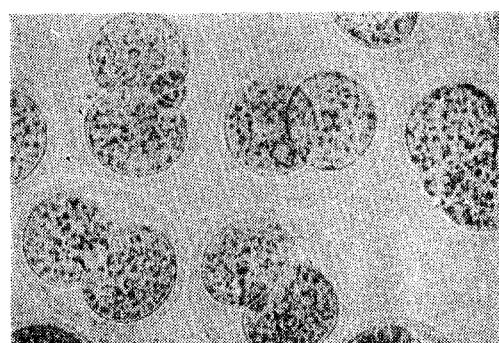


Fig 1. 2-cell stage mouse embryo. Immediately after flushing oviduct (X250).

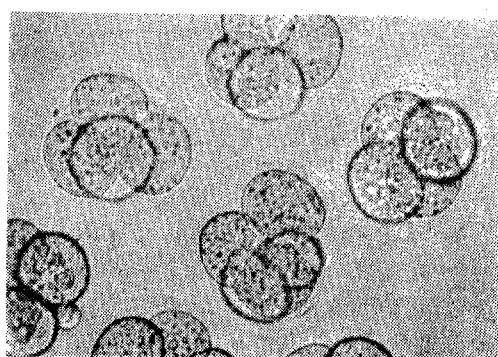


Fig 2. 4-cell stage mouse embryo. 12 hours after culture. ( $\times 250$ )

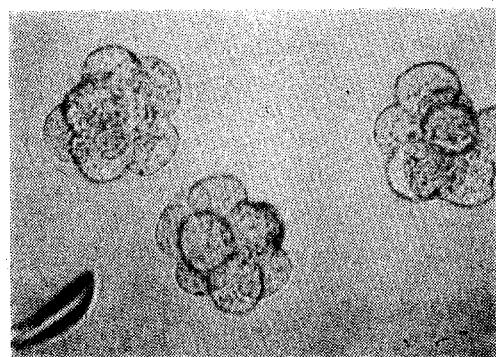


Fig 3. 8-cell stage mouse embryo. 22 hours after culture. ( $\times 250$ )

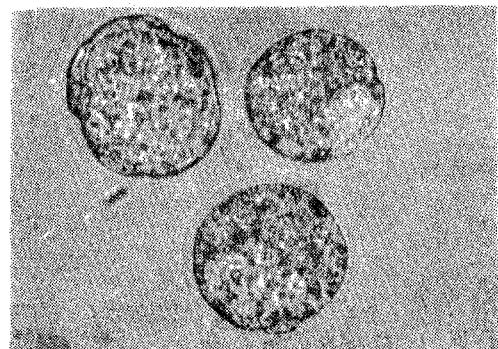


Fig 4. Morula stage mouse embryo. 34 hours after culture. ( $\times 250$ )



Fig 5. Blastocyst stage mouse embryo. 48 hours after culture. ( $\times 250$ )

Tabel 1. In Vitro Cleavage Rate of 2-cell Mouse Embryos.

Experiment	No. of degenerated, 1-cell	No. of collected embryos (2-cell/)	No. of embryos subjected to culture	No. of developed embryos			
				4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
1	27/ 8		27	25	25	25	25
2	14/ 6		14	12	11	10	9
3	18/ 4		18	16	16	16	16
4	22/ 9		22	20	19	18	17
5	11/ 6		11	9	9	9	9
6	21/10		21	19	18	17	16
7	19/ 8		19	15	15	15	15
Total of mean		132/51	132	116(88)*	113(86)*	110(83)*	107(81)*

No.: Number

( )\*: Percent of success of cleavage.

였다. 2-세포기 배자의 회수로 부터 배양에 이르기 까지의 모든 과정은 30°C~37°C에서 실시 하였다. 2-세포기 생쥐배자의 4-세포기, 8-세포기, 상실배

(双實胚) 및 배포기로의 발달성적은 각각 88%, 86%, 83%, 81%로서 양호하였다.

## 고 칠

생쥐, 토끼, 햄스터 등의 동물을 이용하여 난자의 성숙, 배양액의 조건, 수정(受精), 초기배자의 난활발달등에 관한 연구는 1960년대에 들어와 많은 학자들에 의해 활발하게 진행되었다<sup>5)</sup>. 1935년 Pincus 와 Enzmann<sup>6)</sup>이래 1950년대 말 까지는 혈청을 주배지(主培地)로 하여 생쥐, 토끼등의 난자의 성숙을 유도한 실험이 있었다. 생쥐 배자의 초기발생에 대해서는, 1960년 후반에 걸쳐 Biggers 등<sup>7)</sup>, Brinster<sup>8,9)</sup>, Daniel 등<sup>10)</sup>에 의해서 체계적으로 연구가 진행되었다고 할수있다. 1960년초의 연구자들<sup>11) 12) 13)</sup>의 보고에 의하면, 생쥐의 경우 단순한 배양액내에서 체외수정을 시켜 수정난을 배양하여, 2-세포기의 배자로 발생시킬수 있으나, 계속 그 이상의 세포기로의 발생을 유도하는것은 어렵다고 하였고, 배포기(胚胞期)까지 난활을 완성시키자면, 체내에서 첫번째 분열을 끝낸 2-세포기의 배자라야만 가능하다고 하였다. 난자나 배자(胚子)의 경우 초기에는 혈청을 사용하거나 배자추출물(embryo extract)에 50% 이상의 혈청을 첨가한 생물학적 배양액을 사용하였으나, 최근에는 화학적으로 조성(組成)이 결정된 배양액을 사용하는 경향이다. 본 연구에서도 Ham's F-10 medium에 20% 제대혈청을 사용하였다. 본연구에서 2-세포기 생쥐배자의 4-세포기, 8-세포기, 상실배(双實胚), 배포기(胚胞期)로의 발달성적은 각각 88%, 86%, 83%, 81%로서 세포배양시 배양기(培養器)의 품질관리를 위해 생쥐의 2-세포기 배자를 배포기(胚胞期)까지 발달시키는데 요구되는 80%의 수준과 비교할때 본연구의 성적 81%는 다른 연구자들의 성적과 거의 일치되었다<sup>11)</sup>(Fig 1~5). 이러한 일련의 실험은 세포배양에 있어 반드시 수행되어야 하는것이며, 배양액의 pH, 삼투압, 조성상의 문제점과 종류수의 순도등을 검토하고 배양기의 상태도 점검할수 있기 때문이다. 전술한 제반조건이 갖춰질때 세포배양상의 문제점을 국소화 시킬수 있고 최고의 배양성적을 올릴수 있다. Gates 등<sup>12)</sup>에 의하면 배자의 발생에 필요한 무기염류는 원칙적으로 혈중농도에 준한다.

$\text{Ca}^{++}$ 와  $\text{Mg}^{++}$ 은 2-세포기 배자분할에 영향을 미치고, 특히  $\text{Ca}^{++}$ 은 배포기까지의 발생에 관여 한다고 하였다. 수소이온 농도는 bicarbonate와 탄산가스의 농도에 따라 결정이 되므로 생쥐의 경우는 pH 7.3~7.4가 적당하며, 생쥐 혈청의 삼투압은 약 310 mOsm이나 난자나 배자의 배양에는 280mOsm 이 적

정선으로 되어있다고 하였다. 연구자들마다 난활률의 성성공률에 있어 차이가 나는것은 이러한 정도관리법(精度管理法 quality control method)의 차이에 따르는것으로 사료된다. Saito<sup>13)</sup>등에 의하면, 용혈된 신생아체대혈의 혈청을 사용한 경우에는 생쥐의胚子형성(embryogenesis)에 지장을 초래한다고 하였으며, 따라서 체외에서 신생아체대혈청이 포함된 배양액을 사용하여 생쥐배자를 2-세포기에서 상실배(双實胚)나 배포기 까지 60% 도달시키지 못한 경우는 배양에 부적합하며 이 경우의 인간난자의 체외수정에 사용하지 아니하는것이 좋을것으로 사료된다. 1976년 Steptoe<sup>14)</sup>등은 배양액내에 제대혈청을 첨가한 배양액만을 사용하거나, 혹은 일부만 또는 송아지 태아혈청을 첨가한 예와 비교할때, 태아체대혈청만 사용했을때에 보다 나은 성적을 나타내었다고 하였다.

배양액의 조성에 관해서는 동정백혈중농도에 해당하는 5%  $\text{CO}_2$ 의 공기조성을 가져야만 하며, 삼투압과 pH를 맞추는것도 상당히 중요하다. 이상의 배양액의 조성과 조건을 검토하여 본바 본 연구실에서 사용하는 20% Ham's F-10 배양액은 지금까지의 배양성적으로 볼때 세포배양에 이용해도 별 이상은 없다고 사료되나 사용된 난자수가 적고, 인간 난자를 배양할 경우 미성숙난자를 발달시키는 경우도 많을 것으로 사료되므로 배양액의 조성과 배양기의 상태를 여러관점에서 고려할 필요가 있다고 사료된다.

## 요 약

본연구는 생쥐의 2-세포기 배자를 배양시켜 체외수정과 배아의 자궁내이식(시험판 아기) 프로그램을 위한 기초지식과 배양기술을 습득하기 위하여 시도되었다. 생쥐에 과배란을 유도한 다음, 2-세포기의 난자를 채취하여 20% Ham's F-10 배양액으로 배양하였던바 132개의 2세포기 배자중 107개가 배포기 까지 발달하여 평균 81%의 성적을 얻었다.

## 참 고 문 헌

- Brinster: A method for in vitro cultivation of mouse ova from 2-cell to blastocyst. *Exptl Cell Res* 1963; 32: 205.
- Lopata A, Johnston IW, Hoult IJ, Speirs AL: Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by in vitro

- fertilization of a preovulatory egg. *Fertil Steril* 1980; 33: 117.
3. Veeck LL, Wortham JWE, Witmyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JE, Jones GS, Jones HW: Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983; 39: 594.
4. 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.
5. Cho WK: Would a test-tube baby be possible to come out. Kor *J Fertil Steril* 1974; 1: 25.
6. Pincus G, Enzmann EV: The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. 1. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med* 1935; 62: 665.
7. Biggers JD, Moore BD, Whittingham DG: Development of mouse embryos in vivo after cultivation from two-cell ova to blastocysts. *Nature* 1965; 206: 734.
8. Brinster RL: In vitro cultivation of mammalian ova. *Adv Biosci* 1969; 4: 199.
9. Brinster RL: Culture of two-cell rabbit embryos to morulae. *J Reprod Fertil* 1970; 21: 17.
10. Daniel JC Jr: Cultivation of rabbit embryo in circulating medium. *Nature* 1970; 225: 193.
11. Dominique SM, Cornier E, Jondet M, Scholler: Methods in developmental biology ceds. *R Path Biol* 1974; 331: 693.
12. Gates AH: Maximizing yield and developmental uniformity of eggs. In Daniels JC Jr(ed): "Methods in Mammalian Embryology" San Francisco, WH Freeman and Co, 1975, p 64.
13. Saito HK, Marrs RP, Berger T, Brown J, Mishell DR: Enhancement of in vitro embryo development by specific serum supplements. *Fertil Steril* 1983; 39: 423.
14. Steptoe PC, Edwards RG, Shulman J, Purdy J: The recovery of human preovulatory oocytes, fertilization in vitro, cleavage and embryo transfer, in campos de Paz A(ed): "Recent Advances in Human Reproduction". Amsterdam, Excerpta Medica, 1976, p 285.