

사람의 체외수정시술용 배양액과 제대혈청의 제조, 정도관리 및 임상적 이용에 관한 연구*

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실
손 영 수 · 김 향 미

Abstract

Study on Preparation, Quality Control and Clinical Application of Media and Fetal Cord Serum used in Human In Vitro Fertilization Program

Young Soo Son · Hyang Mee Kim

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

In order to investigate the clinical application of media and fetal cord serum in human In Vitro Fertilization program, its preparation and quality control was performed and the results were as follows.

1) When the in vitro growth and development to hatching blastocyst of 2-cell stage mouse embryos was observed three times, the average developmental rate was 84.5% in m-KRB media with an addition of 0.3% bovine serum albumin. And m-KRB media was accepted as adequate to experiment.

When the in vitro growth and development to hatching blastocyst of 2-cell stage mouse embryos was observed three times in m-KRB media with an addition of 10% fetal cord blood serum, if the developmental rate was no significance between test media with control, we approved the serum as safe and used it in human in vitro fertilization program.

2) When the in vitro growth and development to hatching blastocyst of 2-cell stage mouse embryos was observed three times in the control and Ham's F-10 media, the developmental rate was no significance between control and Ham's F-10 media. So Ham's F-10 media was accepted as adequate to experiment.

3) When the safe fetal cord serum was used in the human in vitro fertilization program, the average pregnancy rate was 33.3%.

Judging from above results, the strict quality control of media and fetal cord serum should be necessary for obtaining the high pregnancy rate in human in vitro fertilization program. However, this kind of quality control system is very complex and time-consuming, so, therefore, the more effective and simple quality control system should be developed in the near future.

*본 연구는 1993년 이화여자대학교 교수연구기금 연구비 지원으로 이루어졌음.

서 론

최근 불임화자에 있어 시험관아기(In Vitro Fertilization & Embryo Transfer, 이하 IVF & ET로 약함) 프로그램이 널리 이용되고 있으며, 이러한 시술에 있어 성공률을 증가시키기 위하여 많은 연구가 되어 왔다. 특히 외부에 노출된 생식세포의 손상을 방지하기 위하여 정도관리(Quality Control) 즉 생식세포의 유독인자에 의한 오염을 방지하고 체외배양환경을 양호한 생리적 조건을 유지시키기 위한 과정을 실시하여 시험관아기 시술의 실패를 방지하고 체외배양환경을 양호한 생리적 조건으로 유지시키기 위한 과정을 실시하여 시험관아기 시술의 실패를 방지하고 시술의 성공률을 증가시키게 되었다¹⁻³⁾. 이러한 정도관리를 실시하는 분야는 배양액 및 용기 및 이에 대한 세척과 소독이 포함된다. 특히 생식 세포의 배양액이 가장 중요한 부분을 차지하며, 배양액을 이루는 가장 기본적인 요소로는 물, 배양액, 단백질이 포함되며⁴⁾, 고순도의 물이 배아의 발달에 영향을 미칠수 있다는 많은 보고도 있다⁵⁻⁷⁾. 그러나 생식세포의 배양에 있어 가장 중요한 요소로는 직접 배아의 성장에 영향을 미칠수 있는 단백질의 성분이 가장 중요시 되고 있으며⁸⁻¹⁴⁾, 이에 이용되는 단백질 성분으로는 소혈청 알부민, 태아의 제대혈청, 혹은 산모의 혈청에서 부터 얻은 단백질이나 양수나 기타 체액으로부터 얻어질 수 있다. 본 실험은 시험관 아기 시술시에 사용되는 배양액에 태아 제대혈청을 첨가하여 사용하기 위해 배양액과 태아 제대혈청의 제조 과정 및 정도 관리 과정에 대하여 살펴보고 이에 대한 정도 관리기준을 설정하여 임상적 이용에 적정한지의 여부를 알아보기 위해 시행하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서 사용된 동물은 ICR계통의 생쥐로서 암컷은 생후 4~6주령, 수컷은 4~6개월령이었다.

2. 과배란 유도 및 2-세포기 배아의 회수

과배란 처리는 5IU의 임마혈청 성선자극호르몬(pregnant mare's serum gonadotropin, 이하 PMSG로 함함. Sigma No. G-4877)과 5IU의 임부용모성 성선

자극 호르몬(human chorionic gonadotropin, 이하 HCG로 약함. Sigma No. CG-2)을 48시간 간격으로 각각 복강내 주사하였다. 주사용 호르몬은 생리식염수에 희석하여 1ml(50 I.U)씩 1회용 주사기에 분주한 후 냉동실(-20°C)에 보존하여 사용하였다. HCG 주사후 즉시 암컷을 수컷 우리에 넣어 교배를 유도하였다.

후기 2-세포기 배아는 HCG 주사 48시간 후에 30게이지 주사침이 부착된 일회용 튜버클린 주사기로 난관을 관류하여 회수하였다. 현미경을 실제현미경을 이용하였으며, 배양의 회수액은 0.4% 소혈청 알부민(bovine serum albumin, 이하 BSA로 약함)이 첨가된 인산완충액(Dulbecco's phosphate buffered saline, 이하 d-PBS로 약함: Gibco Cat. No. 450-1300)을 이용하였다.

3. 배양액의 제조 과정

1) Ham's F-10 배양액의 제조과정

모든 용기는 배양액 제조 직전에 물로 2회 행군후 Volumetric flask에 물(약 600ml)을 붓고 Ham's F-10 분말을 넣어 자석교반기에서 서서히 용해시킨다. 100ml의 물에 2.1g의 sodium bicarbonate(Sigma, # S 5761)을 녹이고 다른 100ml의 물에 0.2452mg의 Calactate(Calbiochem. # 901244)를 넣어 자석교반기로 30분 이상 용해시키고, 또 다른 100ml의 물을 넣어 beaker에 각각 0.075g의 penicillin(Sigma, # PEN-NA)과 streptomycin(Sigma, # S-6501)을 넣고 잘 녹인다.

상기한 Sodium bicarbonate를 녹인 용액을 Ca-lactate를 용해시킨 용액에 혼합한 후 F-10용액에 조금씩 흔들면서 서서히 첨가한 후 물을 volumetric flask의 IL눈금까지 넣은 후 잘 섞고 삼투압을 측정한다. 최종삼투압을 280mOsm/kg으로 조정후 0.2μ millipore filter로 여과 후 4°C 냉장고에 보존한다.

2) m-KRB 배양액의 제조과정

모든 용기는 배양액 제조 직전에 물로 2번 행군다. Stock I 용액의 제조는 Beaker I에 40ml 정도의 물을 넣고 NaCl 663.8mg, KCl 43.2mg, KH₂PO₄ 19.4mg, MgSO₄ · 7H₂O 34.8mg을 넣어 자석교반기로 30분 이상 녹인다. Beaker I과 II의 용액을 섞은 후 phenol red 0.1mg을 넣고 100ml의 부피를 맞추후, 삼투압을 측정하여 230±5mOsm/kg이 되도록 보정하였다.

Stock II 용액의 제조는 40ml의 물을 넣고 $\text{NaHCO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 650.0mg을 용해시키고 phenol red 0.2mg을 넣은 후 50ml의 volumetric flask에 붓고 물을 첨가하여 50ml가 되게 한 후 이 용액의 삼투압을 측정하여 $270 \pm 5\text{mOsm/kg}$ 이 되도록 보정하였다.

Stock I 용액 83.35ml와 stock II 용액의 16.3ml를 혼합한 후 Glucose 100.0mg, streptomycin 5.0mg, Penicillin 7.5mg, Sodium-pyruvate 5.5mg, Sodium-lactate 0.2ml를 첨가한 후 서서히 용해하여 m-KRB 100 ml 용액의 삼투압을 측정하여 $270 \pm 10\text{mOsm/kg}$ 가 되도록 보정하였다.

4. 태아 제대혈청의 제조 과정

정상 분만시 태아 제대혈액을 일회용 주사기(50ml)에 채취하여 4°C 냉장고에서 약 24시간 보존하여 응고(clotting)시킨 다음 상층 부분을 분리하여 원심분리(1000 rpm, 30분)에 의해 혈청을 제조하였다.

혈청은 항온수조에서 비동화과정(56°C, 60분)을 거쳐 일회용 여과기(0.2 μm)에서 여과한 다음 -20°C 냉동실에 보존되었다. 냉동 보존시 생쥐 테스트용 혈청(0.5ml)은 별도로 2개씩 6ml cap tube에 보관하였다.

5. 배양액과 태아 제대혈청의 정도관리

1) m-KRB 배양액과 태아 제대혈청의 정도관리

ICR계 생쥐배아를 과배란 유도하여 체내 수정된 2-세포기를 얻었으며 이를 3차에 걸쳐 실험하였다. m-KRB 용액을 제조후 이 배양액에 0.3%의 BSA를 첨가하여 2-세포기의 부화 배반포로의 발생을 관찰하였으며, 평균 발생률을 관찰하였다. 본 실험실 m-KRB 배양액의 합격판정기준은 평균 75% 이상 부화 배반포로 발생이 되는 경우에 정도관리에 합격된 배양액으로 정하였다.

태아 제대혈청의 정도 관리시에는 이미 정도 관리된 m-KRB 배양액을 이용하였다. 대조군으로는 0.3%의 BSA가 첨가된 m-KRB를 이용하였으며, 처리군으로는 10%의 검사용 제대혈청을 m-KRB에 첨가한 후 2세포기 배아를 넣어 발생을 관찰 하였다.

2) Ham's F-10 배양액의 정도 관리

Ham's F-10 정도 관리시에는 본 실험실에서 제조한 후 정도관리에 의해 안정성이 이미 입증된 m-KRB에 0.3%의 BSA를 첨가하여 대조군으로 이용하였다.

첨가물없이 Ham's F-10 3ml을 2-well dish에 담은 후 2세포기배아를 넣어 발생 관찰 하였다.

6. 배아의 발생 관찰 및 판정

배아의 발생 관찰은 실체 현미경의 100 \times 하에서 실시하였으며 배양 96시간후의 부화배반포의 발생률에 초점을 맞추었다.

7. 통계학적 검정

통계적인 검정은 Percent test를 시행하여 검정하였다.

결 과

1. m-KRB 배양액과 태아 제대혈청의 정도관리

ICR계 생쥐배아를 과배란 유도하여 체내 수정된 2-세포기를 얻었으며 이를 3차에 걸쳐 실험하였다. m-KRB 배양액에 0.3%의 BSA를 첨가하여 2-세포기의 부화 배반포로의 발생을 관찰한 결과 각각 92.9%, 75.0%, 85.7%로 평균 84.5%의 발생률을 보였다(Table 1 참조). 본 실험실 m-KRB 배양액의 합격판정기준인 평균 75% 이상을 만족하여 본 실험에서 채택하였다.

이상과 같이 정도관리된 m-KRB 배양액에 0.3% BSA가 첨가된 용액을 대조군으로 하였으며, 10% 제대혈청을 m-KRB 배양액에 첨가후 2-세포기 배아의 부화 배반포로의 발생을 관찰 하였으며 5개의 제대 혈청을 검증한 결과 I, II제대 혈청은 발생률이 각각 83.3%, 100.0% 이었고, 나머지 III, IV, V 혈청은 발생률이 69.2%, 68.8%, 45.9% 이었다. 본 실험에서 대조군에서 86.2%의 부화 배반포로의 발생을 보였으며, I, II 태아 제대혈청은 83.3%, 100%의 부화배반포로의 발생률로서 대조군과 차이가 없어 적합한 혈청으로 판정하였다. 나머지 III, IV, V 태아 제대

Table 1. Development of two cell stage mouse embryos in m-KRB+BSA

	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Total
No of embryos	14	8	7	29
% of hatching-blastocyst	92.9	75.0	85.7	84.5

Table 2. Development of two cell stage mouse embryos in m-KRB+fetal cord serum

	Control	No. of serum				
		I	II	III	IV	V
No of embryos	29	12	12	13	16	11
% of hatching-blastocyst	86.2 ^a	83.3 ^{b1}	100 ^{b2}	69.2 ^{c1}	68.8 ^{c2}	45.9 ^{c3}
Result		A*	A	I**	I	I

(a ; b₁), (a ; b₂) : p>0.05, (a ; c₁) (a ; C₂), (a ; C₃) : p<0.05

A* : Adequate I** : Inadequate

Table 3. Development of two cell stage mouse embryos in Ham's F-10

	Control	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Total
No of embryos	25	8	10	7	25
% of hatching-blastocyst	84.4*	87.5	70.0	71.4	76.3*

* : p>0.05 : Not significant

혈청은 대조군과 비교시 부화 배반포로의 발생률이 의미있는 차이가 있어 부적합한 혈청으로 판정하였다 (Table 2 참조).

2. Ham's F-10 배양액의 정도 관리

정도 관리를 실시한 m-KRB+0.3% BSA 배양액을 대조군으로 하였으며, 다른 첨가를 하지않은 Ham's F-10을 이용하여 2-세포기 배아의 부화 배반포로의 발생을 관찰한 결과 각각 3차에 걸쳐 실시하여 87.5%, 70.0%, 71.4%로 평균 76.3%의 발생률을 보였다 (Table 3 참조). 대조군과의 발생률을 비교 검정결과 유의한 차이가 없었으며, 따라서 적합한 배양액으로 채택하였다.

3. 사람의 체외수정 및 배아이식 시술 결과

이상과 같이 정도관리 실시후 적합 판정을 받은 배양액과 I, II 태아 제대혈청을 시험관 아기 시술시에 사용하여 아래와 같은 결과를 얻었다 (Table 4 참조).

태아 제대혈청 I은 총 6례의 시험관 아기시술에 이용되었으며, 배아이식률은 83.3%였고, 배아 이식시의 평균 배아수는 3.5개로 적절하였으며, 임신률은 33.3%로 높은 임신률을 보였다.

태아 제대혈청 II의 경우도 총 3례의 시험관 아기 시술시에 이용되었으며, 배아 이식률은 66.7%였고, 배아 이식시의 평균 배아수도 3.4개였으며, 임신률 또한 33.3%로 높았다.

고 찰

시험관 아기 시술에서 체외 수정 및 체외 배양함에 있어서 외부에 노출된 생식세포의 손상을 방지하고

Table 4. The results of human in vitro fertilization program

	Serum I	Serum II
No. of cycles	6	3
No. of aspiratibn	6	3
Embryo transfer rate	83.3%	66.7%
No. of oocytes	37	18
Fertilization rate	45.2±33.0	23.8±41.2
Embryo/Embryos transfer	3.5± 3.1	3.4± 3.8
No. of Pregnancy	2	1
Preg. rate	33.3%	33.3%

체외배양 환경을 양호한 생리적 조건으로 유지시키기 위한 과정을 실시하여 시험관아기 시술의 실패를 방지하고 시술의 성공률을 증가시키게 되었다¹⁻³⁾. 특히 생식 세포의 배양액이 가장 중요한 부분을 차지하며, 배양액을 이루는 가장 기본적인 요소로는 물, 배양액, 단백질이 포함되며⁴⁾, 배양액 제조에 사용되는 물의 종류에 따라서 고순도의 물이 배아의 발달을 촉진시킨다는 여러가지 보고가 있다⁵⁻⁷⁾. 그러나 생식세포의 배양에 있어 중요한 요소로써 배양액의 종류 즉, 단순 배양액 혹은 복합 배양액인지에 따라 착상전의 초기 배자의 체외성장 및 발육에 영향을 받을뿐 아니라 배양액에서 에너지원으로 사용될수 있는 첨가제 즉 단백질 성분에 따라 착상전의 초기 배자의 체외 성장 및 발육에 많은 영향을 준다고 보고되고 있다⁸⁻¹⁴⁾.

이러한 단백질원으로 이용되는 첨가제는 소혈청 알부민, 환자의 배란전 혈청 혹은 태아 제대혈청등의 각종 혈청과 난포액이나 양수액등이 이용될수 있다¹⁵⁾. 환자 자신의 혈청을 이용하는 것은 면역반응이 억제되고 안전하다는 장점이있으나 과배란 유도를

함으로써 과도한 호르몬의 분비를 통한 태아에 유해한 물질이 혈액내에 존재할 수 있는 가능성 때문에 제대혈청을 이용하기도 한다¹⁶⁾. Leung 등의 보고에 의하면¹⁷⁾, 사람의 체외 수정시술시에 혈청 첨가에 대한 배아 발생의 효과를 살펴보았는데 제대혈청을 이용한 경우가 배란전 혈청을 이용한 경우에 임신률이 더 높았으며, 생쥐 배아의 발생률 또한 제대혈청에서 높았다고 보고하고 있다. 그러나 시험관아기 시술시의 임신률에 이들을 비교한 결과 차이가 없었다는 보고도 있다¹⁸⁾. 또한 소혈청 알부민을 첨가한 군과 제대혈청을 첨가한 군의 비교시에 제대혈청을 첨가한 군에서 소혈청 알부민을 이용한 군보다 생쥐 2세포기 배아의 발생률이 높았다는 보고도 있다¹⁹⁾. 그러나 이러한 혈청 첨가가 배아에 모두 유의한 영향만을 줄수 있다는 데 대해서는 많은 논란이 있다. Ogawa 등의 연구 결과에 의하면²⁰⁾, 생쥐 1세포기 배아의 체외배양시에 발생의 여러단계에 따라 처음에는 단백질이 없는 배양액에서 배양후 그 후 소혈청 알부민이 첨가된 배양으로 이동시켜 1-세포기 배아에 대한 단백질 첨가의 영향을 관찰하였다. 이때 태아제대 혈청이 첨가된 배양액에 옮겨졌을 때 성장률이 감소됨을 발견하였다. 이로부터 배양액에 첨가되는 단백질의 종류나 첨가시기에 따라 배아의 성장에 큰 영향을 미칠수 있으며, 특히 혈청내 성분에 배아의 체외배양시 독성 작용을 나타내는 물질이 존재한다고 보고하였다. 따라서 최근 이러한 혈청의 유해한 영향을 극복하고 또한 시험관아기시술의 단순화를 주장하여 상품화된 배양액의 사용이 강조되기도 한다. 배양액에 혈청의 첨가 효과로는 배양액내에 모든 종류의 지방 성분의 첨가 및 정자의 생존이나 capacitation을 증가 시키는 효과가 있다. 그러나 혈청의 첨가로 좋은 효과도 있지만 여러가지 단백질 분해 효소의 존재 가능성으로부터 배양액내에 여러가지 효소의 감소를 초래하여 배아의 성정 정지를 초래할 수 있다. 경증의 혹은 진단받진 않은 자궁 내막증환자의 혈청이 이용되는 경우 유해한 효과를 일으킬 것이며²¹⁾, 이러한 혈청이외에 다른 체액이 이용되는 경우 즉, 원임 불명의 불임환자의 복강내 체액이 이용되는 것도 같은 유해한 효과를 나타낼 것이다²²⁾. 본 연구 결과를 보면 단순 배양액에 0.3% 소혈청 알부민이 첨가된 배양액을 대조군으로 하여 단순배양액에 태아 제대혈청을 첨가한후의 부화 배반포로 발달되는 발생률을 비교시

유의한 차이가 없는 경우에 적합한 혈청으로 판정하여 시험관 아기시술시에 이용하였다.

Condon-Mahony 등의 보고에 의하면³⁾, 태아 제대혈청을 이용하는 판단 기준을 80% 이상의 배반포로 발달이된 혈청만을 시험관 아기시술에 이용하였다고 한다. 또한 대부분의 연구자들에 의하면, 2세포기 배아의 75% 이상을 평균 배반포나 부화 배반포로 발달시킨 혈청을 시험관아기 시술에 이용한다고 보고하고 있다²⁾²³⁻²⁵⁾. 본 연구 결과에서도 평균 80% 이상에서 부화 배반포로 발생이 되는 혈청만이 적합한 혈청으로 판정되는 결과를 얻었다. 따라서 시험관아기 시술시에 GnRH-agonist 및 성선 자극 호르몬을 이용하여 과배란 유도후 난자를 채취 하였으며, 이렇게 얻어진 난자를 위에서 검증된 적합한 혈청을 이용하여 시험관아기 시술을 실시한 결과, 시술의 수는 많지 않지만 평균 임신률이 33.3%라는 좋은 결과를 얻었다. 이러한 결과는 현재 국내의 임신률의 수준과 비교해 볼때 손색이 없는 높은 수치이다. 따라서 혈청의 유해한 효과에 대하여 이를 극복하기 위해서는 정확한 정도관리를 통해 이로부터 안전하다는 판정어 된 혈청을 이용하는 것이 가장 바람직할 것으로 사료된다. 그러나 이상과 같은 배양액이나 혈청의 제조 및 이를위한 정도관리 방법은 시간과 노력이 너무 많이 소요되므로, 따라서 좀더 단순하고 효과적인 방법의 개발이 필요한 것으로 사료된다.

결 론

본 이화여자 대학병원 산부인과 시험관아기 크리닉에서 시험관아기의 시술시 이용되는 배양액과 태아의 제대혈청의 제조, 정도관리 및 그의 임상적 이용에 대하여 살펴본 결과 아래의 결과를 얻었다.

1) ICR계 생쥐배아를 과배란 유도하여 얻은 체내 수정된 2-세포기를 이용하여 m-KRB 배양액에 0.3%의 BSA를 첨가하여 2-세포기의 부화 배반포로의 발생을 3차에 걸쳐 관찰한 결과 평균 84.5%의 발생률을 보여 적합한 배양액으로 판정하였다. 이상의 정도관리된 m-KBB 배양액에 10%의 태아 제대혈청을 첨가하여 2-세포기 배양의 부화 배반포로의 발생을 관찰 결과 대조군과의 발생률 비교시 유의한 차이가 없는 혈청군을 적합한 혈청으로 판정하였다.

2) 다른 첨가를 하지 않은 Ham's F-10을 이용하여

2-세포기 배아의 부화 배반포로의 발생을 관찰한 결과 각각 3차에 걸쳐 실시하여 76.3%의 발생률을 보여 대조군과 비교시 유의한 차이가 없어 적합한 배양액으로 판정하였다.

3) 배양액 및 제대 혈청의 정도관리 실시후 적합 판정을 받은 배양액과 태아 제대혈청을 시험관아기 기술시에 사용하여 33.3%의 높은 임신률을 보였다.

따라서 시험관아기 기술에 이용되는 배양액과 제대 혈청의 제조, 정도관리 및 임상적 이용에 대하여 살펴본 결과 철저한 정도관리를 실시하여, 배양액내의 유독한 성분에 대한 철저한 검증을 통해서야만 체외 수정 및 배아이식에서 좋은 성적을 얻을 것으로 사료된다. 그러나 이상과 같은 배양액이나 혈청의 제조 및 이를 위한 정도관리 방법은 시간과 노력이 너무 많이 소요되므로, 따라서 좀더 단순하고 효과적인 정도관리 방법의 개발이 필요한 것으로 사료된다.

References

- 1) 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
- 2) Quinn P, Warnes GH, Kerin JF, Kirby C : *Culture factors in relation to the success of human in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril* 1984 : 41 : 202
- 3) Condon-Mahony 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 material with a mouse in vivo fertilization system. Fertil Steril* 1985 : 44 : 521
- 4) 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
- 5) Fukuda A, Noda Y, Tsukui S, Matsumoto H, Yano J, Mori T : *Influences of water quality on in vitro fertilization and embryo development for the mouse. J Vitro Fert Transfer* 1987 : 4 : 40
- 6) Yovich JL, Edirisinghe W, Yovich JM, Stanger J, Matson P : *Methods of water purification for the preparation of culture media in an IVF-ET programme. Hum Reprod* 1988 : 3 : 245
- 7) Gorill MJ, Rinehart JS, Tamhane AC, 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
- 8) Kane MT, Heaton DR : *The role of commercial bovine serum albumin preparations in the culture of one-cell rabbit embryos to blastocysts. J Reprod Fertil* 1980 : 60 : 469
- 9) Kane MT : *A low molecular weight extract of bovine serum albumin stimulates rabbit blastocyst cell division and expansion in vitro. J Reprod Fertil* 1985 : 73 : 147
- 10) Brinster RL : *Effect of glutathione on the development of two-cell mouse embryo in vitro. J Reprod Fertil* 1968 : 17 : 521
- 11) Cholewa J, Whitten WK : *Development of 2-cell mouse embryos in the absence of a fixed nitrogen source. J Reprod Fertil* 1970 : 22 : 553
- 12) Kuzan FB, Pomeroy KO, Seidel GE : *Polyvinyl alcohol as a macro-molecular substitute for bovine serum albumin in mouse embryo culture medium. Biol Reprod* 1982 : 26 : 65
- 13) 손영수 : 생쥐 1-세포기 배아의 체외성장에 미치는 Albumin의 영향. *이화의대지* 1992 : 15(4) : 375
- 14) Spindle AI, Pederson RA : *Hatchment and outgrowth of mouse blastocysts in vitro : fixed nitrogen requirements. J Exp Zool* 1973 : 186 : 305
- 15) Gianaroli L, Seracchioli B, Ferraretti AP, Trounson A, Flamigi C and Bovicelli L : *The successful use of human amniotic fluid for mouse embryo culture and human in vitro fertilization, embryo culture and transfer. Fertil Steril* 1986 : 46(5) : 906
- 16) Schiewe MC, Schmidt PM, Buch M and Wildt DE : *Toxicity potential of absorbed retained ethylene oxide residues in culture dishes on embryo development in vitro. J. Animal Sci.* 1985 : 60(6) : 1610
- 17) Leung PCS, Gronow MJ, Kellow GN, Lopata A, Speris AL, McBain JC, du Plessis YP and Johnston I : *Serum Supplement in human in vitro fertilization of embryo development. Fertil Steril* 1984 : 41 : 36
- 18) Ball GD, Coulam CB, Field CS, Harmas RW, Thie JT and Byers AP : *Effects of serum source on human fertilization and embryonic growth parameters in vitro. Fertil Steril* 1985 : 44(1) : 75
- 19) Caro CM and Trounson A : *The effect of protein on preimplantation mouse embryo development in vitro. J In vitro Fertil Embryo Transfer* 1988 : 1 : 183
- 20) Ogawa T and Marrs RP : *The effect of protein supple-*

- mentation on single-cell mouse embryos in vitro. *Fertil Steril* 1987 : 47(1) : 156
- 21) Damewood MD, Hesla JS, Schlaff WD, Hubbard M, Geachart JD, Rock JA : *Effect of serum from patients with minimal to mild endometriosis on mouse embryo development in vitro.* *Fertil Steril* 1990 : 54 : 917
- 22) Wittermer C, Menard A, Dellenbach P : *Peritoneal fluid and infertility : A comparison of in vitro fertilization of oocytes in peritoneal fluid and B₂-Menezo medium.* *Human Reproduction* 1990 : 5 : 955
- 23) Johnston DP, Lopata A, Speirs A, Hoult I, Kellow G, du Plessis Y : *In vitro fertilization : the challenge of the eighties.* *Fertil Steril* 1981 : 36 : 699
- 24) Naz RK, Janousek JT, Moody T, Stillman RJ : *Factors influencing murine embryo bioassay : effects of proteins, aging of medium and surgical glove coatings.* *Fertil Steril* 1986 : 46 : 914
- 25) Trounson A, Conti A : *Research in human in-vitro fertilization and embryo transfer.* *Br Med J* 1984 : 285 : 224