

체외수정시술주기에서 배아와 난구세포의 공배양 효과에 관한 연구

단국대학교 의과대학 산부인과학교실

허 의 종 · 이 원 기

Effect of Coculture System with Autologous Cumulus Cells on Embryo Quality and Pregnancy Rates

Eui Jong Hur and Won Ki Lee

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Dankook University, Korea

= Abstract =

Despite the rapid development of assisted reproductive technologies (ART) in recent years, implantation rates after replacement of embryos into the uterine cavity remains low. Several techniques such as culture conditions based on formulations of human tubal fluid and various ART techniques as GIFT, ZIFT, TET have been adopted in recent years to improve embryo viability in vitro and implantation rates. Also, coculture of human IVF-derived embryos have been used in an effort to increase the number of viable embryos following IVF and to improve synchrony between the developing embryo and the uterine environment.

The aim of this study was to evaluate whether the use of coculture with autologous cumulus cells has a significant beneficial effect on the development of embryos in vitro and its relation to the pregnancy rates in 120 patients with previous failed IVF-ET from September, 1995 to January 1998.

We obtained the results from which significant improvement in the quality of viable embryos were observed using a coculture system with autologous cumulus cells, but pregnancy rates in this group of patients did not differ from the rate in the standard IVF group during the same period.

Our study shows that a simplified short-term coculture system with autologous cumulus cells may help rescue moderate quality embryos to cleave regularly.

Key Words: Failed IVF-ET, Coculture, Cumulus cells, Embryo quality, Pregnancy rates

서 론

보조생식술에 있어서 과배란방법이나 배양조건의 발전에 의해 체외수정율은 최고 90% 이상으로 높아졌으나 배아착상율은 15% 이하로 여전히 낮다. 배아착상율이 수정율에 비해 현저히 낮은 이유는 크게 3가지로 요약할 수 있다. 첫째, 형태상 정상으로 보이는 수정란 혹은 배아 중에도

일부는 염색체 이상을 동반하며 둘째, 배아이식 과정에서 일부는 손상을 입거나 유해물질에 노출되어 착상에 도달하지 못하고 도중에 퇴화되며 셋째, 이러한 문제점을 극복한 경우에도 이식된 배아의 발달단계와 자궁내막의 수용성이 일치되지 않아 착상이 실패되기 때문이다. 따라서 이식술기의 유연화와 함께 기존의 배양법을 개량하여 많은 수의 건강한 배아를 얻을 수 있다면, 이들을 적절한 시기에 이식함으로써 착상율과 임신율을

높일 수 있을 것으로 생각된다.

공배양 효과는 아직 논란의 대상이지만, 유전적 결함이 있는 배아의 성장을 억제하는 반면에 정상적인 활성 배아의 수를 증가시키며, 최고 양질의 배아를 선택하는데 소요되는 배양 시간을 임의로 연장할 수 있는 장점이 있기 때문에 착상율과 임신율을 향상시킬 수 있는 좋은 방안이 될 수 있다 (Thibodeaux & Godke, 1995).

저자들은 이러한 점에 착안하여 첫 체외수정시술에서 임신에 실패한 환자들을 대상으로 공배양 효과를 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1995년 9월부터 1998년 1월까지 단국대학교 산부인과 불임클리닉을 방문하여 처음으로 체외수정 및 자궁내 배아이식술을 시행한 환자중에서 클로미펜부하검사상에서 정상이었으나, 임신에 실패한 120명을 임의로 선택하였다. 이들 환자들은 모두 6개월내에 다시 체외수정시술을 시행하여 60명에서 얻은 수정란은 통상적인 배아 배양법을 적용하여 대조군으로 삼았으며, 나머지 60명에서 얻은 수정란은 난구세포와 공배양하여 실험군으로 삼았다. 양군의 환자 나이는 32.1 ± 4.8 세와 32.5 ± 4.7 세 이었으며, 불임 원인은 각각 난관 폐쇄가 27명과 29명, 만성무배란이 9명과 11명, 난관수종이 3명과 1명, 자궁내막증이 4명과 1명, 원인미상이 17명과 18명으로 유의한 차이는 없었다 (Table 1).

2. 연구방법

1) 과배란유도

모든 환자에서 GnRH-a 장기투여법을 사용하여 과배란유도하였다. 월경 20~22일부터 Nafarelin acetate (Synarel[®], Syndex, Swiss)를 200mcg씩 하루에 4번 코에 분무하였으며 월경이 재개되면 월경 2일째부터 hCG 주사당일까지 하루에 3번 분무하였다. 월경 2일째와 3일째에 FSH (Metrodin[®], Serono, Swiss)와 hMG (Merionol[®], Serpentam, Swiss)를 150IU씩 근육주사하였으며 월경 4일째부터 hCG 주사 전날까지 hMG 225IU를 매일 근육주사하였다. 직경 16mm 이상의 우성난포가 2개 이상 관찰되면 hCG (Profasi[®], Serono, Swiss) 10,000IU를 근육주사한 후 34~36시간 사이에 난자를 채취하

Table 1. Age and causes of infertility

	Conventional Culture Group	Cumulus cells Coculture Group
Patients (No.)	60	60
Age (years)*	32.1 ± 4.8	32.5 ± 4.7
Ex. of Infertility (No.)**		
BTO	27 (45%)	29 (48%)
Chronic anovulation	9 (15%)	11 (18%)
Hydrosalpinx	3 (5%)	1 (2%)
Endometriosis	4 (7%)	1 (2%)
Unexplained	17 (28%)	18 (30%)

*Values are Mean \pm S.D., t-test, not significant

** χ^2 -test, not significant

였다.

2) 수정란과 난구세포의 공배양

본 연구에서는 Ham's F-10과 TCM-199를 기본 배지액으로, 제대혈청을 단백질원으로 사용하였다. 수정배지액내에서 난자와 정자를 체외수정시키는 시점부터 난구세포가 배양접시에 활착되기 시작하며, 18~20시간 후 수정을 확인할 때에는 난구세포가 배양접시에 부착되어 마치 작은 응기 모양을 형성한다. 파스테르 피펫으로 난구세포로 둘러싸여 있는 난자를 분리하여 수정을 확인한 후 임의로 선택한 60명의 환자에서 얻은 수정란은 통상적인 방법대로 단독으로 성장배지액에 배양하였으며, 나머지 60명의 환자에서 얻은 수정란은 배양접시에 활착된 난구세포와 함께 공배양하였다. 난구세포가 활착된 배양접시를 성장배지액으로 가볍게 2~3차례 세척하여 죽은 난구세포와 정자 찌꺼기, 적혈구 등의 노폐물을 제거한 후 형태학적으로 가장 양호한 난구세포만을 선택하여 공배양에 사용하였다.

3) 수정란의 등급 및 임신율 비교

이후 수정란이 4~8세포기에 도달하면 할구의 균등 여부, 할구파편의 존재 유무와 정도에 따라 배아의 등급을 평가 (Erenus *et al.*, 1991)한 후 1, 2등급만 선택적으로 자궁에 이식하였다. 세포질과 핵의 파편없이 할구의 모양과 크기가 둥글고 일정하면 1등급, 세포질과 핵의 파편은 없으나 할구의 모양과 크기가 일정하지 않으면 2등급, 할구의 모양에 상관없이 세포질 혹은 핵의 파편이

Table 2. Clinical characteristics*

	Conventional Culture Group	Cumulus cells Coculture Group
Ampules of gonadotropin (75IU)	29.7±4.3	30.1±4.5
Days of hCG administered	10.1±1.5	10.2±1.8
Basal hormonal levels		
LH (mIU/mL)	3.5±3.1	3.3±3.0
FSH (mIU/mL)	6.7±1.5	6.2±1.8
E ₂ (pg/mL)	28.8±19.2	24.1±20.4
Hormonal levels on hCG day		
LH (mIU/mL)	1.3±0.9	1.5±0.9
E ₂ (pg/mL)	1847±1706	1901±1754
P ₄ (ng/mL)	0.9±0.8	0.9±0.8

*Values are Mean±S.D., t-test, not significant

관찰되면 3등급으로 분류하였다. 배아이식후 배양접시에 남겨진 공배양한 난구세포의 경우 모두 0.4% trypan blue를 사용하여 활성검사를 시행하였는데 난구세포의 생존율은 모두 80% 이상이었다. 배아이식후 12일째의 혈청 β-hCG검사에서 화학적 임신 여부를 확인한 후, 4~5주사이에 시행한 초음파검사서 임신낭과 태아심음이 관찰되면 임신으로 판정하였다.

4) 통계 분석

통상적인 배아배양법을 시행한 대조군과 배아와 난구세포를 공배양한 실험군의 임상 결과를 SPSS 통계 프로그램을 사용하여 t-test와 χ²-test로 분석, 비교하였다.

결 과

1. 과배란주기의 호르몬 농도

과배란주기 1~3개월전에 시행한 월경 2~3일째의 기초호르몬검사에서 LH, FSH, E₂ 농도는 대조군이 3.5±3.1mIU/mL, 6.7±1.5mIU/mL, 28.8±19.2pg/mL이었으며 실험군은 3.3±3.0mIU/mL, 6.2±1.8mIU/mL, 24.1±20.4pg/mL로 양군간에 유의한 차이는 없었다. 또한 체외수정주기의 hCG 투여일의 LH, E₂, P₄ 농도는 대조군이 1.3±0.9mIU/mL, 1847±1706pg/mL, 0.9±0.8ng/mL이었으며 실험군은 1.5±0.9mIU/mL, 1901±1754pg/mL, 0.9±0.8ng/mL으로 유의한 차이가 없었다 (Table 2).

2. 배아의 등급과 임신율

채취난자수, 전체수정수, 전체수정율, 정상수정수, 그리고 정상수정율은 대조군이 9.1±6.1개, 7.0±5.2개, 76±25%, 6.0±3.9개, 63±26%이었으며 실험군은 8.8±4.7개, 6.6±4.7개, 76±24%, 6.3±3.2개, 69±25%으로 양군간에 유의한 차이가 없었다.

이식직전의 배아의 질을 살펴보면, 1, 2등급의 비율은 대조군이 73±32%이고 실험군이 76±20%로 차이가 없었으나 1등급의 비율은 대조군이 36±39%인 반면에 실험군은 54±33%로 유의하게 증가되었다 (p<0.01).

그러나 임신율은 양군이 각각 16.7% (10명)와 20.0% (12명)로 유의한 차이가 없었다 (Table 3).

고 찰

체외수정기술의 결과를 좌우하는 중요한 변수 중 하나인 배양조건을 향상시킬 목적으로 공배양 효과에 관한 동물실험 (Gandolfi & Moor, 1987; Pexroad & Powell, 1988)은 일찍부터 이루어져 왔으나 인간에 적용된 것은 최근의 일이다. 1989년 Bongso 등이 인간의 팽대부 난관세포를 이용한 공배양으로 배아의 질을 향상시킬 수 있다고 보고한 것이 인간에 적용된 최초의 임상 결과라고 할 수 있다. 이후 Plachot 등 (1993), Mansour 등

Table 3. The effect of coculture on embryo quality in patients with previous failed IVF*

	Conventional Culture Group	Cumulus cells Coculture Group	p value
Eggs retrieved (No.)	9.1±6.1	8.8±4.7	NS
Total fertilized eggs (No.)	7.0±5.2	6.6±4.7	NS
Total fertilization rate (%)	76±25	76±24	NS
Normal fertilized eggs (No.)	6.0±3.9	6.3±3.2	NS
Normal fertilization rate (%)	63±26	69±25	NS
Embryo quality (%)			
Grade 1	36±39	54±33	p<0.01
Grade 2	37±33	22±27	p<0.01
Grade 1+2	73±32	76±20	NS
Grade 3	27±28	24±17	NS
Embryos transfered (No.)	3.6±2.1	4.1±2.0	NS
Clinical pregnancy rate (%)**	16.7	20.0	NS

*Values are Mean±S.D., t-test, ** χ^2 -test, NS: not significant

(1994), Yeung 등 (1996), Guerin 등 (1997)이 난포 과립막세포, 난구세포, 난관세포, 그리고 Vero 세포를 이용한 공배양 효과에 관한 연구에서 모두 공배양이 배아의 질, 착상율, 그리고 임신율을 유의하게 증가시킨다고 하였다. 공배양의 가장 뚜렷한 효과는 첫째, 배지내 유해한 성분의 제거, 항산화작용, 그리고 특이적, 비특이적 성장인자의 분비에 의한 배아의 정상 발달의 촉진과 둘째, 유전적 결함이 있는 배아의 발달 억제이다. 그리고 부수적인 효과로서 냉동배아를 해동할 때 회복과, 미세수정이나 유전자검사를 위한 시술에서 부분 손상된 배아의 세포질과 원형질막의 복구를 도와줄 수 있으며 질이 약간 떨어지는 배아를 자극하여 양질의 배아로 전환시킬 수 있는 것으로 생각된다 (Thibodeaux & Godke, 1995; Dirnfeld *et al.*, 1997).

생체내 수정란의 발달과정에서 난관은 매우 중요한 역할을 한다. 체외배양에서 수정란의 17~25%만이 낭배기 배아로 발달하는 반면에 난관내에서는 거의 모든 수정란이 낭배기 배아로 발달한다. 즉, 난관세포는 배아 발달에 필요한 포도당과 단백질원만 제공하는 것이 아니라 배아 발달에 꼭 필요한 어떤 유기적 작용을 제공할 것으로 추정된다. 따라서 동물이나 인간에서 특히 난관세포와의 공배양이 주목받아 왔다. Bongso 등

(1992)은 난관세포와 공배양한 배아를 이식하였을 때 시술주기당 임신율이 무려 44%라고 보고하였으며 Yeung 등 (1996)은 공배양한 실험군이 공배양하지 않은 대조군보다 이식주기당 임신율이 6.5% 높았다고 보고하였다. 이와같이 난관세포와의 공배양은 탁월한 효과가 있는 것으로 생각되지만, 난관세포를 채취하기 위해서는 적어도 한번 이상의 복강경시술이 필요하며 실혹 난관세포를 충분히 채취하였다고 해도 세균 감염이나 오염으로 부터 안전하다고 할 수 없기 때문에 실제 임상에서 채택하기는 매우 어렵다.

따라서 임상에 적합한 공배양 세포는 감염이나 오염에 노출되지 않아야 하며 쉽게 구할 수 있어야 한다. 이에 부합하는 세포로서 먼저 Vero 세포를 생각할 수 있다. 아프리카 녹색 원숭이의 신장 상피세포에서 유래하는 Vero 세포는 표준세포주가 있어 쉽게 구할 수 있으며, Guerin 등 (1997)과 변혜경 등 (1997)의 연구처럼 낭배기 배아의 발생율을 높일 뿐만 아니라 착상율과 임신율을 증가시키는 효과가 알려져 있다. 그러나, Vero 세포는 이종세포이며 생체 배양 조건과도 일치하지 않으므로 아직 논란의 대상이 된다. 반면에 환자 자신의 난구세포 (Mansour *et al.*, 1994; Saito *et al.*, 1994; Quinn P & Margalit R, 1996)나 난포과립막 세포 (Plachot *et al.*, 1993; Dirnfeld *et al.*, 1997)를

이용한 공배양은 위에 언급한 조건을 모두 만족시킬 수 있으므로 임상에 가장 부합된다고 할 수 있다.

이와 같이 최근의 연구 결과를 보면, 공배양의 효과가 매우 뚜렷하며 특히 자가세포를 이용한 공배양은 윤리적으로, 생물학적으로 문제가 없는 것으로 판단되어 본 연구를 시행하였다.

본 연구 결과를 살펴보면, 공배양이 1등급 배아 형성에 중요한 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 통상적인 배양법과 비교했을 때, 1~2등급의 비율은 공배양군이 $76 \pm 20\%$ 로 대조군의 $73 \pm 32\%$ 와 비슷하였으나 1등급만의 비율은 공배양군이 $54 \pm 33\%$ 로 대조군의 $36 \pm 39\%$ 보다 유의하게 높았다 ($p < 0.01$). 즉, 공배양이 원형질막의 손상을 복구하거나 배지내에 포함되어 있을 지도 모르는 잠재적 유해 인자를 제거하여 2등급으로 진행될 배아를 1등급으로 발달하도록 도와준다 (Thibodeaux & Godke, 1995)는 주장이 부분적으로 증명된다고 할 수 있다. 그러나 공배양군의 임신율은 20.0%로서 대조군의 16.7%에 비해 유의하게 높지 않았기 때문에, 자가 난구세포와의 공배양이 임신율에 미치는 효과를 입증할 수 없었다.

Bongso 등 (1992)의 보고처럼 난관세포를 이용한 공배양이 획기적으로 임신율을 높일 수 있다는 사실과 인간의 난관액과 비슷한 조성의 배지액을 사용한 배양법 (이석원, 윤산현, 윤혜균, 조현진, 허용수, 윤혜진, 박세필, 이원돈, 임진호, 1998)에서도 높은 임신율에 도달할 수 있다는 연구 결과를 생각해 볼 때, 체외배양조건을 체내 난관조건과 일치시킬수록 임신율을 높일 수 있다는 것은 주지의 사실이다. 따라서 난관세포이외의 다른 세포와의 공배양 효과에 관해서는 보다 심층적인 연구를 통해 평가되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

단국대학교 산부인과 불임클리닉에서는 1995년 9월부터 1998년 1월까지 첫 체외수정시술에서 임신에 실패한 120명을 임의로 선택한 후 다음 체외수정시술주기에서 60명은 통상적인 배아배양법을, 다른 60명은 자가 난구세포와의 공배양법을 적용하여 배아의 질과 임신율을 비교한 전향적 연구에서 자가 난구세포와의 공배양은 2등급 배아를 1등급으로 발달하도록 도와주나, 임신율

에 대한 효과는 뚜렷하지 않다는 결론을 얻었다.

인 용 문 헌

- 이석원, 윤산현, 윤혜균, 조현진, 허용수, 윤혜진, 박세필, 이원돈, 임진호: IVF-ET program에서 blastocyst 배아의 발생에 관한 연구. II. 난구세포 공동배양에 의한 Blastocyst 배아의 발생. 대한불임회지 1998, 25, 35-41.
- 변혜경, 염혜원, 궁미경, 손일표, 강인수, 이호준: 사람의 체외수정시술시 저적응 예후를 보이는 환자에서 공동배양술의 효용성에 관한 연구. 대한불임회지 1997, 24, 211-216.
- Bongso A, Ng SC, Sathanathan H, Ng PL, Rauff M, Ratnam SS: Improved quality of human embryos when cocultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 1989, 4, 706-713.
- Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisinghe R, Ratnam S: Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture. *Fertil Steril* 1992, 58, 569-574.
- Dirnfeld M, Goldman S, Gonen Y, Koifman M, Calderon I, Abramovici H: A simplified coculture system with luteinized granulosa cells improves embryo quality and implantation rates: a controlled study. *Fertil Steril* 1997, 67, 120-122.
- Erenus M, Souves C, Rajamahendran P, Leung S, Fluker M, Gomel V: The effect of embryo quality on subsequent pregnancy rates after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1991, 56, 707-710.
- Gandolfi F, Moor RM: Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* 1987, 81, 23-28.
- Guerin JF, Nicollet B: Interest of co-cultures for embryos obtained by in-vitro fertilization: a French collaborative study. *Hum Reprod* 1997, 12, 1043-1046.
- Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Abbass AM: Co-culture of human pronucleate oocytes with their cumulus cells. *Hum Reprod* 1994, 9, 1727-1729.
- Pexroad CD Jr, Powell A: Coculture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblast vehicles.

Theriogenology 1988, 29, 387-397.

Quinn P, Margalit R: Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *J Assist Reprod Genet* 1996, 13, 9-14.

Thibodeaux JK, Godke RA: Clinical assisted reproduction: Potential use of embryo coculture with human in vitro fertilization procedures. *J Assist Reprod Genet* 1995, 12, 665-677.

Plachot M, Antoine JM, Alvarez S, Firmin C, Pfister A, Mandelbaum J, Junca AM, Salat-Baroux J:

Granulosa cells improve human embryo development in vitro. *Hum Reprod* 1993, 8, 2133-2140.

Saito H, Hirayama T, Koike K, Saito T, Nohara M, Hiroi M: Cumulus mass maintains embryo quality. *Fertil Steril* 1994, 62, 555-558.

Yeung WSB, Lau EYL, Chan STH, Ho PC: Coculture with homologous oviductal cells improved the implantation of human embryos - a prospective randomized control trial. *J Assist Reprod Genet* 1996, 13, 762-767.