

체외수정술에서 난자의 공배양 시점에 따른 배아 발생능력의 비교

경북대학교 산부인과학교실¹, 대구대학교 축산학과²

이현정¹ · 박기상^{1,2} · 송해범² · 이택후¹ · 조영래¹ · 전상식¹

Comparison of Embryonic Developmental Capacity by different Co-culture Time of Oocytes in IVF-ET Cycles

Hyun Jung Lee¹, Kee Sang Park^{1,2}, Hai Bum Song², Taek Hoo Lee¹,
Young Lae Cho¹, Sang Sik Chun¹

¹Department of Obstetrics/Gynecology, Kyungpook National University Hospital

²Department of Animal Science, Taegu University

Objective: To evaluate whether co-culture of oocytes on vero cell monolayers from Day 0 (Day 0 group) after egg retrieval results in an increase in developmental capacity such as fertilization rate, embryo quality, blastulation and clinical pregnancy rate compared with co-culture of oocytes from Day 1 (Day 1 group).

Methods: Sperms were treated with Hams F-10 supplemented with 10% human follicular fluid (hFF). Vero cells for co-culture were prepared in TCM-199 with 10% FBS. Oocytes were co-cultured from Day 0 and fertilized oocytes were co-cultured from Day 1 on vero cell monolayers in DMEM with 10% and 20% hFF, respectively after egg retrieval. On day 1, 2 and 5, fertilization rate and grade of embryos and blastocysts were evaluated. Results (fertilization rate, cleavage rate, grade of embryos and blastocysts and pregnancy rate) were considered statistically significant when p value was less than 0.05 using *t*-test and χ^2 .

Results: In sibling oocytes of same cycles, no differences were found in fertilization rate (94.6 vs. 91.4%), cleavage rates (94.6 vs. 91.4%), embryo grade (on day 2 and 3) and blastulation (65.6 vs. 57.0%) and their grade. In different oocytes of different cycles (patients), no differences were found in fertilization (79.8 vs. 78.3%), cleavage rates (77.7 vs. 76.4%) and blastulation (56.0 vs. 45.3%), but pregnancy rate was higher in the Day 0 group than in the Day 1 group (60.0 vs. 42.9%).

Conclusions: This study revealed that the embryonic development capacities were not affected by the different co-culture time in the sibling oocytes of same cycles. Although no statistical significance, because of small size of study, there was a trend for higher pregnancy rates in Day 0 group compared to

주관책임자: 조영래, 우) 700-721 대구광역시 중구 삼덕동 2가 50 경북대학교병원 산부인과학교실
Tel: (053) 420-5733, Fax: (053) 420-5727

연락처: 박기상, 우) 700-412 대구광역시 중구 삼덕동 2가 50 경북대학교병원 산부인과학교실
Tel: (053) 420-5727, Fax: (053) 420-5727, e-mail: keespark

이 논문의 요지 중 일부는 2000. 10. 21-26. 미국 캘리포니아주 샌디에고에서 개최된 미국불임학회 56차 연차 총회 (56th Annual Meeting of the ASRM 2000)에서 발표되었음.

이 연구는 2000년도 경북대학교병원 의학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌음.

Day 1 group in different oocytes of different cycles.

Key Words: Co-culture of oocytes from day 0 or 1, Embryonic developmental capacities, Pregnancy rates

인간을 포함한 포유동물에서 배란된 난자는 여러 가지 환경에 노출된다. 난관 팽대부에서 수정이 이루어지고 난관을 통하여 자궁으로 들어가는 동안 줄곧 체세포에 둘러 쌓여 있게 되는 것처럼, 체외배양 과정에서도 체내와 비슷한 환경을 만들기 위하여 여러 가지 feeder cell을 이용하여 공배양을 실시하고 있다.¹⁻⁹

그러나 대부분의 경우에는 공배양하는 시점을 수정이 이루어지고 나서부터 실시하고 있지만, 채란된 난자가 하루 동안은 공배양을 실시하지 않음으로써 일어날 수 있는 체외수정, 차후의 배아 발달, 배아의 등급 및 임신율에 미칠 수 있는 효과에 대한 연구는 매우 제한적이다.

본 연구는 난자 채취 후 공배양을 실시하는 시점이 체외수정, 배아 발달을 및 배아 등급에 미치는 영향을 조사함으로써 체외수정기술에서 임신율을 향상시킬 수 있는 최적의 배양 조건을 알아보기 위하여 실시하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

불임을 주소로 내원한 환자 중에서 나이가 35세 이하인 여성(29주기)에서 실험 설계에 따라 배란포기까지 난자를 배양하여 나온 결과만을 대상으로 하여 배양방법에 따른 효과를 조사하였다.

2. 실험 설계

1) 실험군

공배양의 시점에 따른 배양방법이 난자의 발생능력에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 배란 당일 또는 수정이 이루어지고 나서부터 공배양을 실시하였다.

(1) Group 1

채란 당일 (Day 0)부터 난자를 vero cell과 공배양을 실시하여 배란포기까지 배양을 지속하였다.

(2) Group 2

채란 당일에는 공배양을 실시하지 않았다가, 채란

다음날인 Day 1부터 수정이 확인된 난자를 배란포기까지 공배양을 지속하였다.

2) 실험군에 따른 환자의 배치

(1) 동일 주기에서 실험 설계에 따른 난자 발생능력의 비교

10명의 환자 (나이: 평균 = 29.1 ± 3.36 , range = 24-34세)에서 채란한 난자 중에서 186개의 성숙 난자 (total = 200, Intermediate = 11, GV = 3, 평균 = 20, range = 14-29)를 대상으로 하였고, 각각의 환자에서 채란한 난자를 1/2로 나누어 아래에 열거한 방법에 따라 Group 1 (n = 93, 평균 = 9.3 ± 2.28 , range = 6-14) 또는 Group 2 (n = 93, 평균 = 9.3 ± 2.45 , range = 6-15)에 따라 배양하여 배양방법에 따른 난자 발생능력의 효과를 조사하였다. 같은 환자에서 나온 난자를 각각의 실험 방법에 따라 배양함으로써 개체간의 차이를 완전히 배제하였다.

(2) 실험 설계에 따라 배치한 환자간 임신율의 비교

19명의 환자 (Group 1: n = 5, 나이 - 평균 = 29.6 ± 2.06 , 27-33; Group 2: n = 14, 나이 - 평균 = 31.4 ± 3.18 , range = 24-35)를 대상으로 하였고, Group 1 (사용한 난자: n = 84, 평균 = 16.8 ± 8.98 , range = 7-31) 또는 Group 2 (사용한 난자: n = 203, 평균 = 14.5 ± 7.37 , range = 8-37)에 따라 각각의 환자에서 채란한 난자를 배양하여 이식하고 나서 임신율에 미치는 영향을 조사하였다.

3. 배양액의 준비

정자의 처리에 사용한 F-10 Nutrient Mixture Medium (Ham's F-10, 11550-043, Gibco, USA)은 1.2 g/l의 NaHCO_3 (S-5761, Sigma, USA)를 첨가하여 제조하였다. 난자의 수정과 배양에는 DMEM (11966-025, Gibco, USA)을 사용하였고, vero cell의 준비에는 TCM-199 (11150-059, Gibco, USA)을 이용하였다. 모든 배양액은 0.0063 g의 Streptomycin sulfate (S-9137, Sigma, USA)와 0.0069 g의 Penicillin-G (P-3032, Sigma, USA)를 첨가한 다음 삼투압 측정기 (Osmomat 030, Gonatec, Germany)를 이용하여 삼투압을 280 mOsm/kg으로 보정하고 나서 0.2 μm 의 여과기 (SLGV R25

LS, Millipore, France)로 채취하면서 14 ml tube (2001, Falcon, USA)에 분주한 다음 4℃를 유지하고 있는 냉장고 (Forma, 3682, USA)에서 보관하였다. 배양액은 95% 이상의 습도, 37℃ 및 5% CO₂를 유지하고 있는 배양기 (3154, Forma, USA)에서 6시간 이상 평형시킨 다음 이용하였다.

4. 난자의 준비

과배란은 gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH-a)를 장기요법으로 사용하였다. 즉 황체기 중기에서부터 900 µg buserelin (Hoechst, Germany)을 비강 분무 투여하여 뇌하수체를 억제시킨 후, 난포기 3~5일째부터 human menopausal gonadotropin (hMG, Pergonal, Serono, Italy 또는 IVF-M, LG, Korea)을 투여하였다. 질식 초음파를 이용한 난포의 반응에 따라 hMG의 투여량을 조절하여 난포의 직경이 17 mm 이상인 것이 2개 이상일 때 10,000 IU의 human chorionic gonadotropin (hCG, IVF-C, LG, Korea)을 투여하여 배란을 유도하였다.

hCG주사 34시간 후에 질식 초음파를 이용하여 난포를 흡입, 난자를 채취하였다.

채취한 난자는 37℃와 5% CO₂로 조절된 조작기 (IVF chamber, Hoffman, USA)내에서 해부현미경 (SMZ-10, Nikon, Japan)을 이용하여 난구세포의 특징과 세포질 내의 GV유무를 기준으로 난자의 성숙정도를 확인한 다음,¹⁰ 10% 난포액 (human follicular fluid, hFF)을 첨가한 DMEM이 들어 있는 배양접시 (3037, Falcon, USA)로 옮겨 수정시기까지 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 수정에 이용하는 난자는 배양접시 당 5개 이하가 되도록 조절하였다.

5. 난포액의 준비

난포액은 채취수정기술을 하고 있는 환자 중에서 성숙 난자를 갖고 있는 난포에서 회수한 난포액에 혈액이 거의 섞이지 않은 것을 회수하여 이용하였다. 회수한 난포액은 원심분리 (3,500 rpm)를 30분간 실시하여 상층액만을 회수한 후 0.2 µm의 여과기로 제균하고 56℃로 조절한 항온수조에서 35분간 불활성화시키고 나서 -20℃를 유지하고 있는 냉장고 (Forma, 3682, USA)에 보존하다가 용해하여 사용하였다. 용해 후 2일이 경과한 것은 실험에서 제외하였다.

6. 체외수정

정자는 난자를 채취하고 나서 수음으로 specimen container (Baxter, USA)에 정액을 회수하였다. 정자의 농도와 운동성은 WHO의 기준에 따라 측정하였다.¹¹ 정액을 실온에서 10~20분간 방치하여 액상화를 유도하였다. 액상화된 정액은 15 ml conical tube (2099, Falcon, USA)로 옮긴 다음, 10% 난포액이 첨가된 Ham's F-10으로 1,500 rpm에서 2회 (5분, 3분) 원심분리하였다. 원심분리 후 pellet을 제외한 상층액은 제거하고 pellet이 흩어지지 않게 1 ml의 Ham's F-10을 조심스럽게 첨가하여 1시간 동안 배양기 내에서 정자를 부유하였다. 부유된 정자는 5 ml tube (2003, Falcon, USA)에 보관하면서 수정에 이용하였다. 수정에 이용하는 정자는 2×10⁵마리가 되게 수정시기의 난자가 들어 있는 2 ml의 배양액 내로 주입하였다.

다음날 아침, 37℃와 5% CO₂로 조절된 조작기 내에 있는 해부현미경 하에서 syringe needle (320310, BD, USA)을 이용하여 난구세포를 제거하고 수정여부를 조사하였다. 자성전핵과 음성전핵이 형성되어 있고 두 개의 극체가 있는 것을 수정이 된 것으로 확인하였다.

7. Vero cell의 준비

Vero cell은 Ouhibi 등¹²의 방법에 따라 동결되어 있는 cell을 용해하여 2~3×10⁶ cell을 채취한 후 culture flask (3013, Falcon, USA)에서 4일 동안 (6~8×10⁶ cell) 배양하고, trypsin-EDTA (25300-054, Gibco, USA)를 처리하여 cell suspension을 유도하여 cell scraper (3010, Costar, USA)로 dish 바닥에서 떼어내고 900 rpm에서 30분간 원심분리하여 세척하고 나서 3개 정도로 나누었다. 이 중에서 한 개는 새로운 flask에서 배양을 하고, 하나는 freezing medium (Cell Culture Freezing Medium, 11101, Gibco, USA)으로 동결하고, 나머지 한 개는 배양접시에 monolayer를 형성하도록 2 ml의 배양액에 2×10⁵ cell의 농도로 조절하여 약 3일간 배양하였다. 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS, 26140-079, Gibco, USA)이 첨가된 TCM-199를 이용하였다. Vero cell의 동결과 용해도 Ouhibi 등¹²의 방법을 이용하였다.

8. Vero cell monolayer 상에서 수정란의 공배양

수정이 확인된 난자는 vero cell과 공배양을 실시하였다. 공배양 접시의 준비는 공배양을 실시하기 하루 전날 20% hFF가 첨가된 DMEM으로 교체하였으며, 2~3일 후에 이와 같은 방법으로 신선한 배양액을 교체하면서 이식 직전까지 배양하였다.

9. 수정란의 등급 판정

채란 후 2~3일에 실시한 2-8세포기에서 배아의 등급은 Veck¹⁰의 방법에 따라 형태학적 등급을 Grade 1 (G1), G2, G3, G4, G5로 나누어 판정하였다. G1은 할구의 크기가 균일하고 세포질 내에 fragmentation이 없는 것을, G2는 할구의 크기는 균일하지만 세포질 내에 약간의 fragmentation이 있는 것을, G3는 할구의 크기가 비균일하면서 약간의 fragmentation이 있는 것을, G4는 할구의 크기가 비균일하면서 fragmentation이 전체의 약 50% 정도를 차지하는 것을, G5는 정상적인 할구가 거의 보이지 않으면서 전체적으로 fragmentation이 된 것으로 하였다.

채란 후 5~7일에 실시한 배반포기 배아의 등급 (Blastocyst grade, BG)는 Dokras 등¹³의 방법에 따라, BG1은 early cavitation이 되고 나서 expanded cavity (ICM과 trophoctoderm layer로 구분되는)가 있는 것으로 하였다. BG2는 initial cavitation 후 1~2일 후에 BG1의 모양이 되는 것 ("late" 또는 "slow" developer)으로 하지만, initial cavitation 후 1~2일 간 배양을 하지 않고 5일 쯤에 바로 이식을 실시한 경우에는 초기 배반포기 배아 (early blastocyst)로 하였다. 그리고 BG3는 처음에 vacuole이 보이고 나서 degenerative foci가 보이는 것으로 하는데, vacuolated morula는 vacuole에 의해서 cavity로 보일 수도 있고, BG3는 ICM과 trophoctoderm이 잘 보이지 않기 때문에 초기 배반포기 배아와 구별하기 힘든 경우도 있다.

10. 배아 이식

배반포기에 도달한 배아 중에서 등급을 판정하여 가장 우수한 것만을 2~5개 선별하여 이식하였다. 이식에는 대부분의 경우 Tomcat catheter (8890-793021, Sherwoo, USA)를 이용하였지만, Tomcat catheter로 이식이 어려운 일부의 경우에서 Jansen-Anderson ca-

theter (Jansen-Anderson Bulb Tip Embryo Transfer catheter Set, K-JET-3200, Cook, Australia)를 이용하였다.

11. 황체호르몬의 투여 및 임신의 확인

배아 이식 후 매일 100 mg의 황체호르몬 (progesterone in oil, Progest, Samil, Korea)을 근육 주사하고 이식 후 10일경 혈중 β -hCG의 농도가 10 mIU/ml 이상 일 때 화학적 임신으로 정의하였다. 배아 이식 후 3주 경에 질식 초음파 검사에서 태낭이 확인되는 경우를 임상적 임신으로 정의하였다.

12. 통계분석

각각의 실험 설계에 따라 수정율을 비교한다. 수정이 확인된 수정란은 day 2까지 공배양을 지속하면서 배아의 발달단계와 등급을 각각 조사하였다. 결과에 대한 분석은 통계프로그램인 Microsoft Excel-97을 이용하였다. 평균에 대한 유의성은 *t*-test와 Chi-square (χ^2 -test)를 병용하여 실시하여 5% 유의수준에서 검정하였고, 표준 편차는 \pm SD으로 나타내었다.

결 과

난자를 회수한 당일 (Day 0)부터 공배양을 실시한 군 (Group 1)과 수정이 확인되고 나서부터 (Day 0) 공배양을 실시한 군 (Group 2)으로 나누어 체외수정, 배아 발달, 배반포기 배아의 출현율 및 임신율에 미치는 효과에 대한 결과는 Table 1과 2에 나타내었다.

1. 같은 환자에서 회수한 난자에서 발생능력의 비교

같은 환자에서 회수한 난자를 1/2로 나누어 Group 1 또는 2로 실험군을 나누어 난자의 발생능력에 미치는 영향을 조사하였으며, 결과는 Table 1에 나타내었다.

사용한 난자의 수 (평균)는 각각 93 (9.3 ± 2.28)개와 93 (9.3 ± 2.45)개였다.

Group 1과 2에서, 수정율 (94.6 vs. 91.4%, $p=0.3753$)과 2-세포기 이상의 배아 발달율 (94.6 vs. 91.4%, $p=0.3753$)에서 차이가 없었다. 배아의 등급은 day 2의 4-세포기 미만 (14.0 vs. 16.1%, $p=0.6817$)과 4세

Table 1. Developmental capacities of oocytes co-cultured from Day 0 or Day 1 in the sibling oocytes of same cycles

Variable	Co-cultured from	
	Day 0	Day 1
No. of cycles	10	
Age of female		
Mean±SD*	29.1±3.36	
Range	24-34	
No. of collected oocytes		
Metaphase II (MII)	186	
Intermediate	11	
Germinal vesicle	3	
Total	200	
Range	14-29	
No. of allocated MII oocytes	93	93
Mean±SD	9.3±2.28	9.3±2.45
Range	6-14	6-15
Fertilization rate per MII oocytes	88 (94.6)	85 (91.4)
Cleavage rate per MII oocytes	88 (94.6)	85 (91.4)
Embryo stage on day 2 and 3		
Day 2 < 4-cell	13 (14.0)	15 (16.1)
≥4-cell	75 (80.6)	70 (75.3)
Day 3 < 8-cell	19 (20.4)	17 (18.3)
≥8-cell	69 (74.2)	67 (72.0)
Blastocyst stage on Day 5-7		
Blastocyst grade 1 (BG1)	28 (30.1)	25 (26.9)
BG2	21 (22.6)	16 (17.2)
BG3	7 (7.5)	2 (2.2)
Early	5 (5.4)	8 (8.6)
Total	61 (65.6)	53 (57.0)

No significant difference between groups
*SD=standard deviation

포기 이상 (80.6 vs. 75.3%, p=0.3729) 그리고 day 3의 8-세포기 미만 (74.2 vs. 72.0%, p=0.7105)과 8-세포기 이상 (74.2 vs. 72.0%, p=0.7406)에서 차이가 나

Table 2. Clinical results of oocytes co-cultured from Day 0 or Day 1 in the different oocytes of different cycles (patients)

Variable	Co-cultured from	
	Day 0	Day 1
No. of cycles	5	14
Age of female		
Mean±SD*	29.6±2.06	31.4±4.18
Range	27-33	24-35
No. of allocated oocytes	84	203
Mean±SD	16.8±8.98	14.5±7.37
Range	7-31	8-37
Fertilization rate per MII oocytes	67 (79.8)	159 (78.3)
Cleavage rate per MII oocytes	65 (77.7)	155 (76.4)
No. (%) of blastocysts	47 (56.0)	92 (45.3)
No. of transferred blastocysts	14	48
Mean±SD	2.8±0.75	3.4±0.82
Range	2-4	2-5
Clinical pregnancy rate	3 (60)	6 (42.9)

No significant difference between groups
*SD=standard deviation

타나지 않았다. 배반포기 배아의 발생율을 살펴보면 BG1 (30.1 vs. 26.9%, p=0.6259), BG2 (22.6 vs. 17.2%, p=0.3581), BG3 (7.5 vs. 2.2, p=0.0874) 및 Early (5.4 vs. 8.6%, p=0.3882)에서 차이가 없었고 total blastulation (65.6 vs. 57.0%, p=0.2256)에서도 통계적인 차이가 나타나지 않았으나 Group 1에서 난자의 발생능력이 다소 높게 나타나는 경향을 나타내었다.

2. 다른 환자에서 회수한 난자의 발생능력과 임신율의 비교

각기 다른 환자에서 회수한 난자를 Group 1 (환자 수=5) 또는 Group 2 (환자수=14)로 실험군을 나누어 난자의 발생능력과 임신율에 미치는 영향을 조사하였으며, 결과는 Table 2에 나타내었다.

사용한 난자의 수 (평균)는 각각 84 (16.8±8.98)개와 203 (14.5±7.37)개였다.

Group 1과 2에서, 수정율 (79.8 vs. 78.3%, p=0.7835)

과 2-세포기 이상의 배아 발달을 (77.7 vs. 76.4%, $p=0.8503$)은 거의 유사하였다. 배반포기 배아의 발생율도 56.0%와 45.39%로 나타나 통계적인 유의차는 인정되지 않았으나, Group 1에서 다소 높은 경향이 있었다. 배양방법에 따라 각기 다르게 배양된 난자는 제 5일째에 배반포기에 도달한 배아를 Group 1 (2.8 ± 0.75 , 2-4)과 Group 2 (3.4 ± 0.82 , 2-5)에서 이식하여, Group 1에서는 5명의 환자에게 이식하여 3명 (60%)이 임신에 성공하였고 Group 2에서는 14명에게 이식하여 6명 (42.9%)이 임신에 성공하여, Group 1에서 임신율이 매우 높게 나타났다. 그러나 대상환자의 숫자가 부족하여 통계적인 유의차는 인정되지 않았다 ($p=0.4682$).

고 찰

체내에서 이루어지는 생식세포의 발생과정을 보면, 난자는 난관에서 수정이 이루어지고, 수정이 이루어지고 난 다음, 난관 내에서 배아 분할이 지속되다가 4-5일이 지나면 자궁강으로 들어가서 자궁벽에 착상을 하게 된다. 그러나 불임 부부에서는 이러한 현상이 일어나지 않게 되거나, 방해받게 되어 임신이 이루어지지 않거나 임신이 성립될 확률이 극히 희박하다.¹⁴ 이와 같은 원인으로 인한 불임을 치료하기 위해서 체외수정기술이 많이 이용되고 있지만, 임신율을 높일 수 있는 최적의 배양 조건 (환경)이 아직까지 구축되어 있지는 않아, 배아 이식한 환자의 임신율은 20% 내외이고 분만율은 20% 미만이다.¹⁵

체외에서 배양 시간이 증가하면 배아의 생존성이나 발생능력이 떨어져 세포발달 중지현상이 증가하기도 하여 임신율을 높이는데 나쁜 영향을 주고 있는데, 그 대표적인 원인 중의 하나는 부적절한 배양 조건이다. 그러나 IVF-ET에서 임신율을 증가시키기 위해서는 선결해야할 과제가 여러 가지가 있는데, (1) 배아의 체외배양에 사용하는 배양액, (2) 배아 발달에 필요한 첨가물질 (serum과 amino acids),¹⁶⁻¹⁸ (3) 표면장력을 감소시키고 free radical의 방출을 억제하는 혼합가스^{19,20} 그리고 (4) 자궁에 이식하는 배아의 단계²¹ 등이 맞지 않기 때문인 것에 초점이 맞춰지고 있으며, 여기에 대한 심도 있는 연구가 진행되고 있다.

IVF에서 임신율을 높이기 위한 한 가지 접근방법

은 배아 공배양 체계를 사용하는 것이다. 이것은 conventional IVF culture media를 사용할 때 관찰되는 배아발달 중지현상을 극복하는데 도움을 준다. 배아 공배양 체계는 체세포의 monolayer 상에서 배아를 체외배양하므로 난관과 동일한 환경을 만들어 주기 위한 시도이다. 생식세포를 배양할 때 사용하는 배양 방법 중에서 공배양이 미치는 일반적인 영향은 (1) 난자와 배아의 발달 (2) 미성숙 난자의 체외성숙, (3) 난자의 체외수정율을 높이기도 하지만 그다지 큰 효과가 없기도 하고, (4) 배아의 분할율을 높이기도 하지만 효과가 없기도 하고, (5) 배아의 외형적인 등급을 높이고 (6) 정자의 생존성, 활력 및 운동성을 증가시키는 인자를 분비하는 이점이 있다.¹⁴ 공배양에 사용되는 cell은 HeLa cells, 자궁상피세포 (uterine epithelial cells), 난관세포 (oviduct cells), 과립세포 (granulosa cells), 간세포 (hepatocytes), teratocarcinoma cells (생쥐, cow, goat, pig과 같은 여러 가지 포유동물에서 연구되고 있는), vero cells 등이 있다.^{2,3,7-9,22,33} 본 연구에서는 인간 난자를 배반포기까지 배양할 때 효과적으로 이용한 결과를 바탕으로 vero cell을 사용하였다.⁶⁻⁹

본 연구에서 난자의 수정과 배아 발달에 사용한 배양액인 DMEM과 배양액에 첨가한 난포액은 저자들이 이전에 실시한 실험 결과를 바탕으로 하였다. 인간 난자를 장기간 배양할 때 배양액으로 DMEM을 이용하여 배반포기 배아의 형성이 좋았는데 BG1의 출현율이 높게 나타났다. 배양액에 첨가하는 hFF의 농도는, 수정이 확인되기 전까지의 난자에서는 10%로, 수정란에서는 20%로 조절한 다음 배양하여 배아의 발달율과 차후의 발생능력을 높일 수 있었다.⁶⁻⁸

Table 1에서는 배양시기별 배아와 배반포기 배아의 등급에 미치는 영향을 자세하게 조사하여 제시하였으나, Table 2에서는 이를 자세하게 제시하지 않았는데, 이는 배양 조건에 따른 임신율의 양상을 나타내는 것에 초점을 맞추어서 본 연구 결과에서는 이를 제외하였다. 배반포기 배아의 발생율이 Table 1 (Group 1: 65.6%; Group 2: 57.0%)과 Table 2 (Group 1: 56.0%; Group 2: 45.3%)에서 차이가 있었는데, Table 1에서는 배양 조건에 따라 난자의 발생능력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 같은 환자에서 회수한 난

자 중에서 MII 상태인 성숙난자만을 대상으로 실시한 반면, Table 2에서는 각각의 환자에서 회수한 난자의 발생과 차후의 임신능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 회수한 난자 전부를 배양하였기 때문에 intermediate가 포함되어 있기 때문에 배반포기 배아의 발생율이 Table 1과 2에서 각기 다르게 나타났을 것이다 (GV는 결과에서 제외된 결과임). Table 2에서는 19명에게 배아 이식을 실시하여 9명에서 임신이 성립되었으나, 임신된 모든 환자에서는 3쌍둥이 이상의 다태임신은 나타나지 않았고, 유산은 발생하지 않았다. 임신이 성립된 group은 현재 모두 임신이 진행중으로 지속적인 추적을 실시하고 있다. 또한 배양 방법에 따른 난자의 발생능력은 실험군 간에 크게 차이가 나지 않았으나, 임신율에서는 Group 1에서 매우 높게 나타나서 (통계적인 유의차는 없음) 공배양의 시기에 따라 난자의 착상능력에 직·간접적인 영향을 주었을 것으로 생각되어, 여기에 대한 보다 깊이 있는 연구가 진행되어야 할 것이다.

결론적으로, 동일 환자로부터 회수한 난자를 day 0 또는 day 1부터 공배양을 실시하여 공배양 시점이 체외수정, 배아 발달율, 배반포기 배아의 출현율 및 배아의 등급에는 큰 차이를 나타내지는 않았으나, day 0부터 공배양을 실시하는 것이 배아 발달율을 다소 높일 수 있었다. 또한 환자 별로 회수한 난자를 각기 다르게 공배양 시점 (day 0 또는 day 1)을 적용하여 배반포기까지 배양하여 이식하였을 때, day 0부터 공배양을 실시하여 획득한 배반포기 배아를 이식함으로써 임신율을 향상시킬 수 있었다.

참 고 문헌

1. Bongso A, Ng SC, Sathanathan H, Ng PL, Rauff M, Tatnam SS. Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cell. *Hum Reprod* 1989; 4: 706-13.
2. Weimer KE, Cohen J, Amborski GF, et al. In vitro development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibroblast cells. *Hum Reprod* 1989; 4: 595-600.
3. Weimer KE, Cohen J, Wiker S, Malter H, Wright G, Godke RA. Coculture of human zygotes on fetal

- bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989; 52: 503-8.
4. Schillaci R, Ciriminna R, Cefalu E. Vero cell effect on in vitro human blastocyst development: preliminary results. *Hum Reprod* 1994; 9: 1131-5.
5. Turner K, Lenton EA. The influence of vero cell culture on human embryo development and chorionic gonadotrophin production in vitro. *Hum Reprod* 1996; 11: 1966-74.
6. Park KS, Choi IK, Lee JS, Song HB. The effects of glutamine on blastulation of human embryos on vero cells in vitro. *Kor J Fertil Steril* 1998; 25: 65-70.
7. Park KS, Song HB, Chun SS. Late fertilization of unfertilized human oocytes in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles: conventional insemination versus ICSI. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 419-24.
8. Park KS, Lee TH, Choi IK, Song HB, Chun SS. Comparison of blastulation and pregnancy rates of fertilized human oocytes obtained after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *J Mamm Ova Res* 2000; 17: 51-7.
9. Chun SS, Park KS. Birth of a healthy infant after in vitro fertilization and embryo transfer in patient of total uterine prolapse. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 346-8.
10. Veeck LL. Preembryo grading: In Atlas of the human oocyte and early conceptus. Vol 2, Baltimore, Williams and Wilkins, 121-49.
11. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction. 3rd ed., Cambridge, Cambridge University Press. 1992.
12. Ouhibi N, Menezo Y, Benet G, Nocollet B. Cultured of epithelial cells derived from the oviduct of different species. *Hum Reprod* 1989; 4: 229-35.
13. Dokras A, Sargent IL, Barlow DH. Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Hum Reprod* 1993; 12: 2119-27.
14. Conway-Mayers BA, Knochenhauer ES, Steinkampf MP. Coculture in assisted reproductive technology.

- Assist Reprod 1998; 9: 23-30.
15. Society for Assisted Reproductive Technology, The American Fertility Society: Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1991 results from the Society for Assisted Reproductive Technology generated from the American Fertility Society Registry. *Fertil Steril* 1993; 59: 956-62.
 16. Rosenkrans CF, Zeng GQ, McNamara GT, Schoff PK, First NL. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 1993; 49: 459-62.
 17. Gliedt DW, Rosenkrans CF, Rorie RW, et al. Effects of media, resum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. *J Dairy Sci* 1996; 79: 536-42.
 18. Maeda J, Kotsuji F, Negami A, Kamitani N, Tominaga T. In vitro development of bovine embryos in conditioned media from bovine granulosa cells and vero cells cultured in exogenous protein- and amino acid-free chemically defined human tubal fluid medium. *Biol Reprod* 1996; 54: 930-6.
 19. Takahashi Y, Hishinuma M, Matshui M, Tanaka H, Kanagawa H. Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *J Vet Med Sci* 1996; 58: 897-902.
 20. Bernardi ML, Flechon JE, Delouis C. Influence of culture system and oxygen tension on the development of ovine zygotes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil* 1996; 106: 161-7.
 21. Wright RW, Bondioli KR. Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals. *J Anim Sci* 1981; 53: 702-29.
 22. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Mok H, et al. Cocultures in human assisted reproduction. Support of embryos in vitro and their specificity. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 626: 434-44.
 23. Bongso A, Ng SC, Fong CY, et al. Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture. *Fertil Steril* 1992; 58: 569-74.
 24. Biggers JD, Gwatkin RBL, Brinster RL. Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium. *Nature* 1962; 194: 747-9.
 25. Kuzan FB, Wright RW. Observations on the development of bovine morulae on various cellular and noncellular substrate. *J Anim Sci* 1982; 54: 811-6.
 26. Thibodeaux JK, Godke RA. In vitro enhancement of early-stage embryos with coculture. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116: 364-72.
 27. Menezo YJ, Sakkas D, Janny L. Coculture of the early human embryo: factors affecting human blastocyst formation in vitro. *Microsc Res Tech* 1995; 32: 50-6.
 28. Szollosi D, Desmedt V, Crozet N, Brender C. In vitro maturation of sheep ovarian oocytes. *Prorod Natur Dev* 1988; 28: 1047-80.
 29. Dandekar PV, Martin MC, Glass RH. Maturation of immature oocytes by coculture with granulosa cells. *Fertil Steril* 1991; 55: 95-9.
 30. Plachot M, Antoine JM, Alvarez S, et al. Granulosa cells improve human embryos development in vitro. *Hum Reprod* 1993; 8: 2133-40.
 31. Feng HL, Yang QZ, Sun QY, Qin PC, Liu JM. Development of early bovine embryos in different culture systems. *Vet Record* 1994; 135: 304-6.
 32. Quinn P, Margalit R. Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *J Assis Reprod Genet* 1996; 13: 9-14.
 33. Dirnfeld M, Goldman S, Gonen Y, Koifman M, et al. A simplified coculture system with luteinized granulosa cells improves embryo quality and implantation rates: a controlled study. *Fertil Steril* 1997; 67: 120-22.