

Improved Culture Media in Human IVF-ET Program

마리아병원 불임연구실

윤 산 현

발생초기에 배아 (embryo)는 나팔관을 따라 내려오면서 배아분열이 이어지고 상실배 후기나 포배초기 배아가 될 무렵에 자궁의 환경과 만나게 된다. 부부관계로 인하여 배란된 난자나 나팔관 팽대부에서 정자와 만나면서 성인 남녀가 결혼하듯이 서로 몸을 섞게 된다. 정자와 난자가 만나서 (fertilization) 최소한 96~120시간은 나팔관을 따라 여행하면서 살게 되고 자궁에 도착하여 뿌리를 내릴 때 (implantation)까지 자궁에서 생활한다. 난자는 발생초기에 생활할 수 있는 많은 혼수품 (ooplasm)을 가져오게 되는데 정자와 만나서 혼수품을 같이 이용하면서 난할 (cleavage)한다. 서로의 성격을 파악하게 되면 (genomic activation) 서로 힘을 합해서 (compaction) 계획된 일들 (nutrient uptake, 1st differentiation, hatching 및 implantation)을 차근차근 수행하여 완전히 정착된 삶 (fetus life)을 살아간다.

체외에서 이러한 과정이 일어날 수 있도록 해 주는 것이 IVF-ET program으로 개발되어 점점 개선되고 있다. GnRH agonist의 이용으로 보다 많은 난자를 채취하고 ICSI의 도입으로 이전에 수정이 불량한 환자에서도 수정란을 많이 얻어 전체적으로 이식할 만한 난할기 배아를 많이 확보함에도 불구하고 수정후 2~3일째에 배아이식을 실시할 때 임신율 및 착상율이 동물에서 흔히 얻어지는 것보다 낮은 실정이다 (Bavister, 1995). 염색체의 이상 (Bongso 등, 1991), 부적합한 배아의 배양체계 (Bavister, 1995) 및 배아의 발생시기와 배아이식 부위의 불일치 (Jones, 1998) 등이 생산된 배아가 착상에 이르지 못한 주 이유일 것이다. 무슨 이유이든 난할기 배아를 이식할 때 직면하는 어려움은 형태학적으로 배아를 관찰하면서 가능한한 생명력이 있는 배아를 선발해야 한다는 것이다. 체외에서 수정후 5일째까지 배양을 연장하면 생명력이 있는 배아를 선발하는 것이 다소 용이할 것이다. 저장된 모성정보 (stored maternal message)로부터 활성화 지놈 (activated embryonic genome)을 통해 발생을 더 이상할 수 없는 배아는 퇴화되거나 발생이 억제되기 때문에 (Braude 등, 1988) 정상적인 배아만이 포배기로 갈 수 있을 것이다.

인간의 배아를 체외에서 포배기까지 발생하도록 배양기간을 늘리려는 초기의 시도는 그다지 좋지 못한 성적을 초래하였다 (Bolton 등, 1991). 그후 여러 가지 체세포를 지지세포로 하여 배아를 배양할 때 포배기 배아의 발생은 물론 그들의 착상율이 개선된다는 것이 제시되었다 (Menezo 등, 1992; Olivennes 등, 1994; Schillaci 등, 1994). 그러나 공동배양에서 인간 배아의 발생이 일상적인 배양조건에서 얻은 것보다 우위에 있다라는 주장은 의문시 되어 왔다 (Bavister, 1992; Van Blerkom, 1993; Sakkas 등, 1994).

최근에 체외에서 5일 동안이라할 지라도 배아의 대사적 요구가 변화하는 단계가 있음으로 둘 이상의 연속배양액의 개발이 제안되고, 공동배양을 하지 않고 배양액만으로 생명력이 있는 인간의 포배기 배아를 기술적으로 키워낼 수 있다는 것이 제시되고 있다 (Scoltes와 Zeilmaker, 1996). 전통적으로 사용되어온 배양액은 초기배아의 발생에 필요한 아미노산류와 같은 regula-

tor들이 부족할 뿐만 아니라 (Bavister와 Mckiernan, 1993; Gardner와 Lane 1993, 1994; Lane과 Gardner, 1994, 1997), 자성생식기의 부위별 환경변화를 반영하는 배아의 생리 및 에너지 요구를 충족해 주는 것이 결여되어 있다 (Gardner 등, 1996). 그래서 포배기까지 배아를 배양할 경우 하나의 단순 혹은 복합배양액으로 5일 동안 이러한 복잡한 대사를 충족시키지 못할 것이다. 처음 2일 동안은 단순배양액에서 키우고 이어서 3일 이후는 지지세포단층의 유무와 상관없이 복합배양액에서 키우는 경우가 바람직할 것이다.

많은 연구자들이 IVF-ET program을 이용함에 있어 보다 성공적인 배아의 배양체계를 간과하지 않으리라 생각하기에 몇가지 보고에 근거하여 인간 배아를 배양하는 새로운 배양체계와 그 배양체계에서 인간배아의 발생과 임신에 미치는 요인들을 언급하고자 한다.

1. 인간배아를 배양하는 새로운 배양체계

Gardner 등 (1998)은 단순하게 조제할 수 있는 무혈청 연속배양액 (defined sequential serum free media)의 사용을 제시하고 있다. 인간의 IVF-ET program은 대부분이 난자를 채취한 2~3일 후에 비외과적으로 자궁에 이식하지만 착상율이 10~15%에 그친다. 난관에 있어야 할 난할단계의 배아를 자궁에 이식하는 것은 포배기 배아를 자궁에 이식하는 것보다 유의하게 착상율이 낮으므로 난할단계의 배아를 좀 더 배양하여 자궁과 배아의 생리환경을 일치시켜 주고 포배기까지 배양하는 과정에서 배아의 발생능력을 동정하여 배아의 생명력을 판단하는 것이 중요하다. 그리고 착상기 이전에 배아가 체외에서 발생하고 분화하는데 변화되는 많은 영향적 요구를 충족시킬 수 있는 두가지 이상의 배양액이 필요하다 (Gardner 등, 1998).

한 연구에서 배아를 처음 2일은 IVF50 (Scandinavian IVF Science)에서 자라게 하고 3일째부터 5일째까지 G2배양액 (Jones 등, 1998)에서 자라게 한 반면 다른 한 연구에서는 처음 2일은 위와 동일하고 3일째는 이온충격을 피하기 위해서 IVF50을 50%, S2 (Scandinavian IVF Science)를 50%로 혼합하여 배아를 배양하며 4일 이후부터는 S2배양액에서 배양하였다 (Fong 등, 1998). 또 다른 최근 연구에서는 G1배양액을 처음 2일간 사용하다가 이어서 3일 이후에는 G2배양액으로 배아를 배양하는 방법을 이용하였다 (Gardner 등, 1998). 이들 최근 세가지 체외 배양체계에서 생산된 포배기 배아를 자궁에 이식한 후 개선된 착상율 즉, Jones 등 (1998)은 23%, Fong 등 (1998)은 33.3%, Gardner 등 (1998)은 45.5%를 얻었다고 보고하였다. 또한 Behr 등 (1999)은 glucose/phosphate-free하고 taurine이 첨가된 배양액 (P1)에서 3일간 배양하고, 3일째 이식 후 남은 배아를 blastocyst 배양액에서 2일을 더 배양하여 54%의 포배기 배아를 생산하였다. 이런 방법으로 생산한 포배기 배아를 냉동보관하였다가 이들을 이식함으로써 19%의 착상율을 얻었다. 또한 30명의 환자에서 5일째에 포배기 배아를 이식하여 22명에게 임신시켰고 배아의 착상율은 50%에 달했다고 보고하였다. 마리아 병원에서는 YS03배양액과 YS36배양액을 개발하여 난구세포와 공동배양하면서 수정된 배아의 수가 적을 경우에는 3일째 배아이식을 하고, 수정된 배아의 수가 많을 경우에는 5일째 배아이식을 실시하는데 포배기 배아의 발생율은 58%이며 환자의 불임원인이나 나이에 상관없이 내원한 환자의 전체적인 임신율과 착상율은 각각 30%와 17%를 얻고 있다.

Gardner 등 (1998)은 무혈청 연속배양액을 사용하면 50% 이상의 포배기 배아의 발생을 얻을 수 있고 50%까지 착상율을 올릴 수 있음을 주장하고 있다. 또한 무혈청 연속배양액에 단백질

의 대체제로 혈청성분인 albumine을 사용하는 것 보다 생쥐배아에서 착상율을 지지하였던 glycosaminoglycan hyaluronate 사용하므로써 혈액으로부터 오는 contamination 및 생물학적 변화들을 제거할 수 있음을 제시하고 있다.

2. 난할초기의 대사

2.1 탄수화물류

초기 연구는 배아의 난할초기에 단순배양액에 glucose를 첨가하지 않고 pyruvate를 첨가하면 8-세포기까지 배아의 발생이 증가하고 이와 같은 환경에서 발생된 포배기 배아의 발생율은 58%이며 포배기 배아의 총 세포수는 glucose를 첨가한 경우에 비하여 유의하게 더 많았다 (각각 99.1와 58.4)고 보고한다 (Conaghan 등, 1993). 8-세포기/상실배기 단계에서 배아의 에너지 기호성이 pyruvate에서 glucose로 바뀐다는 것이 제시되고 있다 (Gardner와 Leese, 1986; Hardy, 1993). pyruvate의 섭취는 제 3-4차 난할기를 통하여 유의하게 증가하면서 상실배기에서 극치를 이루며 상실배기와 포배기사이에서 유의하게 감소한다 (Hardy 등, 1989). 배아가 난관에 있을 경우에는 난관액 내에 pyruvate와 lactate의 농도가 최고치를 갖고 있으며 glucose는 0.5 mM 정도의 최저로 함유되어 있다 (Gardner 등, 1996). 전통적으로 이용되는 HTF (human tubal fluid; Qunn 등, 1985) 와 Earl의 배양액 (Edwards, 1981)과 같은 배양액의 glucose는 인간배아의 발생을 손상시킬 수 있다 (Conaghan 등, 1993; Quinn, 1995). glucose는 난할초기 배아가 선호하는 에너지원은 아니나 전통적인 배양액으로 배양할 경우 난할초기 배아는 glucose를 산화시켜 실제적으로 이용한다 (Seshagiri와 Bavister, 1991; Gardner와 Sakas, 1993). 이런 현상은 종양세포의 대사 형태와 비슷하며 Crabtree 효과로 알려지고 있다. 그러나 특이아미노산과 EDTA가 배양액에 함유되어 있을 때에는 배아발생에 얼마나 손상을 주는지 분명하지 않다. 특이아미노산과 EDTA는 난할초기 배아의 glycolytic activity를 위축시킨다 (Gardner, 1998). 더욱이 그들은 난할초기 배아에 glucose가 나쁘게 영향을 주는 것을 최소화시킨다. Behr 등 (1999)은 난할초기 배양액으로 glucose와 inorganic phosphate가 전혀 필요하지 않다고 제시한다. Qinn (1995)도 난할초기 배양액으로 glucose와 phosphate를 완전히 제거할 때 이들이 첨가될 때보다 임신율이 유의하게 증가함을 밝혔다 (Rawlins 등, 1997; Barrett 등, 1997; Pool 등, 1998). 또한 Conaghan 등 (1993)은 3일간 배양한 경우 glucose를 완전히 제거한 배양액에서 8-세포기 배아의 비율은 1 mM glucose가 첨가된 경우보다 약간 증가하고, 난할초기에 glucose를 완전히 제거한 경우에서 포배기 배아의 세포수가 더 많다고 제시한다. Gardner와 Lane (1997)는 glucose가 energy substrate로서 보다는 여러 결정적인 anabolic pathway에서 (triglycerol, phospholipid, mucopolysaccharide, glycoprotein 및 purin 등의 생성) metabolic 역할을 수행한다고 제시하지만 Behr 등 (1999)은 Gardner 등 (1996)이 난관에서 관찰한 낮은 glucose의 수준 (< 0.5 mM)은 anabolic need를 지지하는데 요구될 가능성이 있지만 이러한 pathway에서 function할 수 있는 glucose의 양은 세포내에도 존재한다고 하였다. 어떠한 연구에서도 발생 초기에 glucose를 첨가해야 이롭다는 것은 없었다. 마리아 병원에서 사용한 YS03배양액은 glucose와 phosphate를 첨가하지 않으나 난할초기 배아를 배양할 때는 YS03에 10%의 인간난포액을 첨가함으로 완전히 제거된다고 볼 수 없지만 일부러 0.5 mM glucose를 첨가하였을 때 8-세포기 배아의 발생율은 지연되는 경향이 있었다.

2.2 아미노산류

최근까지는 아미노산류가 인간 배아발생의 중요한 regulator로 간주되지 않았다. 그러나 포유동물의 배아발생에 아미노산의 역할이 제기되면서 아미노산이 초기배아의 가장 중요한 regulator들 중의 하나로 자리를 잡았다. 배아의 배양액에 있어서 아미노산류의 포함에 대한 생리학적 기초는 자성생식도내 분비액에 아미노산류가 풍부하다는 사실 (Miller와 Schultz, 1987; Gardner와 Leese, 1990; Moses 등, 1997)과 난자와 배아가 세포막을 통하여 세포내의 아미노산 pool을 유지한다는 사실 (Schulz 등, 1981; Miller와 Schulz, 1987; Van Winkle, 1988)을 토대로 한 것이다. 흥미롭게도 난관내에 가장 풍부하게 함유된 것들은 난할초기 배아에 유익한 영향을 주는 것들이다 (Bavister와 McKiernan, 1993; Gardner와 Lane, 1993). 이들 아미노산류는 alanine, glutamate, glutamine, glycine, proline 및 serine 이다. 이들 아미노산류는 생쥐배아가 처음 제 3차 난할기를 거쳐 compaction을 수행하는 시기에 유의하게 감소하고 (Lane과 Gardner, 1997) 포배기 배아를 형성하는데 걸리는 시간을 단축시킨다 (Gardner와 Lane, 1993). 이러한 아미노산류는 체외배양에서 체세포가 요구하지 않는 비필수아미노산류로서 Eagle의 것 (Eagle, 1959)과 아주 비슷하다. Eagle이 분류한 필수아미노산류는 난관에 높은 농도로 존재하지 않으며 난할초기 배아에게 유익한 영향을 주지 못한다 (Gardner와 Lane, 1993; Lane과 Gardner, 1997). 실제로 생쥐 배아를 8-세포기 이전에 Eagle의 농도로 필수아미노산에 노출하였을 때 생명력을 잃었다 (Lane과 Gardner, 1994). taurine은 햄스터에서 난할초기 배아발생을 촉진함 (Bavister와 McKiernan, 1993)은 물론 antioxydant로서 보호기능을 갖고 있다. 아미노산들은 발생초기에 질소원으로 이용되는 것보다는 다른 기능 즉, osmolyte로서 보다 생리적인 역할을 할 수 있다 (Gardner와 Lane, 1997). 마리아 병원에서 사용한 YS03배양액은 MEM 수준의 비필수아미노산과 1mM glutamine 및 0.1 mM taurine을 첨가한 이외에 RPMI 1/10 수준의 필수아미노산류가 첨가되어 있다.

3. 난할후기의 대사

3.1 탄수화물류

pyruvate의 섭취는 제 3-4차 난할기를 통하여 유의하게 증가하면서 상실배기에서 극치를 이루며 상실배와 포배사이에서 유의하게 감소한다. 반면 glucose의 섭취는 16-세포기에서 포배기 사이에서 유의하게 증가한다 (Hardy 등, 1989). 자궁액 내에는 pyruvate와 lactate가 난관액과는 달리 아주 낮은 수준으로 있으며 glucose의 농도는 3.15 mM 정도로 최고치를 함유하고 있다 (Gardner 등, 1996). 상실배기의 compaction현상 이후에 배아가 glucose를 이용하는 경우를 보면 첫째로 glucose는 biosynthesis에 중요한 역할을 한다. lipid와 다른 complex macromolecules의 생합성에 요구되는 NADPH와 핵산의 생합성에 ribose moieties의 생성에 개입한다. 두 번째로 glucose의 부족 혹은 pathway에서 효소의 억제 (예, EDTA)로 인한 glycolysis의 위축은 ICM 및 태아의 발생에 지장을 줄 수 있다. 실제로 생쥐배아를 glucose가 함유되지 않은 배양액에서 포배기까지 배양하였을 때 포배기 배아는 자궁에서 착상은 가능하지만 glucose가 함유된 배양액에서 발생된 포배기 배아에 비하여 유의하게 많은 태아가 유산되어 버렸다. 비슷하게 생쥐 포배기 배아가 glycolysis를 억제하는 EDTA가 첨가된 배양액에서 배양되었다면 처음 48시간 동

안만 EDTA에 노출되었던 포배기 배아보다 태아의 발달이 유의하게 낮았다 (Gardner와 Lane, 1996). Gardner 등 (1997)은 소에서도 처음 72시간 동안만 EDTA에 배아를 노출시키는 연구를 계속하여 8-세포기 배아의 발생율이 유의하게 개선되는 것을 확인하였다. 그러나 EDTA에 8-세포기 배아를 계속적으로 노출시키면 발생된 포배기 배아는 ICM이 유의하게 적었고 trophectoderm 세포수에는 별 영향을 주지 않음을 알았다. 이와 같은 data가 난할초기와 상실배기 이후와의 물질대사적 차이를 극명하게 보여주고 있으며 배아의 변화된 영양적 요구에 충족해 주기 위해서는 배아의 발생시기에 따라 다른 배양액을 사용해야 함을 제시한다. 마리아 병원에서는 20% 인간 난포액을 제외한다면 glucose가 배제된 YS36을 이용하여 포배기 배아를 생산하고 있다. 난할 후기에 glucose가 함유된 G2나 S2를 사용하였을 때나 YS36에 glucose를 첨가하였을 경우 수정후 5일에 포배기 배아의 발생율을 조사하였던 바 포배기 배아의 질은 양호하나 그 발생율이 유의하게 control에 비하여 낮았으며 발생이 지연되는 것을 관찰하였다.

3.2 아미노산류

흥미롭게도 탄수화물류의 이용에 있어서 발생시기별 전환이 있었듯이 아미노산류에서도 이용전환이 있다. 포배기 배아의 ICM은 체세포의 배양에서와 같이 필수아미노산류를 요구하며 trophectoderm 세포들은 비필수아미노산과 glutamine을 요구한다 (Lane과 Gardner, 1997). 비필수아미노산류는 배아의 compaction 이전에 energy metabolism, osmolyte 및 세포내에서 pH 완충제의 조절자 역할을 한다. 생쥐 배아의 배양체계에서 아미노산의 요구에 대해서 연구한 바 (Gardner와 Lane, 1997), 포배기 배아를 이식한 후 대부분의 임신은 난할초기 배양액에 Eagle의 비필수아미노산들을 첨가하고 난할후기 배양액에 20개의 Eagle의 아미노산류 (필수아미노산류와 비필수아미노산류)를 첨가하여 얻고 있다 (Lane and Gardner, 1997). 이와 같은 접근으로 인간 배아의 연속배양이 비록 인간 배아에 대한 정확한 아미노산의 요구는 아니라 할지라도 성공적으로 이루어 지고 있다 (Gardner 등, 1997).

동물 (Pollard 등, 1995; Lane과 Gardner, 1997)과 인간 (Gardner 등, 1998)의 배아 연구에서 밝혀진 것은 포배기 배아를 효율적으로 생산하기 위해서는 발생후기에 아미노산류가 요구된다는 것이다. Pollard 등 (1995)은 돼지 난할초기 배아의 발생을 단순배양액과 복합배양액의 조합으로 비교하였다. 둘 중 어떤 한 배양액만으로 배아를 배양하는 것보다 먼저 난할초기 배양액으로서 단순배양액을 사용한 다음 난할후기 배양액으로 복합단백질을 사용하는 연속배양체계가 우수하다고 밝혔다. 마리아 병원에서 사용한 난할후기 배양액 YS36은 MEM 수준의 비필수아미노산류와 RPMI 1/2 수준의 필수아미노산류를 첨가하고 2 mM의 glutamine과 0.1 mM의 taurine을 첨가한 배양액이다.

4. 연속배양액 (sequential media)의 개발

배아의 발생시기에 따라 생리적 변화가 있고 탄수화물류 및 아미노산류의 요구가 다르기 때문에 체외에서 포유동물 배아의 적절한 발생을 유도하기 위해서는 두가지 이상의 배양액이 필요하다는 것이 극명하게 밝혀졌다. 수정된 배아를 포배기 배아로 원활히 발생시키기 위해서는 난할초기 배양액과 난할후기 배양액으로 구분되어야 한다. Gardner의 G1과 G2배양액과 Quinn의 P1과 Blastocyst 배양액이 그 예이다. G1배양액은 난할초기 배아가 난관에 있을 때 난

관액에 들어 있는 탄수화물류의 수준을 가미한 것이다. 또한 난할초기 배아의 발생을 지지하는 비필수아미노산과 glutamine을 첨가하였고 배양체계에서 존재하는 독성 divalent 양이온을 침지하고 glycolysis의 활성 즉, 대사적 동요를 최소화하기 위하여 EDTA를 첨가하였다. 이와는 반대로 G2배양액은 인간의 자궁액 내에 존재하는 수준의 탄수화물을 기초로 하였으며 포배의 발생과 분화를 촉진시키기 위하여 비필수아미노산 및 필수아미노산을 동시에 첨가하였으며 ICM의 발생과 기능을 선택적으로 손상하여 점차적으로 생명력을 잃게 하는 EDTA는 넣지 않았다 (Gardner와 Lane, 1996; Gardner 등, 1997). G1과 G2배양액은 혈청알부민이 첨가되었다. 생쥐배아를 포배기 이전의 전 기간 동안 G1배양액에서 배양하였을 때 배아가 건강한 포배로 형성되었지만 대부분의 포배가 착상하지 못하였다. 즉, 이는 생명력 있는 태아를 형성할 ICM을 충분하게 유지하지 못하였음을 나타낸다 (Gardner 등, 1997; Lane과 Gardner, 1997). 반대로 배양 48시간 후 G2배양액으로 배아를 옮겼을 경우에는 발생율과 형태는 비슷할지라도 ICM의 유의한 발생으로 인하여 유의하게 높은 착상율과 임신율을 유지하였다. ICM의 생명력은 발생후기에 glycolysis를 영향하는 적절한 glucose가 있어야 하고 EDTA가 제거되어야 하며 필수 아미노산이 들어 있는 배양액을 필요로 한다. G1배양액과는 달리 P1배양액에는 하나의 아미노산 즉, taurine만을 첨가하고 있다. Behr 등 (1999)은 발생후기에 복합배양액 (Blastocyst medium)을 이용할 경우 발생초기 배양액에 아미노산을 taurine만 첨가하여도 충분하다는 것을 제시하였다. YS03은 난할초기 배양액으로서 MEM 수준의 비필수아미노산류 외에 RPMI 1/10 수준의 필수아미노산류, taurine, glutamine 및 EDTA가 첨가되어 있으며 glucose는 첨가되지 않았다. 또한 YS36은 난할후기의 배양액으로서 YS03에 들어 있는 아미노산류와 RPMI 1/2 수준의 필수아미노산이 첨가되어 있고 glucose는 첨가하지 않은 대신 20% hFF와 함께 사용하고 있다.

5. 배양액 첨가제

IVF program에서 혈액 추출물의 이용으로부터 infection의 위험이 있다. 최근에 배아의 배양액에 혈청을 첨가하는 것은 가축의 배아에 놀랄만한 영향 즉, ultrastructure의 비정상 (Thompson 등, 1995), 에너지대사의 이상 (Gardner, 1994), 비정상적으로 큰 자축의 출현 (Thompson 등, 1995) 등의 영향을 줄 수 있다. 혈청 알부민을 만드는데 pooled 혈액은 감염원이 되는 것은 물론 혈청알부민의 batch에 따라 배아에 영양요인의 유의한 다양성 때문에 어려운 평가와 생물학적 변이의 문제를 해결하기 어렵다. 이와 같이 심각한 문제가 혈청알부민을 대체할 수 있는 macromolecule들을 찾기에 이르고 있다. synthetic polymers인 polyvinylalcohol과 polyvinylpyrrolidone은 일찍이 ART에 사용되고 있다 (Bavister, 1995). 그러나 둘 중 어느 것도 단백질에 대한 생리적 대체물질로 생각할 수 없고 이들에 대한 teratological 성질을 평가하지 못하고 있다. 더욱이 배양액내에서 혈청알부민의 진정한 역할이 성장인자들과 결합하여 그들을 안정화한다고는 믿고 있지만 완전히 밝혀지지 않고 있다. 배아배양체계에서 macromolecule들은 난자나 배아의 조사를 용이하게 하고 플라스틱이나 유리와 같은 배양기구에 들러붙는 것을 방지해 준다. 알부민에 가능한 대체제로는 glycosaminoglycan 즉 hyaluroninate이다. 착상기에 자궁액 내에서 hyaluroninate의 수준이 증가할 뿐만 아니라 인간의 착상기 이전의 배아에서 hyaluroninate에 대한 수용체가 발현되고 있기 때문이다 (Campbell 등, 1995). hyaluroninate는 heparin과 같은 GAG와

는 다르게 단백질의 일부분을 갖고 있지 않은 polysaccharide이다. 그러므로 순수형태로 합성되어질 수 있기 때문에 variation과 contamination의 문제를 제거할 수 있다. mouse 배아의 배양과 이식에서 쉽게 알부민 대신 hyaluroninate (0.5 mg/ml)로 대체할 수 있었으며 포배의 착상율을 유의하게 증가시킨다. hyaluroninate는 albumin보다 포배의 착상율을 유의하게 높게 지지한다. 게다가 착상율의 증가를 이식용 배양액에 한정할 수도 있다. Gardner 등 (1997)은 hyaluroninat를 albumin과 대체하였을 때 포배기 배아의 형성율이 서로 비슷하였으며, ICM 및 trophectoderm 세포를 갖고 있는 포배기 배아의 형성율도 서로 비슷하였다. 그러나 hyaluroninate를 함유한 이식용 배양액에 포배기 배아를 옮기기 전에 0.5 mg/ml의 hyaluroninate가 첨가된 배양액에서 5분간 노출하였을 때 배양하는 모든 기간 동안 0.5 mg/ml의 hyaluroninate가 첨가된 배양액에서 생산된 포배기 배아의 착상율은 비슷하였다. 배아와 착상에 미치는 hyaluroninate의 유효효과는 그 물질이 1) 배아의 주변에 anti-viral과 anti-immunogenic layer를 형성하는 능력, 2) angiogenesis를 증가시키는 능력 및 3) 자궁액내에서 배아를 비롯 이식용 배양액의 내용물을 재빠르게 확산되는 것을 용이하게 하는 능력을 갖고 있다. 자궁액은 점액성이기 때문에 알부민이 들어 있는 배양액과 같이 상대적으로 용액성을 자궁관에 이식했을 때 자궁액과 이식된 배아나 배양액과 섞이는 것이 느릴 것이다. 반대로 hyaluroninate 용액으로 배아이식을 실시하였을 경우에는 자궁강의 환경속으로 배아가 확산되는 것을 용이하게 한다. Hyaluroninate는 포배가 자궁내막에 부착하는 것을 1차적으로 돕는다. 마리아 병원에서는 수정 및 난할초기 배양액으로 YS03에 10% hFF를 첨가하여 이용하고 8-세포기 이후의 배양액으로는 YS36에 20% hFF를 첨가하여 포배기 배아를 생산하고 있으며 이식용 배양액은 난할후기 배양액과 같으나 hyaluroninate의 이용에 관한 실험을 진행하고 있다.

6. 공동배양의 잇점

배아를 여러가지 체세포와 공동배양하였을 때 포배기까지 발생율이 개선된다는 보고가 많다. 인간난관이나 소난관 상피세포 (epithelial cell lines), 인간자궁내막 (endometrial cells), 인간난구세포 (granulosa and cumulus cells), 아프리카그린 원숭이의 신장세포 (Vero cells) and buffalo rat liver (BRL) cells과 난할초기 배아를 공동배양하여 인간의 포배기 배아를 생산할 수 있다 (Bongso 등, 1995). 많은 인간 2PN 배아를 인간난관 상피세포와 공동배양한 96~100시간 후에 68~69%의 포배초기배 (cavitating blastocysts)를 생산하였는데 이는 control의 31~33%에 비해서 유의하게 높았다 (Bongso 등, 1992). Menezo 등 (1992)은 Vero cell과 공동배양하였을 때 모든 2PN 배아의 57%가 포배기 배아로 발생하였고, Olivennes 등 (1994)은 Vero cell과 공동배양하였을 때 40%의 2PN 배아가 포배기 배아로 발생하였다. Schillaci 등 (1994)은 동일한 배양체계에서 68%의 포배기 배아의 발생율을 얻었다. 그러나 Fong 등 (1998)은 Vero cell과 공동배양하는 배양체계에서 67.4% 및 공동배양을 하지 않는 배양체계에서 68.5%의 포배기 배아의 형성율을 얻었으며 포배기 배아의 총 세포수에 있어서도 두 배양체계간에 유의차가 없는 것을 확인하였다. 이들은 포배기 배아를 이식한 후 52.0%의 임신율과 32.1%의 착상율을 얻었으며 인간 IVF-ET program에서 Vero cell과의 공동배양체계의 필요성이 없음을 확인하였다. 연속 배양액만을 이용한다면 공동배양하기 위하여 Vero cell을 plating하는 시간과 노력을 아낄 수 있고 가능한 virus 교차오염을 방지할 수 있다고 하였다. 공동배양의 유익한 요인들은 Vero cell로

부터 taurine, glutamine 및 insuline, 인간 난관세포로부터 colony stimulating factor-1, leukemia inhibitory factor, epidermal growth factor 및 interleukin-2 등이라 할 수 있으므로 이들을 적량하여 배양액에 첨가하여 주는 것도 바람직할 것이다 (Fong 등, 1998). 마리아 병원에서는 모든 환자의 배아를 난구세포와 공동배양한다. 무균적으로 세포를 다루기 쉽고 YS배양액에서 공동배양의 경우가 control에 비하여 정상적인 포배기 배아의 발생율이 높기 때문에 현재도 이용하고 있다.

7. 이식전 생명력 있는 포배기 배아의 선발

Dokras 등 (1991)은 이식후의 배아를 3일에서 14일까지 계속적으로 배양하는 연구를 하였다. 포배기 배아는 5일에서 7일 사이에 형성되었고, 5일, 6일 또는 7일에 형성된 포배기 배아는 8일 이후부터 HCG의 분비에 있어 유의차도 형태학적 차이도 없다는 것을 관찰하였다. 이러한 분석은 난할이 천천히 되어도 growth potential을 갖는다는 것을 제시한다. 그들은 이전에 체내의 관찰을 통해 보고했던 발생과 비교했을 때 체외에서 포배기 배아의 발생과 유사하다고 하였으나 부화하는 것은 최소한 1일정도 지연되었다고 보고하였다. 추후 연구에서 Dokras 등 (1993)은 포배기 배아의 형태에 근거한 등급을 결정하였다. BG1 포배기 배아는 포배강의 초기 형성에 의해서 특징지어지는 약간 중앙에서 치우친 부분에서 형성되고 극명한 ICM 부위와 trophoctoderm층에 의해 형성된 포배강이 확장되어 간다. BG2 포배기 배아는 하나 혹은 여러 개의 포배강이 액포처럼 형성되어 다음날 BG1과 같은 전형적인 포배기 배아로 되는 과정을 겪는다. BG3 포배기 배아는 ICM에 액포 (vauole)와 퇴화점 (degenerative foci)이 나타나는데 이러한 포배기 배아는 파괴되거나 추가로 24시간 배양하여도 유의하게 팽창하지 못한다. BG3 포배기 배아는 높은 수준의 hCG를 분비하지 못하며 BG1 포배기 배아나 BG2 포배기 배아보다 유의하게 적은 핵을 갖고 있다. hCG의 분비에 있어서는 BG1 포배기 배아와 BG2 포배기 배아의 사이에는 유의한 차이가 없었다. Jones의 연구에서와 같이 5일째에 포배기 배아의 형성율이 낮을 경우 (20%), 적절한 이식수를 맞추기 위해서는 상실배기 배아를 이식할 수도 있을 것이다. 5일째 상실배기 배아의 형태는 평가하기 매우 어렵다. 팽윤된 포배기 배아로 계속 발달할 수 있는 상실배기 배아의 능력을 평가하는 형태학적 parameter가 없어 가장 생명력 있는 배아를 선발할 수 없을 것이다. 초기 포배기 배아나 상실배기 배아가 5일째에 발생하였을 때에는 하루 더 배아를 배양하는 것이 좀 더 객관적인 평가를 할 수 있을 것이다. 이식하기 위해서 좋은 것은 포배기 배아가 부화의 징후를 보이던가 최소한 ICM이 극명하게 보이면서 완전히 팽창된 모습 (BG1)이어야 할 것이다. 마리아 병원에서 생산된 포배기 배아는 독창적인 방법에 의해 거의 모두 BG1의 과정에 의해 발생함을 관찰하였으며 공동배양을 실시하지 않을 경우에만 대부분이 BG2의 과정으로 발생함을 확인하였다. 5일째에 생산된 포배기 배아를 발생단계별로 포배초기, 초기팽윤포배기, 중기팽윤포배기 및 말기팽윤포배기로 구분하며 포배기 배아의 질을 ICM과 trophoctoderm 세포의 발생정도에 준하여 A등급, B등급, C등급으로 판정한다. A-B등급의 포배기 배아는 임신과 결부되는 확율이 높으며 냉동보관하였다가 융해하여 이식하였을 때는 중기팽윤포배기 이상이며 A-B등급의 배아가 임신과 결부되는 확율이 높았다. 포배초기 배아가 이식하고 남은 잉여배아일 경우에는 언제나 다음날까지 배양하여 냉동보관에 들어간다.

8. 포배기 배아의 이식전 보조부화술

Cohen 등 (1990)은 가장 좋다고 하는 배양 조건도 체내의 조건에 비하여 적합하지 못하며 이러한 조건은 완전히 팽윤된 포배기 배아가 투명대로부터 부화하고 자궁에 착상하는 것을 지연시키거나 방해하는 zona hardening을 이끈다고 제시하였다. 따라서 Jones 등 (1998)은 투명대 내에 있는 이식할 모든 배아를 이식하기 전에 0.2% pronase에 노출하여 나화하였다. pronase로 투명대를 제거하는 것이 포배기 배아가 쉽게 착상하도록 돕는 것이다. Fong 등 (1997)은 pronase에 노출시킨 6일째 포배기 배아의 이식에서 정상적인 임신율 얻었다. 이들은 0.5%의 pronase로 zona를 제거한 포배기 배아가 자연적으로 부화한 포배기 배아처럼 여러 지지세포층에 꼭 달라붙어 퍼져 나가면서 자라는 것도 관찰했다. 투명대를 제거한 포배기 배아의 착상율은 22.8%였고, 투명대를 제거한 상실배기 배아와 포배기 배아를 함께 이식했을 때는 20.0%였다. 마리아 병원에서는 포배기 배아를 이식하기 전에 언제나 0.05% pronase E를 처리하여 3분간 노출시킨 후 투명대가 얇아지면 자궁에 이식하고 있다.

9. 참고 문헌

- Barrett CB, Penzias AS and Powers RD. P1/SSS embryo culture medium yields a higher pregnancy rate than HTF/plasmanate in IVF/embryo transfer. *Fertil Steril (suppl.)* 1997; S132: 084.
- Bavister BD. Co-culture for embryo development: is it really necessary? *Hum Reprod* 1992; 7: 1339-41.
- Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1995; 1: 91-148.
- Bavister BD and McKiernan SH. Regulation of hamster embryo development *in vitro* by amino acids. In Bavister BD (ed), *Preimplantation Embryo Development*. Springer-Verlag, New York, NY, USA, pp.57-72 1993.
- Behr B, Pool TB, Milki AA, et al. Clinical experience with human blastocysts development *in vitro* without co-culture. *Hum Reprod* 14 in press 1999.
- Bolton VN, Wren ME and Parsons JH. Pregnancies after *in vitro* fertilization and transfer of human blastocysts. *Fertil Steril* 1991; 55: 830-5.
- Bongso A, Ng SC, Lim J, Fong CY and Ratnam SS. Preimplantation genetics: chromosomes of fragmented human embryos. *Fertil Steril* 1991; 56: 66-70.
- Bongso A, Fong CY, Ng SC and Ratnam SS. Human ampullary cocultures for blastocyst transfer in assisted reproduction. *Ann Acad Med Singapore* 1992; 21: 571-5.
- Bongso A, Fong CY, Ng SC and Ratnam SS. Coculture techniques for blastocyst transfer and embryonic stem cell production. *Assist Reprod Reviews* 1995; 5: 106-14.
- Braude P, Bolton V and Moore S. Human gene expression first occurs between the four and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988; 332: 459-61.
- Campbell S, Swann HR, Aplin JD, et al. CD44 is expressed throughout pre-implantation human em-

- bryo development. Hum Reprod 1995; 10: 425-30.
- Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP, et al. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. Hum Reprod 1990; 5: 7-13.
- Conaghan J, Handyside AH, Winston RML and Leese HJ. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos *in vitro*. J Reprod Fertil 1993; 99: 87-95.
- Dokras A, Sargent LL, Ross C, et al. The human blastocyst: morphology and human chorionic gonadotrophin secretion *in vitro*. Hum Reprod 1991; 6: 1143-51.
- Dokras A, Sargent IL and Barlow DH. Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? Hum Reprod 1993; 8: 2119-27.
- Eagle H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science 1959; 130: 432-7.
- Edwards RG. Test-tube babies. Nature 1981; 293: 253-6.
- Fong CY, Bongso A, Ng SC, Anandakumar C, Trounson A, Ratnam S. Ongoing normal pregnancy after transfer of zona-free blastocysts: implications for embryo transfer in the human. Hum Reprod 1998; 12: 557-60.
- Fong CY, Bongso A, Ng SC, et al. Blastocyst transfer after enzymatic treatment of the zona pellucida: improving IVF and understanding implantation. Hum Reprod 1998; 2926-32.
- Gardner DK. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. Cell Biol Int 1994; 18: 1163-79.
- Gardner DK, Pawelczynski M and Trounson A. Nutrient uptake and utilization can be used to select viable day 7 bovine blastocysts after cryopreservation. Mol Reprod Dev 1996; 44: 472-5.
- Gardner DK, and Lane M. Culture and selection of viable human blastocysts: a feasible proposition for human IVF? Hum Reprod Update 1997; 3: 367-82.
- Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. Fertil and Steril 1998; 69: 84-8.
- Gardner DK and Lane M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. Biol Reprod 1993; 48: 377-85.
- Gardner DK, Lane M and Spitzer A, et al. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. Biol Reprod 1994; 50: 390-400.
- Gardner DK and Lane M. Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CR1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. Hum Reprod 1996; 11: 2701-12.
- Gardner DK, Lane MW and Lane M. Bovine blastocyst cell number is increased by culture with EDTA for the first 72h of development from the zygote. Theriogenology 1997; 47: 278.
- Gardner DK and Leese HJ. Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured preimplantation mouse embryos. Hum Reprod 1986; 1: 25-7.

- Gardner DK and Leese HJ. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. J Reprod Fertil 1990; 88: 361-8.
- Gardner DK and Sakkas D. Mouse embryo cleavage, metabolism and viability: role of medium composition. Hum Reprod 1993; 8: 288-95.
- Hardy K, Handyside AH and Winston RML. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development *in vitro*. Development 1989; 107: 597-604.
- Hardy K. Development of human blastocysts *in vitro*. In Bavister, B.D.(ed.) Preimplantation Embryo Development. Serono Symposium, Springer Verlag, NewYork, 184-199; 1993.
- Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A and Lolatgis N, Wood C. Evolution of a culture protocol for succesful blastocyst development and pregnancy. Hum Reprod 1998; 13: 169-77.
- Lane M and Gardner DK. Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. J Reprod Fertil 1994; 102: 305-12.
- Lane M and Gardner DK. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. J Reprod Fertil 1997; 109: 153-64.
- Menezes YJR, Hazout A and Dumant M. Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in human. Hum Reprod 1992; 7: 101-6.
- Miller JGO and Schultz GA. Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. Biol Reprod 1987; 36: 125-9.
- Olivennes F, Hazout A, Lelaidier C, et al. Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage. Hum Reprod 1994; 9: 2367-73.
- Pollard JW, Plante C and Leibo SP. Comparison of development of pig zygotes and embryos in simple and complex culture media. J Reprod Fertil 1995; 103: 331-7.
- Pool TB, Atiee SH and Martin JE. Oocyte and embryo culture. Basic concepts and recent advances. Infertil Reprod Med Clin N Amer 1998; 9: 181-203.
- Qinn P. Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. J Assist Reprod Genet 1995; 12: 97-105.
- Qunn P, Kerin JF and Warnes GM. Improved pregnancy rates in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertil Steril 1985; 44: 493-8.
- Rawlins R, Pool T, Fahy M, et al. Improved clinical pregnancy rates for IVF/embryo transfer using glucose- and phosphage-free HTF medium (P1) compared to HTF medium. J Assist Reprod Genet (suppl.), 14, 133S(abstract PP-09-155) 1997.
- Sakkas D, Jaquenoud N, Leppens G, et al. Comparison of results after *in vitro* fertilized human embryos are cultured in routine medium and in co-culture on Vero cells: a randomized study. Feril Steril 1994; 61: 521-5.
- Schillaci R, Ciriminna R and Cefalu E. Vero cell effect on *in vitro* human blastocyst development: preliminary results. Hum Reprod 1994; 9: 1131-5.
- Schulz GA, Kaye PL, McKay DJ and Johnson MH. Endogenous amino acids pool sizes in mouse

eggs and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 1981; 61: 387-93.

Scoltes MCW and Zeilmaker GH. A prospective, randomized study of embryos transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996; 65: 1245-8.

Seshagiri PB and Bavister BD. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the Crabtree effect'. *Mol Reprod Dev* 1991; 30: 105-11.

Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, et al. Lamb birth weight following transfer is affected by the culture system used for pre-elongation development of embryos. *Biol Reprod* 1995; 53: 1385-91.

Van Blerkom J. Development of human embryos to the hatched blastocyst stage in the presence or absence of a monolayer of Vero cells. *Hum Reprod* 1993; 8: 1525-39.

Van Winkle LJ. Amino acid transport in developing animal oocytes and early conceptuses. *Biochim Biophys Acta* 1988; 947: 173-208.