

Blastocyst Culture in Human IVF-ET Program

부산 세화병원 불임클리닉

김 종 흥

1. 서 론

시험관아기기술에 있어서 임신율은 체외환경과 체내환경의 여러 가지 복합적 요인이 그 변수로 작용하고 있으며 그 중에서도 특히 수정란의 분화정도와 quality는 체외에서 확인이 가능한 매우 중요한 요인이라 할 수 있을 것이다.

수정된 수정란은 착상 전까지 다음과 같은 연속적인 단계로 발육해 나간다.

① 수정 후 첫 분할 (first cleavage; 2-cell) ② 상실배 (morula) 이전의 분할 ③ 상실배의 할구 치밀화 (compaction) ④ 포배기 (blastocyst) ⑤ 부화 포배기 (hatched blastocyst) 과정으로 나눌 수 있다. 이와 같은 난할시기의 초기배는 투명대 내에서 세포분열을 거듭하여 각 세포분열마다 그 크기가 반으로 감소하여 점차로 작아진다. 이 시기를 거치는데 요구되는 시간은 동물 종간에 따라 차이가 있으며 특히 모계로부터 초기배 게놈 (genome)의 활성화로 전환되는 시기 역시 다르다.

이와 같은 과정을 체외에서 유지시키기 위해서는 배양체계의 확립은 필수적이다. 1950년 Morgan 등이 TCM-199을, 1963년 Ham에 의해 Ham's F-10이라는 배양액이 개발된 이래 이 배양액들은 지금까지도 체세포 (somatic cell)의 배양에 있어서 그 탁월한 효과를 인정받고 있으며 동물을 비롯한 사람의 수정란 배양에 이르기까지 많이 이용되어 왔다.

그러나 이와 같은 기존의 체세포 배양액만으로 수정란을 배양할 경우 대다수의 포유동물 수정란은 체내 발생기작과는 달리 착상 전 단계인 포배기 (blastocyst)로의 이행이 진행되지 않고 그 이전에 세포분열이 중지되는 종 특유의 체외발육정지 (blocks to development in vitro) 현상이 나타난다. 예를 들면 생쥐와 햄스터의 수정란은 2세포기에서 (Cross and Brinster, 1973; Whittingham and Bavister, 1974), 쥐나 돼지는 2~4세포기에 (Mayer and Fritz, 1974; Whittingham, 1975; Davis and Day, 1978), 그리고 소나 양은 8~16세포기에 (Wright and Bondioli, 1981) 각각 발생이 중지된다.

사람에 있어서도 이러한 cell block 현상의 존재 유무로 이견은 많았으나 사람도 예외 없이 대부분의 수정란에서 4~8세포기에 이러한 현상이 나타난다고 한다 (Dokras et al., 1993). 이러한 체외발육정지현상을 극복하기 위해 많은 연구자들에 의해 개발된 배양방법을 크게 2가지로 나누어 보면 첫째, 수정란을 somatic cell과 함께 공동배양 (co-culture)하는 방법이고 둘째, 배양액의 조성성분에 변화를 주는 방법을 들 수 있다.

이에 본장에서는 blastocyst culture에 효과적인 방법으로 제시되고 있는 배양법과 이러한 배양에 있어서 기본이 되는 배양액 pH control의 기본 원리에 관하여 고찰하고자 한다.

2. 본 론

전술한 바와 같이 체외발육정지현상을 타파하기 위한 방법으로서 이전부터 가능한 체내조건에 근접한 배양환경 또는 다른 메카니즘을 이용하여 수정란을 배양하려는 연구가 많이 시도되어 왔다. 수정란의 체외배양 시 blastocyst로의 발생률을 높히려는 시도는 방법에 따라 크게 두 가지로 나누어 볼 수 있다. 하나는 somatic cell과 co-culture함으로써 체내와 유사한 환경을 조성해 주는 방법이고, 다른 하나는 기존의 배양액 내에 각종 물질을 제거하거나 또는 첨가함으로써 배양액의 조성성분에 변화를 주는 방법이다.

1) Co-culture (공배양)와 Conditioned medium (순화배지)

소에 있어서는 체외 8-cell block을 극복하기 위하여 많은 연구자들이 somatic cell을 이용하여 초기 수정란과 체외에서 co-culture함으로써 포배기 (blastocyst)까지의 발육을 가능케 하여 많은 산자를 얻을 수 있게 되는 큰 성과를 올렸고 (Rexroad, 1989; Fukui, 1990), 또한 사람에게 있어서도 매우 효율적인 배양법으로 제시되고 있다 (Bongso et al., 1990, 1993).

Co-culture를 하기 위해서는 우선 feeder layer (지지세포층)를 형성시켜야 하며 이 feeder layer란 다른 세포의 증식을 돕는 물질을 생산하는 세포층으로서 원래 세포 주위의 배지를 세포증식의 효과가 있도록 colony 형성을 올릴 목적이나, 배양하기 곤란한 세포의 배양화를 목적으로 이용되었다 (Puck et al., 1956).

부유 상태에서 증식하는 세포도 있으나 주로 대다수의 세포들은 배양 용기의 바닥면에 부착되지 않으면 잘 자라지 않는다. 전자의 방식을 suspension culture (부유 배양), 후자를 monolayer culture (단층 배양) 또는 anchored culture (부착 배양)라고 한다. 특히 수정란과의 co-culture는 후자의 방법이 이용되므로 효과적인 배양을 위해서는 세포 부착성이 뛰어난 배양 용기를 사용할 필요가 있다.

초기배와 somatic cell과의 co-culture에 의한 blastocyst culture는 토끼 (Carney et al., 1990), 소 (Eyestone et al., 1989), 생쥐 (Sakkas et al., 1990) 및 사람 (Wiemer et al., 1989; Menezo et al., 1990; Saito et al., 1994)에 이르기까지 이미 많이 보고되어 있다. 초기배의 co-culture에 이용되는 feeder layer는 난관상피세포 (Takeuchi et al., 1992; Carney et al., 1990; Eyestone et al., 1989; Sakkas et al., 1990), 자궁내막세포 (Wiemer et al., 1989), Vero cell(Menezo et al., 1990) 및 cumulus cell (Saito et al., 1994) 등이 주로 이용되며 사람에게 있어서도 IVF-ET program에 응용되어 양질의 blastocyst 발육이 가능하다.

이와 같은 다수의 보고로 미루어 볼 때 초기배와 co-culture 시 여러 종류의 somatic cell이 feeder layer로서 효과가 있으며 종 특이성 또한 없는 것으로 여겨진다.

Co-culture 효과에 있어서 그 메카니즘은 아직 완전히 밝혀지지 않았으나 예상되고 있는 일반적인 가설로서는 첫째, feeder layer에 의한 유해물질의 중화작용으로서 즉, 체외배양 시 나타나는 superoxide나 H_2O_2 와 같은 reactive oxygen을 somatic cell이 제거해주며 (Pabon et al., 1989) 배양액 내의 산소조건을 낮게 해주거나 배양액에 free-radical을 제거할 수 있는 anti-oxident를 생산하는 것으로 추측하고 있으며 (Fukui et al., 1991), 둘째, feeder layer에 의한 수정란 발생촉진인자의 방출설로서 분비되는 저분자 물질 또는 단백질 성분의 물질이 관여하여 blastocyst로

의 발육을 증진시킨다고 보고되고 있으나 그 본질적인 메카니즘은 아직 확실히 규명되지 않고 있다 (Minami et al., 1992).

Co-culture하에서는 세포의 상태, 배양액의 색, 배양액의 교환시기 등을 주의하면서 적정시기에 새로운 배양액으로 교환해 주어야 한다. 이때 찬 배양액을 그냥 교환하면 부착면으로부터 세포가 떨어지거나 상태가 나빠지는 경우가 많으므로 항상 pH 평형을 이룬 37℃의 신선배양액으로 교환하여야 한다.

이와 같이 blastocyst 발생률 증가는 somatic cell과 직접 co-culture 시 뿐만 아니라 somatic cell 배양 후의 상층배지인 conditioned medium을 이용하여도 같은 효과가 나타난다. Conditioned medium에는 세포의 증식에 관여하는 많은 미지인자가 포함되어 있을 것으로 추정되나 아직까지 밝혀진 바로는 Colony Stimulating Factor (CSF), Insulin-like Growth Factor (IGF), Sarcoma Growth Factor (SGF), Multiplication Stimulating Factor (MSF) 등의 특정성장인자 외에는 불분명한 점이 많다.

Co-culture나 conditioned medium 제작용으로 사용되는 세포는 반드시 감염원이 없는 증식이 활발한 세포를 이용하여야 하며 배양 중 수시로 관찰하여 배양 상태가 양호한 것을 이용해야 한다. 또한 배양할 세포의 증식은 세포의 종류, 농도, conditioning 시간 및 배양의 목적에 따른 최적 조건을 예비실험을 통하여 결정해야 한다.

Conditioned medium을 이용하는 배양일 경우 주로 새로운 배지에 이것을 통상 10~30% 첨가하여 사용하며, 즉시 사용하지 않는 경우에는 동결보존하여 두는 것이 좋다. 현재 특성이 밝혀진 특정성장인자는 손쉽게 구할 수 있으나 이러한 기지인자뿐만 아니라 conditioned medium을 이용한 미지성장인자의 이용도 수정란의 blastocyst로의 배양에 극히 효율적인 방법이 될 수 있을 것이다.

그러나 co-culture system에서 이용되는 somatic cell의 monolayer와 수정란 사이의 상호작용과 기작은 아직 명쾌한 해답을 얻지 못하고 있으며 다만 somatic cell이 미지의 성장촉진인자를 방출하는 것으로 보고 있다 (Eyestone and First, 1989). 따라서 수정란에 대한 기초 연구에 있어서 somatic cell과의 co-culture는 수정란 대사작용의 명확한 이해를 도모하기는 어려우며 somatic cell의 처리 및 배양과정에서 오염문제가 발생되기 쉽고 정기적인 신선 배양액의 교환 등 실로 수반되는 어려움은 많으나 동물과 사람 수정란의 cell block을 타개하기 위한 방법으로서 많이 이용되고 있다.

2) Somatic cell co-culture free medium

이와 같이 co-culture에 의해 blastocyst까지 체외발육은 가능하나 그에 수반되는 여러 번거로움으로 인하여 보다 간편한 방법으로 이러한 문제를 해결하려는 연구가 많이 시도되어 왔다. 즉, 배양액의 조성에 변화를 주어 배양액만으로 체외발육정지현상을 극복시킬 수 있는 방법 (somatic cell co-culture free medium)으로서 소 (Kim et al., 1993 a, b), 쥐 (Miyoshi et al., 1994) 등에서 제시되었고 특히 사람 (Conaghan et al., 1993; Quinn et al., 1995)에 있어서도 많은 접근이 이루어wu 현재 상품화된 배양액도 상당수 존재하지만 시판되고 있는 배양액들의 실질적인 효과에 대해서는 아직도 이견이 많다.

현재까지 밝혀진 바로는 TCM-199이나 Ham's F-10 등 주요 기존의 배양액 내에 함유된 glucose가 대다수의 동물종에서 나타난 체외발육정지현상의 주된 요인이었고, 그밖에도 동물종

별로 배양액 구성성분간에 많은 차이가 있다는 점이 밝혀졌다. 필자의 연구 (Kim et al., 1993 a, b)에 있어서는 소 수정란의 발육초기에 glucose와 phosphate가 존재할 경우 강력한 체외 8-cell block을 나타내며 glucose 대신 pyruvate 또는 lactate 등의 다른 에너지원으로 대체하면 이러한 현상이 나타나지 않고 순조롭게 blastocyst까지 발육이 가능하였다. 이러한 현상은 사람 (Conaghan et al., 1993)과도 흡사한 양상을 보이고 있다. 그러나 이와는 반대로 inbred계통의 생쥐 (Brown and Whittingham, 1991)나 쥐 (Miyoshi et al., 1994)에 있어서는 glucose에 의한 체외 발육정지현상이 나타나지 않고 오히려 glucose가 배양액 내에 존재하지 않을 경우 blastocyst로의 발육이 진행되지 않으며 특히 극미량의 phosphate에 의해서도 2-cell block현상이 나타난다는 것이 밝혀졌다.

이와 같이 수정란의 초기분할과정에 있어서 glucose의 저해작용이 나타나는 동물종의 공통점은 8-cell 이전의 단계에서는 phosphofructokinase라는 효소의 불활성화로 인해 해당작용이 이루어지지 않으며 이로 인해 오히려 대사과정 중 H₂O₂와 Uric acid 같은 저해물을 생성시켜 배양 중 수정란의 조기 사멸을 조장시킨 주된 원인이었고 16-cell 이후에는 이 효소의 활성화가 이루어져 glucose가 에너지원으로 이용된다는 설이 유력하게 대두되고 있다 (Rieger, 1992).

3) 배양액의 pH control

배양액의 pH는 ①세포수 ②세포종의 대사에 따른 유산 생성량 ③온도 ④기상과 액상의 비율 ⑤NaHCO₃ 농도 등에 따라 변화한다.

많은 배양액의 pH는 CO₂-NaHCO₃ 완충계에 의해 control되고 있다. 세포배양 시 인산완충계, 혈청단백질 등도 pH의 안정에 작용하고 있으나 CO₂-NaHCO₃ 완충계 만큼 그 작용은 크지 않다. [표]에 나타나 있는 바와 같이 CO₂-NaHCO₃ 완충계에 있어서 CO₂의 농도가 일정할 경우 pH는 CO₂-NaHCO₃의 농도에 비례한다. 즉 NaHCO₃의 농도가 10배가 되면 pH는 1.0이 상승한다. 단, 공기 중에는 CO₂가 약 0.03%밖에 포함되어 있지 않으므로 평형에 달할 때까지 CO₂가 기상으로 이행하고 pH가 상승한다. 이때 기상의 용량이 액상보다 많을수록 pH의 상승도가 높

[표] NaHCO₃ - 5% CO₂ 첨가 공기완충계

pH (37℃)	Concentration of NaHCO ₃	
	mM	g/l
6.0	0.586	0.049
8	0.929	0.078
4	1.470	0.123
6	2.330	0.196
8	3.700	0.311
7.0	5.860	0.492
2	9.290	0.781
4	14.700	1.230
6	23.300	1.960
8	37.000	3.110
8.0	58.600	4.920

주) 온도가 1℃하강함에 따라 NaHCO₃ (분자량 84.02)의 농도를 1.88%씩 첨가하면 같은 pH를 유지한다

아진다. 또 CO₂의 액상에서의 용해도는 온도가 높을수록 감소하므로 실온에서 조절된 pH가 37°C의 배양기에 넣으면 약간 상승한다. 이 상승도는 기상과 액상의 비율에 따라 다르지만 약 0.2~0.4 정도이다.

이상은 세포를 포함하지 않은 배양액의 pH 변동이고 여기에 배양세포가 있을 경우 세포의 대사로 인해 pH는 한층 변화하게 된다. 즉, 세포는 호흡에 의해 CO₂를 발생시키고 또 해당작용에 의해 유산을 생성한다. 이 유산 생산량은 배양액으로부터 소비되는 포도당의 양과 거의 반비례하며 1 M의 유산이 생산되면 1 M의 CO₂가 발생하여 기상 중으로 이행한다. 여기서도 NaHCO₃가 pH의 조절에 작용한다. 그러나 세포수가 많아지면 pH 조절의 기능을 상실하게 되어 배양액의 pH는 저하하게 된다. 체세포 또는 체세포와 수정란의 co-culture 시 배양액을 정기적으로 교환해 주는 이유는 바로 여기에 있다. 배양액의 pH를 중성~약염기성으로 유지하기 위해 이용되는 NaHCO₃는 실온에서도 산성기의 존재로 용액 중으로부터 CO₂를 발생시켜 CO₂를 잃음에 따라 배양액의 pH가 염기성으로 기울게 된다. 이를 위해 NaHCO₃를 사용하는 배양액은 배양액으로부터 기상으로의 CO₂ 확산 손실을 줄이기 위해 5% CO₂, 95% O₂ 기상조건의 환경을 조성할 필요가 있다. 일반적으로 pH가 7.0보다 낮아지면 대사활동이 저하되므로 배양액을 교환하던가 pH를 올려주어야 한다. 이러한 pH의 변화를 쉽게 확인하기 위해 대부분의 세포배양액에는 pH 지시약인 phenol red가 미량 첨가되어 있다. phenol red는 배양액 중 혈청이나 알부민이 첨가된 경우 난자에 독성은 없으나 알부민 계통이 첨가되지 않은 순수한 실험 목적의 배양액에는 지시약으로 사용하지 않는 것이 좋다.

3. 맺음말

현재 시험관아기기술에 있어서의 임신성공율은 초창기에 비하여 많이 향상되었다. 그 이유로서는 여러 가지 측면으로 해석해 볼 수 있으나 그 중에서도 단연 수정란의 long term culture가 가능해진 것을 꼽을 수 있다. 기존의 배아 이식은 short term culture에 의존하여 주로 4-cell 단계에서 자궁 내 이식을 하여 왔으나 근래에 들어서는 blastocyst 이식까지도 많이 행하여지고 있다. 이것이 가능하게 된 것은 co-culture 또는 새로운 배양액의 개발로 체외에서도 long term culture가 가능해졌기 때문이다.

소를 비롯한 대부분의 동물에서는 blastocyst를 주로 자궁 내에 이식하고 있으며 그 이전 단계에서는 거의 임신이 이루어지지 않는 것으로 잘 알려져 있다. 이러한 양상과는 달리 사람은 타 동물에 비해 implantation window가 비교적 넓다고 알려져 있으며 4-cell~blastocyst에 이르기까지 각각의 발생 단계에 자궁 내 이식을 하여도 임신율의 차이는 있으나 대체로 임신이 되고 있다. 그러나 기존의 4-cell 배아 이식과 blastocyst 배아 이식의 임신율을 비교해 볼 때 blastocyst 이식이 월등히 높은 성적을 나타내고 있는 것은 주지의 사실이다.

따라서, human IVF-ET에 있어서 기존의 배양 방식을 탈피하여 생체 내의 배아 발육단계상 자궁내막의 수용능력에 알맞은 발육단계 (morula~blastocyst)까지 체외에서 안정적으로 발육시킬 수 있는 culture system의 확립이 절실히 요구된다.

REFERENCES

- Bongso A, Ng SC and Ratnem SS. Co-cultures: their relevance in assisted reproduction. *Hum Reprod* 1990; 5: 893-900.
- Bongso A, Fong CY, Ng SC and Ratnam S. The search for improved in vitro systems should not be ignored : embryo co-culture may be one of them. *Hum Reprod* 1993; 8: 1155-62.
- Carney EW, et al. Co-culture of rabbit one-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990; 26: 629-35.
- Conaghan J, Handyuside AH, Winston RML and Leese H. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 87-95.
- Cross PC and RL. Brinster. The sensitivity of one-cell mouse embryos to pyruvate and lactate. *Exp Cell Res* 1973; 77: 57-62.
- Davis DL and Day BN. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs in vitro. *J Anim Sci* 1978; 46: 1043-53.
- Dokras A, Sargent IL and Barlow DH. Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Hum Reprod* 1993; 8: 21-7.
- Eyestone WH and First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fertil* 1989; 85: 715-20.
- Fukui Y. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 40-6.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh A and Tervit HR. Factors affecting the in vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 1991; 92: 125-31.
- Ham RG. An improved nutrient solution for diploid chinese hamster and human cell lines. *Exp Cell Res* 1963; 29: 515-26.
- Kim JH, Funahashi H, Okuda K and Niwa K. Glucose requirement at different developmental stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi defined medium. *Theriogenology* 1993a; 39: 875-86.
- Kim JH, Niwa K, Lim JM and Okuda K. Effects of phosphate, energy substrates and amino acids on development of in vitro matured, in vitro fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free, culture medium. *Biol Reprod* 1993b; 48: 1320-5.
- Mayer JF and HI. Fritz. The culture of preimplantation rat embryos and the production of allophenic rats. *J Reprod Fert* 1974; 39: 1-9.
- Menezo YR, et al. Improvement of human early embryo development in vitro by co-culture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod* 1990; 42: 301-6.
- Minami N, Utsumi K and Iritani A. Effects of low molecular weight oviductal factors on the development of mouse one-cell embryos in vitro. *J Reprod Fert* 1992; 96: 735-45.
- Miyoshi K, Funahashi H, Okuda K and Niwa K. Development of rat one-cell embryos in a chem-

- ically defined medium: effects of glucose, phosphate and osmolarity. *J Reprod Fertil* 1994; 100: 21-6.
- Morgan JF, Morton HJ and Parker RC. Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. *Proc Soc Exp Biol Med* 1950; 73: 1-8.
- Pabon JE, Findly WE and Gibbons MD. The toxic effects of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril* 1989; 51: 896-900.
- Puck TT, Marcus PI and Cieciura SJ: Clonal growth of mammalian cells in vitro. Growth characteristics of colonies from single Hela cells with and without a "feeder" layer. *J Exper Med* 1956; 103: 273-84.
- Quinn P, Monippanah R, Steinberg JM and Weathersbee PS. Successful human in vitro fertilization using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate ions. *Fertil Steril* 1995; 63: 922-4.
- Rieger D. Relationship between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology* 1992; 37: 75-93.
- Rexroad CE. Co-cultured of domestic animal embryos. *Theriogenology* 1989; 31: 105-12.
- Saito H, et al. Cumulus mass maintains embryo quality. *Fertil Steril* 1994; 62: 555-8.
- Sakkas P, et al. Co-culture of mouse embryos with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pregnancy. *J Reprod Fertil* 1990; 90: 109-18.
- Takeuchi K, et al. Primary culture of human fallopian tube epithelial cells and co-culture of early mouse pre-embryos. *Mol Reprod Dev* 1992; 32: 236-42.
- Whittingham DG and BD. Bavister. Development of hamster eggs fertilized in vitro and in vivo. *J Reprod Fert* 1974; 38: 489-92.
- Whittingham DG. Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J Reprod Fert* 1975; 43: 575-8.
- Wiemer KE, et al. Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts; Embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989; 52: 503-8.
- Wright RW and Bondioli KR. Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals. *J Anim Sci* 1981; 53: 702-29.