

IVF-ET Program에서 Blastocyst 배아의 발생에 관한 연구 II. 난구세포 공동배양에 의한 Blastocyst 배아의 발생

마리아 산부인과, 마리아 기초의학연구소*

이석원 · 윤산현 · 윤혜균 · 조현진 · 허용수 · 윤혜진 · 박세필* · 이원돈 · 임진호

The Studies on the Development of Human Blastocyst Embryos in IVF-ET Program II. The Development of Human Blastocyst Embryos by co-culture with Cumulus Cells

Suk Won Lee, San Hyun Yoon, Hye Gyun Yoon, Hyon Jin Cho, Yong Soo Heo,
Hye Jin Yoon, Sepill Park*, Won Don Lee and Jin Ho Lim

*Maria Obs./Gyn., Maria Infertility Medical Institute**

= Abstract =

This study was carried out to investigate the development rates of human embryos co-cultured with cumulus cells to each blastocyst stage. Human zygotes were co-cultured on cumulus cell monolayer in YS medium supplemented with 20% hFF. On day 2, if patient had four or more "good" embryos (regular blastomeres without fragmentation), embryos were further cultured for 72hrs. Blastocysts on day 5 were classified into early blastocyst (ErB), early expanding blastocyst (EEB), middle expanding Blastocyst (MEB), and expanded blastocyst (EdB) on the basis of their morphological aspects of trophoctoderm cells and blastocoele. Subsequently, maximum 3 of best blastocysts were transferred in 486 cycles.

The results in this study were as follows: Patients who had four or more "good" embryos on day 2 were 498 persons, but patients whose embryos could not be transferred due to failure in development to the blastocyst stage on day 5 were 12 persons (2.4%). The development rate of embryos to the blastocyst stage was 58.2% (2,885/4,957) on day 5, and the rates that developed to the ErB, EEB, MEB, and EdB stage were 15.0% (743/4,957), 14.9% (739/4,957), 14.4% (714/4,957), and 13.9% (689/4,957), respectively. Total 1366 blastocysts were transferred in 486 cycles (mean number=2.81). The implantation rate and the ongoing implantation rate obtained by observing the number of G-sac and FHB were 29.9% (409/1,366) and 22.5% (308/1,366), respectively. The clinical pregnancy rate was 51.2% (249/486), and the ongoing pregnancy rate was 39.1% (190/486). Among women showing ongoing pregnancy, women with singleton were 50% (95/190), women with twin were 37.9% (72/190), and women with triplet were 12.1% (23/190). Although triplet pregnancy rate in this study was high such as 12.1%, because many blastocysts with high viability were produced in our co-culture system using cumulus cells on day 5, we really believe that a multiple pregnancy except twin should not occur by selecting good embryos for maximum two blastocyst transfer.

These results demonstrate that autologous cumulus cells may be used for the production of

blastocysts with high developmental competence, and the use of autologous cumulus cells to be collected easily, and to be treated conveniently at OPU must be an effective means for obtaining high implantation and pregnancy rate.

Key Words: Blastocyst, Coculture, Autologous cumulus cell

서 론

대규모 임상실험에서 GIFT가 IVF-ET보다 임신율이 높게 나타나는 것은 적합치 않은 배양체계에서 비롯되며, 이는 장기간 체외 환경에서도 나팔관 환경에서와 같은 수정란의 발생이 이루어지도록 하는 program 개발의 필요성을 제시한 것으로 볼 수 있다. 최근 들어 임신율이 60~70% 정도로 높은 가족의 포배기배아 이식 program과 같이 사람에서도 포배기배아를 이식할 수 있도록 하기 위하여 배양액을 비롯한 배양조건을 개선하여 포배기배아 발생을 증진시키려는 연구가 진행되고 있다. 배양체계가 개선되어 포배기배아의 발생률을 높일 수 있다면, 많은 불임센터에서 포배기배아 이식을 실시할 것이다.

포배기배아 이식은 배아와 자궁간의 접촉시기 및 환경을 자연스럽게 일치시켜 주므로 착상률을 증가시킬 수 있고, 체외발생 과정에서 우수한 배아가 선택되어지므로 이식하는 배아의 수를 조절하여 다태아발생률을 낮출 수 있다 (Quinn, 1994). 또한 포배기배아를 이용하여 이식하기 전에 유전적 결함의 진단 가능성을 증진시키며 (Pickering *et al.*, 1995), 냉동보관에 있어 생존율을 높이는 등의 장점이 있다. 그러나 전통적인 배양체계에서는 포배기배아의 발생률이 25~30%로 낮기 때문에, 배양체계 개선의 일환으로 자타 중의 체세포와 수정란을 함께 배양하는 공동배양법의 개발이 활발히 진행되고 있다. Gandolfi 등 (1987, 1989)은 소의 난관상피세포와 양의 수정란을 공동배양하였으며, 나아가 Wiemer 등 (1989)은 소의 자궁섬유아세포와 사람 수정란을 공동배양하여 체외 발달률, 착상률 및 임신율을 증진시켰고 (1989), Bonso 등 (1989)은 사람 수란관 팽대부세포 (ampullary cells)를 공동배양에 이용하여 69%라는 높은 포배기배아 발생률을 얻었으며, 착상률 및 임신율 또한 증진시켰다고 보고하였다. 한편 Menezo 등 (1992)과 Olivennes 등 (1994)은 사람 수정란을 VERO세포주와 공동배양하여 각각 41%, 60%의 포배기배아 발생률을 얻었다. 이외에도 세

포형태나 기원조직에 비의존적인 세포주들이 공동배양에 이용되었으며, 심지어는 HeLa와 같은 암세포주도 공동배양 시도에 이용되어 우수한 포배기배아 발생률을 얻었다고 보고하고 있다 (Ben-Chetrit *et al.*, 1996). 그러나 이와 같은 세포는 취급 및 배양과정이 복잡하므로 이용이 불편하며, VERO와 HeLa는 각각 원숭이 기원 및 암세포 기원의 세포주로서, 사람수정란 공동배양에 이용할 경우, 생리적, 윤리적 논란을 야기시킬 수 있는 등의 단점이 있으므로, 최근에는 자신의 난구세포를 이용한 공동배양에 관한 연구가 진행되고 있다 (Quinn & Margalit, 1996; Freeman *et al.*, 1995). 이들은 난구세포와 수정란을 공동배양하여 여러 체세포에서 얻어지는 공동배양효과에 상응하는 우수한 결과를 얻었다. 이와 같은 내용을 근거로 하여 본 연구에서는 YS 배양액에 10% 난포액을 첨가하여 수정된 2PN 난자를 난구세포와 4일동안 공동배양하였을 때, 각 단계별 포배기배아 발생률을 조사하고, 형태학적으로 가장 양호한 배아를 최대한 3개까지 환자의 자궁에 이식하였을 때 착상률 및 임신율을 조사하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 1997년 4월말부터 동년 9월말까지 본 마리아 산부인과 불임클리닉에서 체외수정술을 실시한 환자를 대상으로 498주기에서 실시하였다.

2. 난자채취

생리주기 약 10일전부터 매일 0.6 ml의 GnRH-agonist (Buserelin, Serono)를 피하주사한 다음 생리주기 2~3일째부터 hCG를 투여할 때까지 2~3 ampule의 FSH/hMG 또는 hMG (Serono) 및 0.3 ml의 Buserelin을 매일 투여하였다. 직경이 17~18 mm 이상인 난포가 2개 이상 확인될 경우 10,000 IU의 hCG를 투여하여 과배란을 유도한 다음 38시간 후 질식 초음파를 이용하여 난자채취를 실시하였다. 채취된 난자는 37°C, 5% CO₂ 농도 및 완

전습윤 상태로 조절된 수정란 조작기 (Manipulation chamber, 일진정공)내에서 난구세포의 특징을 기준으로 성숙여부를 판단한 후 10% 난포액 (hFF)이 첨가된 YS배양액에 옮겨 수정능력을 획득할 때까지 37°C, 5% CO₂배양기 (Forma)에서 배양하였다.

3. 정자의 준비

10% 난포액을 첨가한 Ham's F-10 배양액 3 ml로 희석한 정액을 300 × g에서 5분간 원심분리하였고 다시 희석한 정자용액을 1 ml의 등장 percoll용액 위에 올려놓고 300 × g에서 20분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 percoll용액 속에 있는 pellet만을 pasteur pipette으로 흡인하여 2회 세척한 후 swim up 시키면서 고효율 정자를 회수하였으며, 정자의 활력에 따라 1~2×10⁵ 정자를 1 ml의 수정용 배양액에 첨가하여 수정을 유도하였다.

4. 배양액

본원에서 사람 수정란을 체외 배양하기 위하여 사용한 기초 배양액은 YS배양액 (윤 등, 1994)이었다. 그 조성은 NaCl (110 mM), KCl (5 mM), CaCl₂ · 2H₂O (1 mM), MgSO₄ · 7H₂O (0.8 mM), NaHCO₃ (20 mM) 및 KHCO₃ (5 mM)으로 이루어졌으며 여기에 Taurine (0.2 mM), Glutamine (1 mM) 및 EDTA (0.1 mM)와 Sodium lactate (3 mM), Sodium pyruvate (0.4 mM), 10 ml의 antibiotic, antimycotic solution이 첨가되었다. 또한 MEM 수준의 non-essential amino acids와 vitamin, RPMI 1640 1/2수준의 amino acid가 포함되어 있다. 채취된 난자의 수정을 유도하는 배양액과 난구세포 배양용 배양액은 10% hFF가 첨가된 YS배양액이었으며, 성장용 배양액은 20% hFF를 첨가한 YS배양액이었다. 본 연구에 사용된 배양액은 모두 하루 전 37°C, 5% CO₂배양기에서 안정화시킨 후 사용하였다.

5. 난구세포의 채취 및 배양

난자채취시 성숙된 난자의 방사관 근처에 있는 난구세포피를 30 gauge 바늘로 분리하고 주변에 남아있는 난포막세포 (theca cell)를 제거한 다음, 수정용 배양액으로 2회 세척하고 배양용 배양액으로 1회 세척하였다. 0.0003%의 hyaluronidase가 첨가되고 10% hFF를 함유하는 YS배양액에서 난

구세포피를 모아 반복적으로 흡인, 배출하여 단일세포부유액 (single cell suspension)을 만들어서 1×10⁶ cells/ml의 농도로 조절하여 미리 준비된 미세소적 10 μl에 접종하였다. 3~4시간 동안 배양하여 단일층 (monolayer)으로 부착된 것을 확인한 다음 부착되지 않은 세포와 배양액에 포함된 hyaluronidase 및 잔여 세포피편을 제거하기 위하여 새로운 배양액으로 2회 세척한 후, 동량의 신선한 성장용 배양액으로 교환하였다. 다음날 확인된 수정란을 옮기기 전까지 약 18시간 동안 37°C, 5% CO₂배양기에서 전 배양하였다.

6. 수정확인 및 공동배양

수정을 실시한 18시간 후에 수정여부를 확인하기 위하여 난자주변에 남아있는 난구세포를 30 gauge 바늘로 제거한 다음, 자성전핵, 양성전핵 및 제2극체를 지닌 정상적인 수정란을 20% hFF가 첨가된 YS배양액으로 세척하고 단일층으로 잘 부착된 난구세포 미세소적으로 옮겨서 공동배양하였다. 난자 채취 2일째에 관찰하여 4개 이상의 수정란이 양호한 세포분열을 하고 있는 498주기를 선발하였으며, 이들 환자로부터 4,957개의 수정란을 얻어 포배기까지 배양하였다. 배양기간 1일 1회 신선한 성장용 배양액으로 교환하였다.

7. 포배기 수정란의 이식

4~5일 동안 난구세포와 공동배양한 수정란을 Dokras 등 (1993)의 기준을 참고하여 포배기배아와 포발생 상실배기 (Vacuolated morulae)배아는 구분하였으며, 이 중 포발생 상실배기배아는 엄격히 포배기배아에서 제외시켰다. 포배기배아는 형태학적으로 Early Blastocyst (ErB), Early Expanding Blastocyst (EEB), Middle Expanding Blastocyst (MEB), Expanded Blastocyst (EdB)로 구분하였다. 난자 채취 5일째에 1개 이상의 포배기배아가 발생하면 포배기배아의 수를 환자별로 조사하고, ICM (Inner Cell Mass)과 trophectoderm cells의 존재유무 및 부피를 관찰하여 건강한 포배기배아를 선발한 다음 환자 당 배아의 수가 3개가 넘지 않도록 자궁에 이식하였다. 난자채취 5일째에 포배기까지 발달한 배아가 없을 경우 24시간 동안 추가 배양하여 포배기배아가 발생할 경우 동일한 방법으로 이식을 실시하였다.

8. 착상 및 임신

포배기배아 이식을 실시한 다음 약 4~5주 후 태낭 (gestational sac)수 및 심장박동태아 (fetal heart beat)수를 관찰함으로써 착상률 및 임신을 조사하였다.

결 과

본 연구는 97년 4월말부터 9월말까지 본원에서 체외수정시술을 실시한 환자 중 난구세포 발달이 양호하며, 난자채취 2일째에 정상적인 세포 분열을 하고 있는 수정란 수가 4개 이상인 환자 498주기에서 공동배양 및 포배기배아 이식을 실시하기로 결정하여 조사하였다. Table 1에서 보는바와 같이 2개의 전핵 및 제2극체를 지닌 정상 수정란은 4,957개였으며 이 시기부터 난구세포와 20% hFF가 포함된 YS배양액에서 공동배양하여 난자채취 5~6일째에 포배기까지 양호하게 발달한 배아는 총 2,885개로 포배기배아 발생률은 58.2%로 나타났다. 이를 형태학적으로 구분하였을 때 ErB는 743개 (15.0%), EEB는 739개 (14.9%), MEB는 714개 (14.4%), EdB는 689개 (13.9%)로 관찰되었다.

난구세포와 공동배양하여 1개 이상의 포배기배아가 발달되면 ICM 및 trophoctoderm cells의 상태를 관찰하여 가장 양호한 포배기배아를 1개에서 3개까지 선별하여 이식하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 총 486주기에서 1,366개의 포배기배아를 이식하였으며 한 주기에서 평균 2.81개가 이식되었다. 착상률은 태낭 (G-sac)수를 관찰하여 조사하였으며, 409개로 29.9%였으며, 이후 심장

박동태아 (FHB)수는 308개로 관찰되었고 이로써 착상 진행률은 22.5%였다. 또한 공동배양에 의한 포배기배아 이식을 실시한 후 임상임신을 (clinical pregnancy rate)은 51.2%였으며, 진행임신을 (ongoing pregnancy rate)은 39.1%였다. 이식하는 배아의 수를 3개 이하로 제한하였으므로 삼태아를 초과하는 임신은 없었으며, 전체 임신 중 단태아, 쌍태아 및 삼태아 비율은 각각 50.0%, 37.9%, 12.1%로 나타났다.

고 찰

본 연구는 YS배양액을 기본배양액으로 하여 사람 수정란을 난구세포와 공동배양했을 때 각 단계별 포배기 배아의 발생률을 조사하고, 환자 당 3개 이하로 이식하였을 때 착상 및 임신율에 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구의 기초연구로 동일한 배양액에서 마우스 수정란을 사람 난구세포와 공동배양하였을 때 포배기배아 발생률 및 부화율을 상승시키는 결과를 얻었다. 또한 배양액의 양에 차등을 두어 공동배양 하였을 때 10 μ l의 양에서 가장 큰 효과가 나타났으며, 배양액 양이 증가함에 따라 효과가 감소함을 알 수 있었다 (자료에는 제시되지 않았음). 이와 같은 결과를 토대로 본 연구를 실시하게 되었으며, 결과에서 나타난 바와 같이 사람 난구세포의 공동배양에 의해 58.2%의 높은 포배기배아 발생률을 얻었다. 그러나 본원에서 이전에 기본배양액인 YS+gp 배양액의 glucose와 phosphate를 배제함으로써 포배기배아 발생률을 36.2%에서 50.9%로 크게 향상시

Table 1. The development rates of human embryos to each blastocyst stage on day 4 after co-culture with cumulus cells

	Co-culture with cumulus cells
No. of cycle	498
No. of ET cycle	486
No. of 2PN	4,957
No. of blastocyst embryos (%)	2,885 (58.2)
EB (%)	743 (15.0)
EEB (%)	739 (14.9)
MEB (%)	714 (14.4)
EdB(%)	689 (13.9)

Table 2. Outcomes of co-cultured blastocyst transfer

	Outcomes
No. of Embryo Transfer (ET)	486
Transferred Blastocyst (TB)	1,366
Mean no. of TB	2.81 \pm 0.12
Implantation	
G-sac (% /TB)	409 (29.9)
FHB+ (% /TB)	308 (22.5)
Clinical Pregnancy (CP %, /ET)	249 (51.2)
Ongoing Pregnancy (OG %, /ET)	190 (39.1)
single (% /OG)	95 (50.0)
twin (% /OG)	72 (37.9)
triple (% /OG)	23 (12.1)

킨 바 있으며 (허 등 1996), 본 연구에서는 난구 세포 공동배양에 의해 7.3% 더 상승시킴으로써 보다 건강하고 많은 수의 포배기배아를 얻게 되었다. 그러나 상승률의 폭이 다른 연구자들의 공동배양 효과에 비해 유의한 차이는 나타나지 않았다. 본 연구에서 포배기배아 발생률은 Freeman 등 (1995)의 68%보다는 다소 낮지만 Plachot 등 (1993)의 40%, Quinn 등 (1996)의 50%보다는 높은 발생률을 보임으로써, 이들의 결과와 함께 난구세포 공동배양법의 우수한 효과를 입증하는 또한 예라고 할 수 있다. 이 같은 공동배양의 효과는 현재까지는 단정적으로 규정하기는 어려우나 두 가지 측면에서 설명이 가능하다.

첫째는 공동배양하는 세포가 배아에 영양조절 성분이 되는 물질을 분비함으로써 나타나는 효과 (Positive conditioning)이다 (Bonso *et al.*, 1989). Gandolfi 등 (1989)은 양과 사람의 난관 상피세포에서 분비되며 난자 투명대에 특이적 결합을 하는 당단백질을 발견한 바 있다. 그러나 공동배양의 효과는 사람 수란관의 팽대부세포와 같은 특이적 조직 및 세포형태에 의존적이지 않으며 체세포나 이종의 세포에서도 나타나는 점은 주목할 만하다. 따라서 이와같은 효과는 공동배양에 이용되는 여러 종류의 세포들이 공통적으로 분비하는 성장인자 (Growth Factor)에 의해 나타날 가능성이 있다. Chia 등 (1995)은 초기배에 성장인자에 대한 수용체가 존재하며, 특정 성장인자는 ICM cell과 trophoctoderm cell간의 매개체 역할을 한다고 보고하였다. 이들의 결과는 성장인자가 초기배아의 발달에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 뒷받침해주는 결과라 할 수 있다. 또한 타세포를 전배양하여 조절된 배양액 (conditioned medium)에서 수정란을 배양할 경우, 공동배양 할 때와 유사한 유익한 효과가 나타나며, 그 효과는 배양액을 80℃에서 가열하거나 pronase를 처리할 경우 사라진다고 보고하였다 (Kobayashi *et al.*, 1992). 이들의 결과로부터 수정란과 세포간의 직접적인 접촉은 반드시 필요하지 않으며 세포가 분비하는 유익한 효과를 지니는 성분은 단백질계통임을 알 수 있다. 본 연구에서는 이와 같은 효과에 대해 확인하지는 못했으나, 공동배양의 효과가 positive conditioning에 의했을 가능성을 배제할 수는 없다.

둘째는 공동배양하는 세포에 의한 배양액 내의 배아 독성성분 제거효과 (negative conditioning)이다. 현재까지 수정란의 체외발달에 있어 최적의 배

양액은 확립되지 못했으며 각 센터는 기존의 배양액을 이용하거나 이들의 성분을 약간 조절하여 사용하고 있는 실정이다. 이들 배양액 성분 중에는 배아의 발달을 지연시키거나 할구단편화를 초래하는 등 수정란 발달에는 해롭지만, 반대로 공동배양하는 세포에게는 대사되어질 수 있거나 이로 인 성분 존재할 수 있다. 이와 같은 성분에 의해 야기되는 문제점은 공동배양 또는 이들 세포를 전 배양하여 조절된 배양액을 이용함으로써 다소 극복되어질 수 있다. Bavister (1992)는 공동배양 효과가 크다는 것은 배양액 내에 배아에 해로운 성분이 많이 존재하거나 제조공정에 오류가 있음을 시사하는 바라고 보고하였다. 본원에서 엄격한 정도관리에 의해 제조되는 YS배양액에도 아직 확인되지 않은 배아에 해로운 성분들이 포함되어 존재할 가능성이 있으며, 이러한 성분들이 공동배양에 의해 제거됨으로써 유익한 효과가 나타날 수 있으리라 사료된다. 이 밖에도 공동배양하는 세포가 산소대사 수준을 감소시켜 과산화물 및 활성산소기에 의한 손상으로부터 수정란을 보호하며, pH와 CO₂ 수준을 재조절해 주는데 기인하는 효과도 있으리라 생각된다. 위에 언급한 여러가지 가능성들은 단독이기보다는 복합적으로 또는 상승작용에 의해 나타날 것으로 사료된다. 본 연구에서는 난구세포의 공동배양에 의해 58.2%의 높은 포배기배아 발생률을 얻게 되어, 형태학적으로 건강한 배아를 선별하여 이식할 수 있었다. 따라서 이식하는 배아 수를 3개 이하로 줄일 수 있었으며, 이에 따른 임상임신율은 51.2%로 높게 나타났다. 또한 본 연구에서는 자신의 난구세포를 공동배양에 도입하여 다른 체세포들을 이용할 때의 계대배양과정이나 virus검색을 생략할 수 있어, 보다 쉽고 간편한 방법을 모색하였으며, 10% 난포액이 포함된 YS배양액에서 정상수정란을 난구세포와 공동배양함으로써 높은 포배기배아 발생률을 얻게 되었고, 이를 자궁에 이식하였을 때 역시 높은 착상률 및 임신율을 얻을 수 있었다. 이는 난구세포의 공동배양법이 체외수정기술에 있어 효율적 가치가 있다는 것을 시사한다고 할 수 있다. 그리고 이에 덧붙여 간과할 수 없는 점은 기본배양액 개선의 필요성이다. 기본배양액에 존재할 가능성 있는 배아에 해로운 성분은 배제시키며, 동시에 이로 인 성분을 검토하여 배아 발달 단계에 따른 배양액 또는 첨가제를 개발하는 일이 시급하다고 볼 수 있다. 이의

일환으로 공동배양의 효과를 검증해 나가는 일은 매우 중요하다. 본 연구에서 난구세포 공동배양법을 도입하여 그 효과를 얻었으나 공동배양의 최종목표는 최적의 배양액을 개발하는 것이라고 할 수 있다. 아울러 보다 안정된 공동배양법의 확립을 위하여 난구세포의 배양조건을 역시 개선해 나가야 할 것이며, 임상임신을 (51.2%)에 비하여 상대적으로 낮은 진행임신을 (39.1%)에 대한 보완을 위한 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 사람 난구세포를 수정란과의 공동배양에 이용하므로써 포배기배아의 발생률을 높이며, 착상률 및 임신율과 관련하여 포배기배아 이식법을 확립하고자 실시하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 난자채취 2일째에 4개 이상의 수정란이 양호한 세포분열을 하고 있는 498주기 중 5일째에 최소한 1개의 포배기 배아도 발생하지 않은 12주기 (2.4%)에서는 이식을 실시하지 못했다.

2. 총 498주기에서 4,957개의 2PN 수정란을 4일 동안 난구세포와 공동배양하였을 때 2,885개의 포배기 수정란 (58.2%)을 관찰할 수 있었으며, 포배기 배아의 발달단계를 형태학적으로 구분하였을 때 ErB, EEB, MEB 및 EdB는 각각 743개 (15.0%), 739개 (14.9%), 714개(14.4%) 및 689개 (13.9%)로 조사되었다.

3. 486주기에서 1,366개의 포배기 배아를 이식하므로써, 한 환자에게 평균 2.81개의 포배기배아가 이식되었다.

4. 태낭수와 심장박동태아수는 각각 409개와 308개로, 이식된 포배기배아의 착상률과 착상진행률은 각각 29.9%와 22.5%였다.

5. 포배기배아를 이식한 486주기 중 429주기에서 임신 (51.2%)이 되었고, 190주기에서 임신이 유지 (39.1%)되고 있다.

6. 임신이 유지되고 있는 190주기 중 단태아, 쌍태아 및 삼태아 임신은 각각 95명 (50.0%), 72명 (37.9%) 및 23명 (12.1%)으로 조사되었다.

본 연구에서는 자신의 난구세포를 공동배양에 이용할 수 있게 되므로써 다른 체세포를 이용할 때의 계대배양과정과 virus의 검색과정을 생략할 수 있어 보다 쉽고 간편하게 되었다. 또한 20% 난포액을 첨가한 YS배양액에서 정상 수정란을 난

구세포와 4~5일 동안 공동배양하여 높은 포배기 발생률을 얻었으며, 이를 자궁에 이식하였을 때 역시 높은 착상률 및 임신율을 얻을 수 있다는 것은 난구세포 공동배양법과 포배기배아 이식법이 IVF-ET program에 효율적 가치가 있다는 것을 시사하고 있다.

인 용 문 헌

- Bavister BD: Coculture for embryo development; is it necessary. *Hum Reprod* 1992, 7, 1339-1341.
- Ben-Chetrit A, Jurisicova A, Casper RF: Coculture with ovarian cancer cell enhances human blastocyst formation in vitro. *Fertil Steril* 1996, 65, 664-666.
- Bonso A, Ng SC, Santhanathan H, Poh Lian N, Rauff M and Ratnam S: Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 1989, 4, 706-713.
- Chia CM, Winston RML, Handyside AH: EGF, TGF- α and EGFR expression in human preimplantation embryos. *Development* 1995, 121, 299-307.
- Dokras A, Sargent IL, Barlow DH: Human blastocyst grading; an indicator of developmental potential. *Hum Reprod* 1993, 8, 2119-2127.
- Freeman MR, Whitworth CM, Hill GA: Granulosa cells coculture enhances human embryo development and pregnancy rate following in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1995, 10, 408-414.
- Gandolfi F and Moor R: Stimulation of early embryonic development in sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* 1987, 81, 23-28.
- Gandolfi F, Brevini TAL, Richardson L, Brown CR, Moor R: Characterization of protein secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development* 1989, 106, 303-312.
- Kobayashi K, Takagi, Satoh T, Hoshi H, Oikawa T: Development of early bovine embryos to the blastocyst stage in serum-free conditioned medium from bovine granulosa cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992, 28, 255-259.
- Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N and

- Nicollet B: Coculture of embryos in Vero cells and transfer blastocysts in humans. *Hum Reprod* 1992, 7, 101-106.
- Olivennes F, Hazout A, Lelaidier C, Freitas S, Fanchin R, Ziegler D, Frydman R: Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage. *Hum Reprod* 1994, 9, 2119-2127.
- Pickering SJ and Muggleton-Harris AL: Reliability and accuracy of polymerase chain reaction amplification of two unique target sequences from biopsies of cleavage-stage and blastocyst-stage human embryo. *Hum Reprod* 1995, 10, 1021-1029.
- Plachot M, Antoine JM, Alvarez S, Firmin C, Pfister A, Mandelbaum J, Junca AM, Baroux JS 7: Granulosa cells improve human embryo development in vitro. *Hum Reprod* 1993, 8, 2133-2140.
- Quinn P: Use of coculture with cumulus cells in insemination medium in human in vitro fertilization (IVF). *J Assist Reprod Gen* 1994, 11, 270-277.
- Quinn P and Margalit R: Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryo. *J Assist Reprod Gen* 1996, 9-14.
- Wiemer KE, Cohen J, Wiker SR, Malter HE, Wright G, Godke RA: Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts; embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989, 52, 503-508.
- Wiemer KE, Cohen J, Amborski GF, Wright G, Wiker S, Munyakazi L, and Godke RA: In-vitro development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibroblast cells. *Hum Reprod* 4, 595-600.
- 윤산현, 김은영, 조현진, 윤혜균, 이원돈, 임진호: 배양액 조성과 첨가제가 인간 수정란의 체외 발생에 미치는 영향. 1994 추계산부인과학회.
- 허용수, 윤산현, 윤혜균, 조현진, 윤혜진, 이석원, 김은영, 박세필, 이성구, 이원돈, 임진호: IVF-ET Program에서 blastocyst 수정란 발생에 관한 연구. I. Glucose와 phosphate를 함유하지 않은 배양액에서 blastocyst 수정란의 발생. 대한 불임학회잡지 1996, 23, 155-161.