

# Evaluation of Oocyte Culture and Maturation

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

배 인 하

## 서 론

1985년 우리나라에서 처음으로 시험관 아기방법 (in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)으로 쌍둥이가 태어났고, 또 이를 성공시킨 서울대의대 이외에 다른 여러 종합병원 및 개인병원에서도 IVF-ET를 시도하고 있다. 이 IVF-ET와 필수적으로 관련되는 것이 세포배양기술 및 난자의 성숙 유도과정이다.

난자성숙뿐만 아니라 세포배양 및 체외 수정등을 실험실에서 행하는 데는 여러가지 조건과 기구등이 필요하며, 여기에 훈련된 요원들도 요구되고 있어 용이한 문제는 아니다.

## 난자의 성숙

### 1. 난자의 체내 성숙

대부분의 포유류는 출생후 제 1 감수분열 전기(P-rophase)중, 복사기(diplotene stage)에서 더 이상 분열이 진전되지 않는다. 이때 주기(cycle)를 갖고있는 포유동물의 경우는 성체가 되면 뇌하수체에서 나오는 여포호르몬과 황체형성호르몬의 영향으로 여포의 생장이 있게되며, 이 여포가 배란전 여포 (preovulatory graafian follicle)에 도달한후, 황체형성호르몬의 분비가 있는 후부터 복사기에 머물러있던 난자에서 감수분열의 재개(resumption of meiosis I)가 일어난다. 그리고나서 이동기(diakinesis)를 거치는데 이 이동기에서 난자핵막의 붕괴과정 (germinal vesicle breakdown)이 일어나면서 염색체의 응축현상이 일어난다. 계속적으로 중기(metaphase I), 후기(anaphase I) 및 말기(telophase I)를 마치고나면 염색체의 반감현상이 일어나 제 1 감수분열이 끝나고 제 2 난모세포 1개와 제 1 극체(1<sup>st</sup> polar body)로 된다.

예를 들어 사람의 경우, 제 2 난모세포(23개의 염색체) 1개와 제 1 극체(23개의 염색체)로 염색체의 반감현상이 따르게된다. 이렇게 제 1 감수분열이 끝난 제 2 난모세포는 이어서 제 2 감수분열(이때는

유사분열과 마찬가지로)로 들어가게되고 중기(metaphase II)에서 멈춘다(prophase II의 존재여부는 학자들간에 논란의 대상이 되고있음).

즉 난자의 성숙이라 함은 제 1 난모세포가 제 1 감수분열의 전기중, 복사기(diplotene stage)에서 분열이 재개되어 제 2 감수분열의 중기상태에서 정지할 때까지의 과정이 일어났을 때를 일컫는다. (즉 핵의 상태로 보아서만) 이 상태 즉 제 2 감수분열의 중기(약칭 MII)에서 배란된 난자가 만약 정자와 수정과정이 일어나지 않으면 더 이상 후기, 말기의 분열을 거치지 못하고 결국 퇴화하게된다. 그러므로 성숙된 난자가 정자와의 수정현상이 없으면 제 2 감수분열은 중기에서 더 이상 진행되지 않은 상태로 정지되어 난자는 퇴화되어 버리고만다.

이러한 성숙과정은 주기(cycle)를 갖지 않는 포유류(토끼, 족제비, 고양이)인 경우는 교미로 인해 질 및 자궁경부의 척수신경의 자극으로 뇌하수체에서 황체형성호르몬이 분비되며, 이 호르몬의 영향으로 난자의 제 1 감수분열이 복사기에서부터 재개되어 제 2 감수분열 중기까지 진행된다. 또 여우나 개의 경우는 난자가 성숙과정이 일어나지않는 제 1 감수분열의 복사기에서 배란된 후 제 I 감수분열의 중기상태에서(MI) 정자와 수정이 일어난다.

그러나 사람의 경우는 제 2 감수분열 중기상태(M II)에서 난자가 배란되며, 정자의 관입현상이 일어난 경우 이 정자의 관입이 자극이 되어 제 2 감수분열의 중기상태에 머물러있는 난자가 다시 분열이 재개되는 것이며, 후기 및 말기를 거쳐 제 2 감수분열과정이 끝난다. 이후에는 난자의 전핵 (female pronucleus)이 형성되고 관입된 정자(이때의 정자는 난자와는 달리 감수분열 I 과 감수분열 II를 거쳐서 정자의 변태과정까지 다 일어난 것이므로 염색체는 23개의 염색체를 갖는 성숙된 정자임)는 팽대 (swelling) 현상을 거치며, 정자머리에 응축되어 있던 염색체는 전기 상태의 핵으로 변해 정자전핵 (male pronucleus)이 형성된다. 난자의 전핵에서 염색체의 응축과정이 일어나고 정자전핵에서도 이러한 전기 상태에서 염색체 응축과정이 일어난다. 그리고 난

자전핵의 핵막과 정자전핵의 핵막이 소실되면서 양쪽에서 온 염색체(chromosome)가 서로 짝을 짓게 되며 이러한 짝짓기가 이루어질 때, 진정한 의미의 수정이 이루어지는 것이다. 또한 이때, 짝을 지은 염색체의 쌍을 상동염색체(homologous chromosome)라고 부르며, 염색체의 수도 난자에서 온 23개의 염색체와 정자에서 온 23개의 염색체가 짝을 지으면 46개의 체세포 상태로 돌아오며 이때부터 진정한 의미의 배(embryo)로 되는 것이다.

상술한 바와 같이 난자의 성숙은 체내에서의 홀몬의 영향으로 이루어진다.

## 2. 체외성숙

포유류의 난자를 어느 정도 잘 발달된 여포에서 생체밖으로 적출하여 적당한 배양액에 넣고 pH, 삼투압, 온도, gas상태 등의 조건을 잘 맞추어 주어 일정 시간 배양기 안에서 배양시키면 생체안에서 일어나는 홀몬의 영향없이도 생체외에서 자동적인 성숙(spontaneous maturation)을 유도할 수 있다. 그러나 난자의 생체내 성숙이나 생체외의 자동적인 성숙기작에 대해서는 아직 잘 모른다.

위의 방법 외에도 잘 발달된 여포 전체를 적출하여 황체형성홀몬이나 HCG(human chorionic gonadotropin)등을 처리하여 기관배양을 하여도 난자의 성숙을 유도할 수 있다(그림 1 참조).

## 3. IVF-ET에서의 난자성숙유도

난자성숙유도는 IVF-ET프로그램을 하고있는 세계 각국의 각 센터에 따라 다르다. 대체로 월경전

후로 크로미펜 사이트레이트와 HMG(human menopausal gonadotropin)을 병용하여서 여러 개의 여포를 동시에 성장시키는 과배란 유도방법을 쓰고 있으며, 이외에도 배란홀몬을 주사하거나 HCG 홀몬을 주사하여 난자의 성숙을 유도하는 방법들도 사용한다. 여포에서 배란이 일어나기 전 에스트라다이올의 값이 올라간 후 황체형성홀몬의 분비가 일어나면서 난자의 성숙이 시작된다(이때 황체형성홀몬의 혈청내 값도 홀몬분석으로 알아야 한다). 이 홀몬의 분비가 일어나기 시작한 후 34시간 정도에서 복강경으로 배란직전의 난자를 채취한다(Jones et al. 1982. 참조). 이렇게 홀몬치리로 채취된 난자는 성숙된 난자이나 때론 미성숙된 난자가 일부 나오는 경우도 많다(Laufer et al, 1984). 만약 미성숙 난자를 채취했을 경우라면 전술한 것처럼 적당한 배양액에서 난자의 성숙이 일어날 때까지 배양한다음 정자와 수정시켜야 한다.

## 4. 자연배란이용법

IVF-ET program에서도 가끔은 홀몬치리를 하지 않고 자연배란법(natural cycle)으로 난자의 성숙을 기다렸다가 배란 직전의 여포에서 난자를 채취하는 방법을 쓸 수 있다. 물론 이때는 과배란 유도법을 쓰지 않기 때문에 1개의 난자를 얻을 수밖에 없다. E<sub>2</sub> 및 황체형성홀몬 측정은 과배란 유도방법처럼 똑같이 시행해야 하며 배란 전에 복강경으로 난자를 채취하는 점은 마찬가지이다.

## 난자의 성숙판단



그림 1. 사람의 난자를 hyaluronidase를 사용해서 난구세포(Cumulus cells)를 제거한 다음 본 난자로 GV의 화살표쪽에 GV(germinal vesicle, 난자의 핵막), GVBD(germinal vesicle break-down, 난자핵막붕괴) 그리고 PB(polar body)를 볼수있다. 제 1 극체(1st polar body)는 보이거나 염색을 하지 않았으므로 핵의 염색체는 보이지않는다. Laufer et al (1984), Fert. steril 42: 366에서 인용.

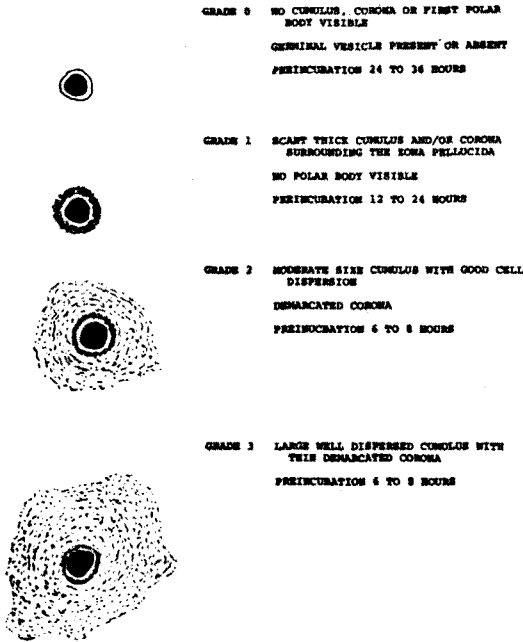


그림 2. 사람의 난자-난구세포에서 난구세포의 퍼짐을 Grade로 나타낸것으로 grade 3일 경우 대개 성숙난자라고 판별하고 있으나 이중 40%만이 성숙난자로 판명되었음. Marrs et al(1984) Fert. Steril 41:519에서 인용.

난자의 성숙판단으로는 대체로 첫째, 제 1극체의 유무. 둘째, 난구세포(cumulus-cell)의 퍼짐 및 mucification 정도에 따른 판단 등의 두가지 방법이 사용된다.

첫째의 경우, 여포에서 복강경으로 채취된 난자는 난자 주위에 난구세포가 뽕뽕히 차 있으므로 실제 위상차 현미경이나 간섭위상차 현미경을 사용한 다해도 제 1극체의 유무를 판정하기가 매우 곤란한 경우가 많다. 그러므로 난구세포를 어느 정도 제거한 다음에는 제 1극체의 유무 판정이 용이하며, 반면 난구세포가 뽕뽕히 차 있는 경우는 판정이 어렵다(사람의 난자를 포함하여 모든 포유동물에서 마찬가지이다).

이런 경우 제일 먼저 기준이 되는 것은 난자세포막(oolemma)과 투명대(zona pellucida) 사이의 난황막공간(perivitelline space)의 유무와 정도를 점검하는 것이다. 만약 이런 난황막공간이 불행히도 현미경 하에서 잘보이지 않을 경우 난자를 이리저리 굴려서 이 공간을 찾거나 또는 이 난황막공간이 생긴 경우는 제 1극체의 위치때문에 난자의 난황막이 약간 눌러져 있는 상태의 유무로도 판정할 수 있다.

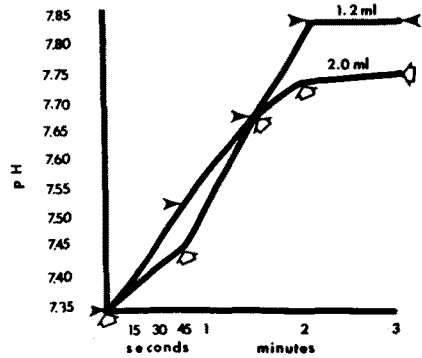


그림 3. 배양접시내의 배양액의 pH변화를 나타낸 그림으로 laminar flow를 하지 않은 상태에서 pH변화를 나타낸것으로 만약 laminar flow로 멸균된 공기가 흐를 경우 pH변화는 더욱 심해진다. sher et al(1984). Fert. Steril 41:511에서 인용.

여러가지 동물의 난자를 많이 다루어 본 유능한 전문가의 경우는 난자세포막의 상태로도 판정할 수 있으며, 난구세포 및 코로나세포가 뽕뽕히 차있어 제 1극체의 유무판정이 어려울 경우는 난자세포막의 상태및 색깔을 보아 성숙, 미성숙을 판정할 수 있다. 그러나 이런 판정까지의 경지에는 많은 경험과 연륜을 쌓아야만 가능하므로 그런 전문가의 의견을 받아야한다.

둘째, 난구세포의 퍼짐정도로써 대체로 난자의 성숙을 판정할 수 있다고 하지만 이런 난구세포의 퍼짐이 난자의 성숙과 일치하지 않는다(Lauffer et al, 1984) 난구세포가 아주 잘 퍼져있어 난자의 성숙이 일어났을 것이라고 생각한 난자에서(그림 2의 grade 3 참조) 40%만이 성숙된 상태였고, 나머지 60%는 난자가 성숙과정에 있거나 아직 성숙을 시작하지 않은 상태인 germinal vesicle(난자핵막)을 가진 경우가 14%나 되었다. 이렇게 볼 때 첫째와 둘째 방법으로 난자의 성숙, 미성숙을 판정하는 것은 참으로 어려운 일이나 이러한 판정은 난자를 많이 다루어 본 생식생리학자에게 맡기는 것이 가장 빠른 시간에 정확히 판단하는 지름길이다.

만약 미성숙 난자를 정자와 섞어 수정을 유도할 경우 정상적인 수정이 일어나지 않는다. 즉 미성숙 난자를 정자와 수정시킬 경우 난자자체의 미성숙때문에 정자의 관입(penetration)이 일어난다해도 정자의 팽대현상(swelling)이 일어나지 않으며, 또한 난자의 미성숙으로 난자전핵형성도 일어나지 않는다. 그러므로 성숙된 난자의 핵상은 중기상태(metaphase)이고, 난황막공간에 제 1극체를 갖고있는 상태에

서 정자의 관입에 의한 자극으로 후기, 말기상태를 거쳐 난자전핵을 형성하며 핵막도 볼 수 있으나 미성숙난자에 정자의 관입이 일어난다해도 난자전핵이 형성되지 않는다.

이러한 난자의 핵성숙외에도 세포질성숙 (cytoplasmic maturation)현상이 있다. 이 세포질성숙은역시 모든 포유동물에서 다 발견되는 현상이다. 앞서 난자의 핵성숙이란 제 1차 난모세포가 감수분열을 재개하여 제 2차난모세포로 제 2감수분열에 이르고 하나의 제 1극체를 갖고있는 상태에 도달할 때라고 설명하였다. 이런 난자의 핵성숙은 체외배양을 통해 얼마든지 유도할 수 있다. 그런데 체외배양을 할 때 난구세포가 거의 떨어진 상태에서 배양했다거나 아니면 여포배양에서 황체형성호르몬이나 HCG를 처리후 어느 일정 시간이 지난 후에 여포에서 꺼내어 자동성숙을 유도하지 않으면 세포질성숙은 일어나지 않는다고 한다. 그렇다면 세포질성숙이 일어났는지의 여부를 어떻게 판정하겠는가? 이것을 수정시켜 정자의 관입현상이 일어나고, 관입후 정자가 난자세포질로 들어온후 팽대(swelling)현상이 일어나지 않으면 세포질성숙이 일어나지 않은 것으로 판정하고 있다(Thibault, 1977).

이러한 세포질성숙은 현미경상으로 판정할 수 없고, 반드시 정자와 수정시킨후 정자의 두부의 팽대현상 여부로만 판정이 가능하며 이때는 현미경을 사용해서 세포질성숙여부를 판정하게 된다.

예를 들면 토끼에서 난자성숙유도를 위해 처음부터 난구세포가 많이 떨어진 난자를 배양해서 난자의 핵성숙을 유도할 수 있다. 그러나 이렇게 성숙된 난자를 Capacitation을 일으킨 정자와 수정을 시도할 때 정자의 관입현상(penetration)은 일어나지만 관입후 정자두부의 팽대현상이 일어나지 않아 정자전핵이 형성되지 않고, 나중에 난자전핵과의 fusion도 일어나지 않는다. 또한 난할현상(cleavage)도 일어나지 않는다. 반면 홀몬처리로 배란을 유도하여 배란된 난자를 사용하거나 아니면 여포를 적출하여 황체형성호르몬이나 HCG를 처리하여, 체외배양에서 6시간 이상을 여포내에서 성숙을 유도시킨 난자를 정자와 수정시킨다면 정자의 관입도 일어나며 정자의 팽대현상도 관찰된다. 이렇게 정자의 팽대현상이 일어나는 것은 난자세포질내에 Sperm swelling factor(정자팽대를 일으키는 물질)가 형성되어 정자의 팽대현상이 일어나는 것으로 보고있다. 이러한 난자의 세포질성숙이 일어나는 것은 난구세포와 난자 및 여포액속의 여러가지 steroid홀몬과의 상호작용으로 이루어지는 것으로 추정되고 있다.

최근 Staigmiller and Moor(1984)는 양의 난자중

난구세포층이 뾰뾰히 찬 난자를 배양하여 핵성숙을 유도한 후 정자와 체외수정시켜서 난할이 일어난 배를 다시 양의 자궁에 이식하므로써 새끼를 낳은 실험을 통하여 세포질성숙은 난구세포, Steroid(estradiol and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone)의 부족이나 혹은 여포액(follicular fluid)을 넣어주지 않는 이유등으로 정자의 팽대현상이 일어나지 않는다고 주장하고 있다.

또한 이러한 세포질성숙이 사람에서도 일어나는 현상이라고 Jacobson et al(1970), Edwards et al(1970) Soupart(1975)등도 주장하고 있다.

IVF-ET프로그램에서 적어도 난자가 미성숙난자로 판명될 경우 난구세포층이 두껍게 쌓인 난자를 배양할 경우는 세포질성숙까지 배양할 수 있겠으나, 난구세포가 많이 떨어져나간 경우는 난자의 핵성숙은 유도할 수 있을지라도 세포질성숙은 유도할 수 없을 것으로 생각되며 이런 미성숙난자를 배양할 때 배양액은 난자성숙이 일어날 때까지 자주 갈아주어서는 않된다.

## IVF-ET에서 사용되는 기구 및 배양에 관한 일반성

### 1. 배양에 소요되는 기구

배양기, 가스봄베, 공기필터, 해부현미경(x200) 위상차현미경 혹은 간섭위상차현미경, 와밍블록(Warming block), 배양접시, pH미터, 오스모미터(osmometer)등이 필요하다.

배양접시(Culture dish)는 배양목적, 배양액 구성 성분등에 따라 용도를 두 가지로 사용한다. 즉 mineral oil(paraffin oil 이라고도 함)로 배양액을 Covering하여 사용하는 type과 mineral oil을 사용하지 않는 두 가지로 대별할 수가 있다.

첫째, mineral oil을 사용하는 경우 배양중인 배양접시를 배양기 밖으로 꺼내어 현미경으로 관찰할 때에는 배양액의 증발, pH변화, Sterility 유지등에 좋은 이점이 있으나, mineral oil의 equilibrium을 시키는 과정이 번잡스럽기 때문인지, 사용법을 모르는 때문인지 잘 사용하지 않는 경향이 있다. (그림 3: laminar flow hood를 off시켰을때의 pH 변화를 나타낸것인데 on시켰을 경우에는 pH변화가 더욱 심하다고 보아야한다.) 에서 처럼 이러한 배양접시를 배양도중 특히 laminar hood로 air flow가 되는 곳에 노출시키는 경우 잠시동안에도 배양액의 pH가 급속히 변하고, 또 배양액의 증발로 osmolarity가 크게 변하기 때문에 mineral oil로 Covering 해주는 방법을 권장하고 싶다(그림 4 참조).

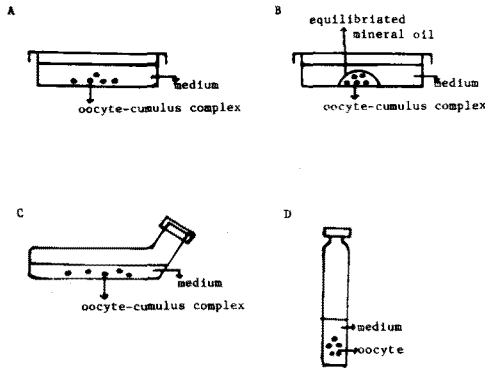


그림 4. 난자의 배양에 사용되는 배양접시의 모델을 그린 그림이나 B type에서만 mineral oil로 covering해 놓았기 때문에 이 경우 배양액의 pH, osmolarity 변화는 배양기 밖으로 꺼내어 몇시간두어도 변치 않을 장점이 있고 A의 경우 변화가 심하며 C, D의 경우도 난자의 handling에 아주 불편하고 성숙율도 떨어진다.

둘째, mineral oil을 사용하지 않는 경우는 배양기 내의 가스phase를 항상 일정하게 유지시켜 주어야 하고, 배양기 내의 습도는 100%로 유지시킬 수 있는 배양접시를 사용해야하므로 마개가 달린 bottle type이나 시험관 type을 사용해야한다. 이 경우 배양기 밖으로 꺼내어 난자를 관찰한다든가 할 때 마개를 열어서는 안된다. 그림 4의 A type이나 B type이 D type보다는 fertilization rate를 높여준다는 Marrs et al(1984)의 결과가 있어 A나 B type이 좋겠다.

2. Incubation

Incubation시 특히 세 가지 요건을 갖추어 주어야 한다.

1) 배양기 내의 온도

37°C로 유지 (포유동물의 난자나 배의 배양에는 37°C로 유지해야 한다. 만약 30°C 이하에서 장시간 배양할 경우, 난자의 퇴화 및 성숙과정이 느리며, 저온처리로 처녀생식 (Parthenogenesis) 을 유발시킨다).

2) gas의 습도유지

100%습도(배양액의 증발방지)

3) gas의 구성성분 및 gas의 흐름조절

5% CO<sub>2</sub> in 95% air, 또는 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> 혹은 5% CO<sub>2</sub> in Nitrogen 이 둘 gas mixture중 어느것을 사용해도 무방한 것으로 되어있으나, 5% CO<sub>2</sub>는 배양액의 pH변화를 막아주려면 꼭

Table 1. Modified Hanks balanced salt sol for pig follicular oocyte culture.

COMPONENTS	AMOUNT(G/L)	mM
NaCl	7.533	128.880
KCl	0.4	5.365
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	0.8117
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.09	0.335
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.06	0.441
Phenol Red	0.01	
pen-St	100 iu/ml - 50ug/ml	
BSA	0.1-0.4%	
NaHCO <sub>3</sub>	0.35	4.166
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	1.711
Na-pyruvate	0.0033	0.03
Lactic Acid	0.2801	2.5
Glucose	1.0	5.55

Table 1의 설명: modified Hanks Balanced salt sol의 구성성분을 나타낸표로 BSA대신 FCS나 MS 혹은 HSA등으로 대체할수 있다. Ham's F-10 이나 TC 199처럼 구성성분이 복잡하지 않기 때문에 실험실에서 쉽게 조절할수있다. Osmolarity는 290mOsm/kg으로 조절된 배양액임. 그러나 일단 조제후 반드시 Osmometer로 검사해야 한다. Bae and Channing(1985) Biol. Reprod.33:79-87에서 인용.

필요하다.

대부분의 배양액에 NaHCO<sub>3</sub>가 25mM 정도로 높 이 들어있어(buffer 작용) 37°C에서 쉽게 분해되어 CO<sub>2</sub>가 휘발하므로 CO<sub>2</sub>의 양을 조절해 주어야 평형을 유지할 수 있고 그래야만 배양액의 pH변화를 막아 주는 효과가 있다. 이런 NaHCO<sub>3</sub> 농도에서 gas phase의 CO<sub>2</sub>를 5%→50%로 할 경우 pH=pK + log  $\frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]}$ 의 식에서 pH는 7.4→6.4로 1 unit가 떨어진다. 반대로 5%→0.5%로 내릴 경우 pH는 7.4→8.4로 올라간다. 대개의 경우 5% CO<sub>2</sub> gas phase 적정선으로 보고있다. NaHCO<sub>3</sub>의 농도가 높지않은 Table 1의 배양액 (Table I) 에서 처럼 modified Hank's balanced salt sol을 쓰고 BSA 대신에 FCS(fetal cord serum)나 HSA(human serum albumin)를 첨가해 주어도 된다. gas mixture에서 O<sub>2</sub>가 20%이상일 경우 난자나 배의 퇴화를 유발시킨다(Gwatkin 1973, Whitten, 1971).

또 5% CO<sub>2</sub>이하일 경우 역시 난자에 좋지않다 (Auerbach & Brinster, 1968). 뿐만아니라 순수한 nitrogen에서도 난자의 퇴화율이 높다(Auerbach & Brinster, 1968).

3) 배양액

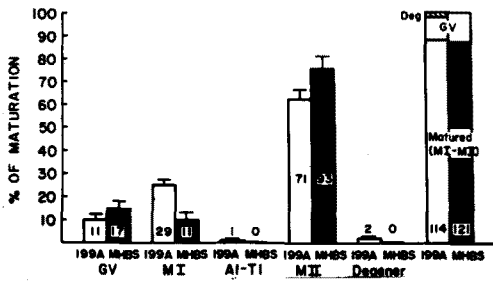


그림 5. modified Hanks balanced salt sol.과 TC 199배양액과를 패지난자를 배양시켜 성숙률을 보았던 결과로 난자성숙도에는 하등의 차이가 없다. 구성이 복잡한 TC199 보다는 실험실에서 쉽게 조제할수있는 이런 간단한 배양액으로도 사람의 난자 배양에는 하등의 차이가 없다는 것이 밝혀졌다.(GV : germinal vesicle, MI: metaphase of 1st meiosis. AI-TI: anaphase I-Telophase I. MII : metaphase of 2nd meiosis, Bae & Channing(1985) 33:79에서 Table I을 도식화했음.

난자, 배 및 정자의 insemination에 사용되는 배양액.

배양액은 비교적 구성성분이 많은 Ham's F-10, T C199, MEM등과 simple chemically defined medium 으로, 실험실에서 조제가 간단한 Tyrode sol, modified Kreb's-Ringer's sol, modified Hank's balanced salt sol.등에 fetal cord serum이나 maternal serum 을 7.5%~15% 또는 follicular fluid를 같은 비율로 섞어준 배양액을 사용한다. 물론 Ham's-F-10이나 TC 199, MEM등의 배양액도 실험실에서 조제할 수 있으나 이들은 Commercial medium으로 상품화하고 있어 구입할 수도 있다. 그림 5에서 패지 난소난자의 배양 결과 TC199과 modified Hank's balanced salt sol. 사이에 난자의 성숙률에 하등의 차이가 없다(Bae & Channing, 1985)

IVF-ET에서 어느 쪽의 배양액을 사용하던지 하등의 상관이 없는 것으로 나타나고 있다. 즉 실험실에서 조제가 가능한 modified Kreb's-Ringer's sol, Tyrode등의 배양액에다 7.5%~15%의 혈청을 가해주기 때문에 하등의 차이가 없는 것이 일반 포유류난자나 배의 배양과 같다.

Quinn et al (1984)은 Tyrode sol, modified Kreb's-Ringers bicarbonate sol.과 Hams F 10, Earle's balanced salt sol.사이에 아무런 차이가 없음을 보고하고 있다. 혈청을 첨가할 때는 반드시 fetal cord serum(FCS)이나 maternal serum(MS)을 56°C에서 30분간 처리하여 serum complements를 inactivation 시켜준 다음 사용해야 한다.

이런 혈청의 경우 Leung et al(1984)은 FCS가 M

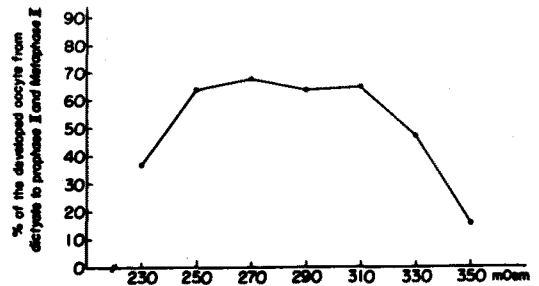


그림 6. 토끼 난자를 Osmolarity가 다른 배양액에서 배양했을 경우 난자의 성숙률을 나타낸 것임. 대체로 250~310m Osm 사이에서는 모든 포유류의 난자적정 osmolarity를 나타낸다. most optimum osmolarity를 지적한다면 280mOsm/kg이 되겠다. TC 199은 290mOsm/kg로 조절된 배양액임. Bae and Foote(1980) J. Reprod. Fert. 59:11에서 table을 도표한 것임.

S보다 pregnancy rate를 높혀준다고 보고하고 있다. 한편 Menezo et al(1984)는 FCS와 human serum albumin(HSA)을 비교하여 보고하였는데 다음과 같다 FCS는 in vitro fertilization에는 8%, growth 및 embryo transfer에는 16%를 사용하였고 HSA는 1%의 HSA를 사용한 결과 fertilization, cleavage 및 pregnancy에 하등의 차이가 없었다.

결론적으로는 FCS를 사용하는 것이 MS보다 항체가 많지않아 좋을 것 같으며, 또 MS에는 배란유도로 사용했던 chomiphene citrate(CC)가 상당량 남아있을 가능성이 있고, 서서히 배설된다는 Achreiber(1966)의 보고가 있어 FCS가 MS보다는 효과적이라고 하겠다. 또 Thomson(1968)은 생쥐 배에 CC가 해로운 효과를 주고 있다는 보고를 하였다.

대부분의 센터에서 정자의 Washing 및 insemination에 사용하는 배양액은 15% serum을 첨가해 주고 있다. Embryo transfer시에는 50% serum을 첨가해 주는 것이 보통인데, 이때 serum 농도를 50% 적이나 높혀주는 것은 viscosity(점도)를 높혀주고 egg loss를 방지하기 위한 것이다. 즉 자궁내의 viscosity와 거의 같게 해주려는 의도이지 이렇게 높은 퍼센트로 사용해야만 착상율이 높아지는 것은 아니다.

이상의 배양액에 혈청을 일정 퍼센트로 넣고 일 단 pH를 7.2~7.6사이에서 조정한다 다음 반드시 pressure filtration 방법으로 멸균시키는 방식을 취해야 한다. Vacumn filtration으로 할 경우, 배양액 속의 높은 NaHCO<sub>3</sub>(25mM)때문에 CO<sub>2</sub>의 휘발이 많아 pH조절을 여러번 해야하는 번거로움도 따르게 된다. 배양액의 osmolarity는 포유류의 난자나 배의 배양경우 대개 280m Osm/kg으로 유지하는 것이 좋다고 알려져 있다(Bae & Foote, 1980)(그림 6).

**Table 2.** Effect of carbohydrates and glutamine on oocyte development.

Media	No. of oocytes cultured	Developed to prophase or metaphase II in 24 h (% ± S.E.)
Basic control medium	55	35 ± 6.4 <sup>a</sup>
+ Pyruvate, lactate, glucose	53	49 ± 6.9 <sup>b</sup>
+ Glutamine only	53	70 ± 6.3 <sup>c</sup>
+ Pyruvate, lactate, glucose and glutamine	52	67 ± 6.5 <sup>c</sup>

Percentages with different superscripts are different. P < 0.025.

**Table 2. 설명 :** 토끼난자의 배양액 (modified Kreb's-Ringer's sol)에 pyruvate, lactate, glucose 등의 energy source를 넣어준 그룹과 glutamine 만을 넣어준 그룹 및 energy source + glutamine을 복합하여 넣어주었을때 난자의 성숙도를 나타낸 Table로 Bae & Foote(1975) Exp. cell Res 91 : 113에서 인용한 것임.

실제 사람 혈청의 osmolarity는 294m Osm/kg 이나 난자 및 배의 배양액은 동물중에 따라서 조금씩 다른 결과로 나타나 있다. 즉 mouse embryo (Whitten, 1971)에는 250~280mOsm이 적당하다고 하고 있고 Brinster(1965)의 경우 276mOsm 이라고 주장하고 있다. 난자배양에는 Hamster(Gwatkin & Haidri, 1973) 285~295mOsm, 등으로 조금씩 다르다. 또 commercial medium의 경우 Han's F-10 이나 TC199는 290mOsm으로 조정된 배양액이나, 가끔 정량대로 증류수를 첨가해서 배양액을 만들어본 경험에 의하면 심하게는 320mOsm까지 나타낼 때도 있다. 반면 240mOsm으로 낮게 나타날 경우도 있어, 이미 상업용으로 나온 배양액이라해도 반드시 사용전에 Osmometer로 꼭 검사해 볼 필요가 있다. Osmolarity의 조정은 Bae & Chung(1985)의 방법대로 조절해주면 된다. 역시 실험실에서 간단히 조절할 수 있는 Simple Chemically defined medium에 대해서도 조제후 반드시 Osmometer로 검사해야 한다.

#### 4) 배양액의 구성성분

배양액에는 난자, 배의 배양에 필요한 배양액뿐만 아니라 insemination에 사용되는 배양액에도 energy source가 될 성분이 반드시 필요하다. 주로 energy source로 쓰이는 성분은 pyruvate, lactate 및 glucose가 대체로 첨가되고 있다. table 1, table 2, 그림 7에서처럼 energy source의 첨가여부로 난자의 성숙도가 아주 달라지고 있다.

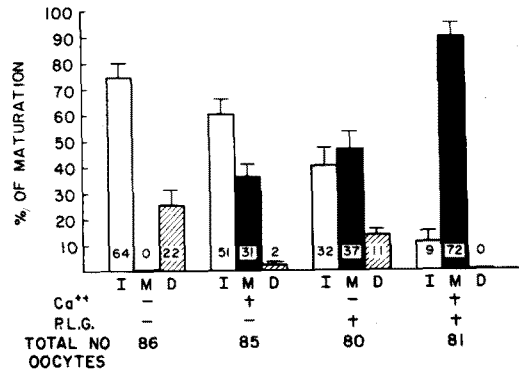


그림 7. 돼지난자의 배양에서 P (pyruvate) L (lactate) G (glucose) 등의 energy source를 넣어준 것과 또 Ca<sup>++</sup> (1.71mM)을 넣었을 때와를 난자성숙도를 비교한 것으로 I (immature) M (mature) D (degenerate)를 나타내고 있다. Bae and channing(1985) Biol. Report. 33:79-87에서 인용.

이외에 대부분의 배양액에는 glutamine이 2mM 첨가되어 있는 경우가 있고, 또 첨가되지 않은 경우도 있다. 즉 TC199나 Ham's F-10에 glutamine이 첨가된 배양액이 있는가 하면 조제시 따로 넣어야 하는 경우가 있어 포장에 적힌 내용을 확인할 필요가 있다. Table 2에서 modified Kreb's-Ringer's bicarbonate sol에 세가지 energy source (pyruvate, lactate 및 glucose)를 넣어준 것과, 이외에 glutamine 2mM을 더 첨가했을 경우에 난자성숙도에 커다란 차이가 있음을 보여주고 있다(Bae & Foote, 1975).

#### 5) 미성숙 난자의 배양

IVF-ET 프로그램에서 성숙한 난자를 채취했을 경우 복강경으로 채취후 난자의 성숙이 확인된 경우라도 난자의 체내상태를 맞추어주기위해 계속 배양기안에서 5~6시간 배양해 주는 것이 일반적으로 거치는 과정이며 이후에 정자와 섞어줌으로써 체외 수정을 일으키게 한다. 그러나 복강경으로 난자를 채취후 그 난자가 미성숙난자로 판정될 경우에는 난자성숙이 일어날 때까지 배양한다음 정자와의 수정을 시도해야 한다.

미성숙난자를 바로 정자와 insemination시킬 경우 정자의 관입현상을 때로 일어나지만 정자두부의 팽대현상이 일어나지 않아 정자전핵 (male pronucleus)의 형성이 일어나지 않는다. 동시에 난자도 난자전핵 (female pronucleus)을 형성하지 않아 수정과정이 일어나지 않는다. IVF-ET에서 가장 중요한 단계는 복강경으로 난자채취후 난자의 성숙여부를 판정하는 것이며, 성숙된 난자일 경우 5~6시간 배양후 정자와의 insemination을 시도하면 된다. 만약 성숙된 난자를 더 오랜시간 배양해서 정자와 insemin-



그림 8. 돼지의 여포에서 뽑은 세개의 난자를 0.006% trypan blue로 염색한 난자 아랫쪽 난자의 난구세포가 심하게 염색되어있다. 이것은 이들 난구세포가 죽어가는 세포들로서 위의 두 난자를 싸고 있는 난구세포는 그렇게 심하게 염색되어 있지 않다. 즉 대부분 살아있는 난구세포(cumulus cell and corona cells)들이다. Trypan blue로 염색하더라도 난자의 성숙, 수정등에 하등의 영향이 없다.

ation할 경우 난자의 퇴화현상에서 기인하는 polyspermy(다정자수정)가 반드시 일어나게 되어 정상적인 배의 발생을 기대하기 어렵다. 또 이런 난자는 퇴화하는 단계이므로 어느 시간에 가서는 배의 소실현상(lysis)이 일어난다.

미성숙난자를 배양할 경우 대개 사람의 난자는 germinal vesicle(GV)상태의 미성숙 난자를 채취했을 때 36시간정도 배양하면 metaphase II 상태에 이르게 되어 난자의 성숙이 유도된다. 그러나 가끔은 36시간이상 배양하더라도 성숙과정이 일어나지 않은 상태의 난자를 관찰할 수가 있다(Cho et al, 1972).

이런 난자를 장시간 배양할 경우 난자 주위의 난구세포의 luteinization (황체화) 현상이 일어나며, progesterone 및 다른 steroid hormone 생산이 왕성해짐으로써 난자의 성숙을 억제시키는 효과가 있다. 이럴 경우 배양액을 한번 갈아주는 것이 정석으로 되고 있다. 난자 및 난구세포에서 나온  $NH_3$ , 및  $CO_2$  등의 노폐물 축적으로 배양액의 변질현상이 일어나기도 하므로 배양액을 갈아주는 것이 원칙이다

난자채취후 난구세포의 퇴화가 심한 경우(그림 8 참조) 난자의 세포질성숙이 일어나지 않는 경우가 있다. 0.006%의 trypan blue를 처리한 돼지 여포난자로 아주 겹겹이 염색된 난구세포는 이미 죽어있는 난구세포들이다. 사람의 난자에도 0.006% trypan blue로 처리하더라도 난자성숙이나 in vitro fertilization 및 implantation에도 하등의 영향이 없다

## 결 론

1) 배양액에는 blood plasma에 포함되어 있는 모든 염류가 들어있는 것이 좋다. 그렇지 않으면 적어도 modified Kreb's-Ringer sol에 포함된 염류정도 로도 충분하다.

2) 혈액처럼  $NaHCO_3$ 의 농도가 25mM 정도 포함되어야 하나, 생체의 배양의 경우 pH변화가 쉽게 일어나므로 gas mixture에서 5%  $CO_2$ 를 포함하는 gas phase가 요구되고 있다.  $NaHCO_3$ 가 modified Hank's balanced salt sel.처럼 4 mM정도일 때는 정확한 gas phase의 조절은 필요치 않다.

3) gas mixture에서 5%  $CO_2$ 는 배양액에 따라서 대체로 맞추어 주어야 한다.

4) 배양액의 pH는 7.2~7.6이다.

5) 배양액에는 nitrogen source로 serum을 포함시키든가 아니면 HSA(human serum albumin)를 0.1% 정도 포함시켜야 한다. 이외에 glutamine도 2mM 정도 포함시키면 더욱 좋다.

6) 배양액에 energy source물질(pyruvate, lactate 및 glucose)을 포함시켜야 한다.

7) 난자의 성숙은 제 1극체의 유무로 관찰할 수 있으나, 반드시 세포질성숙이 일어나지 않는 경우도 있어 극체의 유무만으로 완전한 난자의 성숙이 일어났다고는 할 수 없다.

8) 미성숙난자를 배양할 경우 48시간후에 배양액을 한번 갈아주어야 한다.

## REFERENCES

- Achreiber, E., Johnson, J.E., Plotz, E.J. Weiner, M.: *Studies with  $^{14}C$  labelled clomiphene citrate. Clin. Res. 14:287, 1966.*
- Auerbach, S. and Brinster, R.L.: *Effect of oxygen concentration in the development of two-cell mouse embryos. Nature 217:465, 1968.*
- Bae, I.H. and Foote, R.H.: *Carbohydrate and amino acid requirements and ammonia production of rabbit follicular oocytes matured in vitro. Exp. Cell Res. 91:113, 1975.*
- Bae, I.H. and Foote, R.H.: *Maturation of rabbit follicular oocytes in defined medium of varied osmolality. J. Reprod. Fert. 59:11, 1980.*
- Bae, I.H. and Chung, S.O.: *In vitro fertilization and embryo transfer program 과 한국에서의 문제점. 대한불임학회지 12: 15-29, 1985.*
- Bae, I.H. and Channing, C.P.: *Effects of calcium ion on the maturation of cumulus-enclosed pig follicular oocytes isolated from medium-sized graafian follicles. Biol. Reprod. 33:79-87, 1985.*



- Brinster, R.L.: *Studies on the development of mouse embryo in vitro. I. Effect of osmolarity and hydrogen ion concentration. J. exp. Zool.* 158:49-57, 1965.
- Cho, W.K., Kim, M.K. and Chung, S.O.: *In vitro maturation of human follicular oocytes in the presence of follicular fluid. International congress series No. 278 (ISBN 9021901773) Fertility and Sterility, Proceedings of the 7th World congress, Oct. 17-25, 1971 Tokyo and Kyoto, Excerpta Medical Amsterdam, 1972.*
- Edwards, R.G., Steptoe, P.C. and Purdy, J.M.: *Fertilization and cleavage in vitro of preovulatory human oocytes. Nature* 227:1307, 1970.
- Gwatkin, R.B.L. and Haidri, A.A.: *Requirement for the maturation of hamster oocytes in vitro. Expl. Cell Res.* 76:1-7, 1973.
- Jacobson, C.B., Sites, J.G. and Arias-Bernal, L.F.: *In vitro maturation and fertilization of human follicular oocytes. Int. J. Fert.* 15:103, 1970.
- Jones, H.W. Jr., Jones, G.S., Andrew, M.C., Acosta, Witmyer, A. C., Bundren, J. Garcia, B. Sandow, L. Veack, C. Wilkes, J. Wartham, J.E. and Wrihy, G.: *The program for in vitro fertilization at Norfolk Fert. Steril.* 38:14-21, 1982.
- Laufer, N., Tarlatzes, B.C., Decherney, A.H., TasMers, J., Haseltive, F.P., Machusky, N. and Naftolin, F.: *A synchrony between human cumuluscorona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for in vitro fertilization. Fert. Steril.* 42:366-372, 1984.
- Leung, C.S., Gronow, M.J., Kellow, G.N., Lopata, A., Speirs, A.L., McBain, J.C., Duplessis, Y.P. and Johnston, I.: *Serum supplement in human in vitro fertilization and embryo development. Fert. Steril.* 41:36-39, 1984.
- Marrs, R.P., Saito, H., Yee, B., Sato, F. and Brown, J.: *Effect of variation of in vitro culture technique upon oocyte fertilization and embryo developments in human in vitro fertilization procedures. Fert. Steril.* 41:519-523, 1984.
- Menezo, Y., J. Testait and D. Perrone: *Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo culture and transfer. Fert. Steril* 42:750-755, 1984.
- Quinn, P., Warnes, G.M., Kerin, J.F. and Kriby, C.: *Culture factors in relation to the success of human vitro fertilization and embryo transfer. Fert. Steril.* 41:202-209, 1984.
- Sher, G., Knutzen, V., Stratton, C.J., Montakhab, M.M., Allenson, S.G., Mayville, J., Rubenstein, J.A., Glass, M.J. and Bilach, S.M.: *The development of a successful non-university-based ambulatory in vitro fertilization embryo transfer program: Phase I. Fert. Steril.* 41:511-518, 1984.
- Staigmiller, R.B. and Moor, R.M.: *Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. Gamete Res.* 9:221-229, 1984.
- Soupart, P.: *In vitro maturation and fertilization of human oocytes. In Thibault, C. (ed) La Fecondation (Paris, Masson et Cie), 1975.*
- Thomson, J.L.: *Effect of two nonsteroidal antifertility agents on pregnancy in mice. I. comparison of in vitro and in vivo effect of zygotes. J. Reprod. Fert.* 15:223, 1968.
- Thibault, C.: *Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? J. Reprod. Fert.* 51:1-15, 1977.
- Whitten, W.K.: *Nutrient requirement for the culture of preimplantation embryo in vitro. Adv. Biosci.* 6:129, 1971.