

체외수정 및 배양에서 Ham's F-10 배양액과 Medi-Cult 배양액의 비교

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실
정 혜 원

= Abstract =

Fetal Cord Serum Supplemented Ham's F-10 vs. Medi-Cult for in Vitro Fertilization Culture Medium

Hye Won Chung

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ewha Womans University

The media for assisted fertilization from Medi-Cult is based on a Synthetic Serum Replacement(SSR). The main principle of SSR is a metal iron buffer containing a balanced mixture of iron and trace metals. Recently, Synthetic Serum Supplement(SSS) and Medi-cult are commonly used.

These synthetic substitutes have some advantages, such as safty from viral contamination and no needs of bioassay.

To compare the usefulness between the Medi-cult and Ham's F-10 supplemented with fetal cord serum for the culture medium of in vitro fertilization, fertilization rate, cleavage rate and pregnancy rate were studied. It is concluded that Medi-cult was better than Ham's F-10 supplemented with fetal cord serum according to fertilization rate, cleavage rate, pregnancy rate and ongoning pregnancy, but that differences did not have statistical significance.

서 론

인간의 체외 수정에 있어서 배양액은 최근까지 단순 배양액이나 Ham's F-10 같은 복합 배양액에 여러가지 단백질을 첨가하여서 사용한다. 첨가제로 쓰는 단백질은 인간제대혈청(fetal cord serum : FCS)이나 모체혈청 등을¹⁾²⁾ 사용하고 있으며, 최근에는 난포액, human serum albumin³⁾ bovine serum albumin(BSA)⁴⁾, plasmanate⁵⁾, Synthetic Serum Substitute(SSS)⁶⁾ 등이 임상적으로 사용되고 있는데 이중 plasmanate와

SSS는 다른 첨가제와는 달리 globulin성분이 첨가되어 있다. 이러한 합성 첨가물은 혈청 제제와는 달리 virus 감염이나 항정자 항체등과 같은 유해한 물질이 없으며 기존 혈청 제제들에서 거쳐야 하는 시간과 비용이 많이 드는 생쥐 배아를 이용한 정도관리가 필요하지 않은 장점이 있다. 상품화 되어 있는 체외수정 배양액인 IVF M2(Medi-cult)는 human serum albumin(HSA)과 Synthetic Serum Replacement(SSR)을 첨가한 Earle's balanced salt solution으로 철과 미량의 금속 이온을 포함하는 금속이온 완충제로 생식세포와 초기 배 발생에 적합한 배양액으로서⁷⁾ 최근 임상에 널리 쓰이고

있다.

본 연구는 Medi-cult와 인간제대혈청을 첨가한 Ham's F-10의 수정액, 배발생액, 임신률 및 임신지속율을 비교하여 향후 체외수정 배양액의 선택에 도움을 주고자 시행하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상

1994년 6월부터 1996년 1월까지 이화대학 목동병원 산부인과 불임 클리닉을 내원한 환자들중 체외수정시술 적응증을 가진 21명을 대상으로 29주기에서 시도하였다.

2. 연구 방법

불임을 주소로 하여 내원한 환자에 대한 과거력 및 이학적 소견, 호르몬 검사, 자궁나팔관 촬영, 자궁 경관 점액 검사, 성교후 검사, 배란 검사 및 배우자의 정액 검사 등을 실시한후에 과배란유도후 체외수정 및 배아이식을 실시하였다.

1) 과배란유도

과배란 유도 방법으로는 GnRH-agonist 초단기 투여법(ultra short protocol)을 이용하였는데 GnRH-a인 Decapeptyl(D-Trp-6-LHRH, Ferring, Malmö Sweden) 1mg을 월경 제 2일째부터 3일간 피하주사하고, 월경 제 3일째부터 난포자극호르몬(Follicle Stimulating Hormone, FSH, Metrodin, Serono, Switzerland)과 인간 폐경 성선 자극호르몬(Human Menopausal Gonadotropin, hMG, Pergonal, Serono, Switzerland)를 개인의 반응에 따라 매일 2~8ampule 사용하였다. hCG는 18mm이상인 난자가 1개이상일때 10,000IU 근주하였고 그후 35시간후 난자를 채취하였다. 과배란 유도의 감시는 질식 초음파를 이용하여 난포의 크기를 측정하였고 혈중 E_2 농도를 ELIZA(Enzyme immunoassay)를 이용하여 측정하였다.

2) 난자의 채취 및 분류

hCG를 투여하여 35시간 후에 Dormicum(Midazolam) 10mg과 Demerol 50mg을 정맥주사한후 질식초음파를 사용하여 난포를 흡입하였다. 난자를 포함하고 있는 난포액을 2ml의 Dulbecco's phosphate buffered saline(이하 D-PBS)을 포함하고 있는 난포액 수집통내로 흡

입하였다. 흡입 직후 다시 2ml의 D-PBS용액을 사용하여 난자 흡입 주사침내에 붙어 있는 난자가 없도록 재확인하였다. 난포액과 D-PBS용액이 들어 있는 혼합액은 즉시 배양실로 옮겨져 배양접시(Falcon #3002)에 옮긴 후 해부현미경(dissecting microscope)아래에서 난자의 존재여부를 확인하면서 난자 난구 복합체(oocyte-cumulus complex)와 과립막 세포(granulosa cell)의 발달 및 분포 정도에 따라 성숙 난자, 미성숙 난자, 과성숙 난자 및 퇴화된 난자등으로 분류하였다. 난자의 성숙도에 따라 성숙란을 Jones 등⁸⁾의 방법을 이용하여 수정 배양액에서, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4~6시간 전배양후 수정시켰다.

3) 배양액

1994년 6월부터 1995년 1월까지 7예에서는 Hams F-10에 신생아 제대혈청을 첨가한 배양액을 사용하였으며, 그 이후 1996년 1월 까지 22예에서는 혈청대체물질이 포함된 상용 배양액인 Medi-cult를 사용하였다. Ham's F-10 배양액의 제조과정은 다음과 같다. 모든 용기는 배양액 제조 직전에 물로 2회 헹군후 Volumetric flask에 물(약 500ml)을 붓고 Ham's F-10 분말을 넣어 자석교반기에서 서서히 용해시킨다. 100ml의 물에 2.5g의 sodium bicarbonate(sigma #s-5761)을 녹이고 다른 100ml의 물에 0.2452mg의 Ca-Lactate(Calbiochem #901244)를 넣어 자석교반기에서 30분 이상 용해시키고, 또 다른 100ml의 물을 넣은 beaker에 각각 0.075g의 penicillin G(sigma #p-3032)와 streptomycin(sigma #s-9137)을 넣고 잘 녹인다. 상기한 sodium bicarbonate 를 녹인 용액을 Ca-Lactate를 용해시킨 용액에 혼합한후, 이 용액을 다시 penicillin G와 streptomycin을 녹인 용액과 혼합한뒤 Ham's F-10용액에 조금씩 흔들면서 서서히 첨가한후 물을 volumetric flask의 1l 눈금까지 넣은후 잘 섞은 뒤 삼투압을 측정한다. 최종 삼투압을 280mOsm/L으로 조정후 0.2μ millipore filter 로 여과후 4°C 냉장고에 보관하였다. 수정배양액에서는 신생아 제대혈청의 농도가 7.5% 되도록 하여, 사용하였고, 성장 배양액에서는 15%가 되도록 제대혈청을 첨가하여 사용하였다.

4) 체외수정 및 수정란 배양

난편의 정액을 수음으로 specimen container(Baxter, USA)에 무균적으로 채취하여 실온에서 20~

Table 1. Result of IVF-ET cultured in Ham's F-10 media supplemented fetal cord serum vs. Medi-cult

	Ham's F-10 + Fetal cord serum(n=7)		Medicult(n=22)	
	Total	Mean ± S.D.	Total	Mean ± S.D.
Oocyte retrieved	62	8.86 ± 5.67	201	9.14 ± 5.97
No of fertilization	27	3.86 ± 2.19	153	*6.95 ± 5.63
No of cleaved	26	3.71 ± 2.14	148	*6.73 ± 5.48
Fertilization rate	43.6%	60.7 ± 31.6%	76.1%	71.8 ± 22.5%
Cleavage rate	41.9%	59.7 ± 32.7%	73.6%	70.1 ± 23.6%
No of ET	27	3.86 ± 2.19	145	*6.60 ± 4.91
ET rate*	43.6%	60.7 ± 31.7%	72.1%	69.7 ± 20.9%
Pregnancy rate	14.3%		36.4%	

*P < 0.05

*ET rate : number of embryo transfer / number of retrieved oocyte

30분간 방치하여 액화시킨 후에 정액의 양, 정자의 수 운동성 및 형태를 측정하였다. 80% continuous percoll 5.5ml를 넣은 conical tube에 액화된 정액을 넣은 후 1800rpm에서 30분간 원심분리후 수정배양액을 첨가한후 1800rpm에서 5분간 다시 원심분리하였다. 상층액을 버리고 정자괴(pellet)에 수정배양액을 천천히 첨가하여 5% CO₂ 37℃ 배양기 내에서 수정시키기 전까지 Swim up 되도록 방치한후 운동성 있는 정자를 수집하여 정자의 농도는 5×10⁵-110⁶/ml가 되도록 조절하여 수정시켰다. 수정 14~20시간 후 Pipet을 이용하여 난구세포를 제거한 후 2개의 전핵이나 제 2극체를 관찰하여 수정여부를 확인하고, 정상적으로 수정된 수정란은 성장배양액으로 옮긴후 24시간 더 배양시켰다.

5) 수정란의 자궁내 배아이식

수정 42~48시간 후 2~8세포기에 이른 수정란을 Jones 등이 고안한 이식관(transfer catheter)을 사용하여 자궁경관을 통해 자궁내로 이식하고 6시간 정도 안정시켰으며 착상이 확인될때까지 progesterone in oil 50~100mg을 매일 근육주사하였고 이식후 12일째 혈청내 β-hCG를 측정하여 임신을 확인하였다.

6) 통계처리

모든 통계처리는 DBSTAT computer system을 이용하여 student t-test로 검증 하였고, p값이 0.05미만 일때 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

결 과

채취된 난자의 수는 Ham's F-10에서 8.86±5.67개,

Medi-cult를 사용한 경우 9.14±5.97개를 채취하여 유사한 숫자의 난자를 채취하였으며 수정된 난자의 수는 시술 건당 평균 Ham's F-10에서 3.86±2.19개, Medi-cult를 사용한 경우 6.95±5.63개로 Medi-cult를 사용한 경우 통계적으로 유의하게 더 많은 난자가 수정되었다. 배분할된 배아의 수는 Ham's F-10에서 3.71±2.14개, Medi-cult를 사용한 경우 6.73±5.48개로 Medi-cult를 사용한 경우 통계적으로 유의하게 더 많은 난자가 배분화 되었다. Medi-cult를 사용한 경우 수정율은 Ham's F-10에서 43.6%, Medi-cult에서 76.1%를 보여 Medi-cult에서 더 높은 수정율을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 배분율은 Ham's F-10에서 41.9%, Medi-cult에서 73.6%를 보여, Medi-cult에서 더 높은 배분율을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 환자당 배아이식수는 Ham's F-10에서 3.86±2.19개, Medi-cult를 사용한 경우 6.60±4.91개를 이식하여 Medi-cult를 사용한 경우 통계적으로 유의하게 더 많은 배아를 이식하였다. 임신율은 Ham's F-10에서 14.3%, Medi-cult에서 36.36%로 Medi-cult에서 높은 임신율을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. Medi-cult를 사용한 환자중 8예에서 viable pregnancy가 되었다(Table 1).

고 찰

초기 배발생에 있어서 그 조절기능은 초기에는 모측에 있지만 후기로 갈수록 배아쪽으로 넘어가게 되는데, 이때 난자에서 유래되는 intracellular pool이 소실되면서 세포외 환경이 매우 중요한 역할을 하게 된다. 그러나 세포외수정에 있어서의 부적절한 배양 조건이 이러한 전이

과정에 나쁜 영향을 미칠수 있다. 체외 수정후 배발생은 단순 배양액이나, 복합 배양액 모두에서 일어나는데, 인간 체외수정 배양액에는 배양 조건의 개선을 위하여 인간제대혈청(fetal cord serum : FCS)이나 모체혈청등을 첨가하여 사용하고 있다¹²⁾. 이러한 첨가제들은 난자의 최종성숙, 정자의 capacitation, 수정, 초기 배발생, hatching등의 과정을 도우며 최근들어 이 첨가제로 모체혈청 인간제대혈청, 난포액외에도 human serum albumin³⁾ bovine serum albumin(BSA)⁴⁾, plasmanate⁵⁾, Synthetic Serum Substitute(SSS)⁶⁾등이 임상적으로 응용되고 있다.

그러나 혈청은 배아의 부화 배반포 형성을 촉진하고 배아의 성장에 도움을 줄 수 있는 c-AMP, vitamin과 같은 물질을 포함하고 있지만⁹⁾ AIDS, 간염 같은 virus감염이나, 혈소판 혹은 백혈구에서 유래하는 감염매개 물질, 수정을 방해하는 항체를 포함할 가능성이 있으며¹⁰⁻¹²⁾, 모체혈청을 사용하는 경우 그혈청이 부적절하거나 부족한 경우가 있다. 또한 첨가제로서의 적합성은 생쥐 배아를 이용하여 정도관리를 하는데¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾ 생쥐 배아의 성장과 인간 배아의 성장 체계와의 불일치성¹⁶⁾, 이에 소요되는 시간, 경비 및 노력등의 문제로 적절한 대체 첨가제가 요구된다. 최근 대체 물질로는 HSA³⁾, plasmanate⁵⁾, Synthetic Serum Substitute(SSS)⁶⁾, α -와 β - globulin을 포함한 plasma protein¹⁷⁾ 등이 연구되고 있으며 이들은 대개 human tubal fluid media나, Ham's F-10을 기본 배양액으로 하고 위의 첨가물질을 5~10% 첨가하여 사용하였다. 새로운 대체 물질에 대한 결과들은 HSA는 제대혈청과 같은 결과를³⁾ 보이는 보고와, HSA가 모체혈청보다 나쁜 결과를 보였다는 보고⁸⁾가 있으며 plasmanate, SSS도 기존 체외수정 배양액과 같은 결과를 보였으며 α and β globulin 을 포함한 혈청 단백을 첨가한 경우 거의 ZIFT(zygote intrafallopian transfer)와 같은 임신율 및 임신 지속율을 보여 기존의 체외수정 배양액보다 좋은 결과를 보고하였다¹⁸⁾.

Plasmatein은 glycoprotein을 포함하며 이것이 다른 단백질 첨가제와 다른점인데, 체내에서의 초기배발생에서 초기배아는 tubal epithelium에서 내는 여러가지 cell-surface glycoprotein과 mucus 등이 풍부한 tubal environment에 노출되게 되는데 이들 물질의 생리학적 효능은 잘 알려져 있지 않으나 glycoprotein 이 풍부한 plasmatein등에서 다른 첨가제에서 보다 좋

은 임신결과를 보여 ZIFT와 유사한 결과를 보임은 이러한 난관내의 분비 물질과 연관된 것으로 생각되나 이전에 대해서는 더 연구가 되어야 할 것으로 사료된다¹¹⁾.

상품화 되어 있는 체외수정 배양액인 IVF M2(Medi-cult)는 human serum albumin(HSA) 1%와 Synthetic Serum Replacement(SSR 2)을 첨가한 Earle's balanced salt solution으로 철과 미량의 금속이온을 포함하는 금속이온 완충제로 생식세포와 초기 배발생에 적합한 배양액으로서⁷⁾ 최근 임상에 널리 쓰이고 있다. Sundae등은 IVF M2(Medi-cult)를 배양액으로 사용하였을 경우 배아의 질이 좋아졌으며 임신율도 향상되었다고 보고 한바 있으며¹⁹⁾, IVF M2 배양액으로 수정 후 2일간 배양후 최근 개발된 M3배양액으로 옮겨 3일간 더배양하면 복잡한 co-culture과정을 거치지 않아도 blastocyst 나 morula로 발생하는 배아의 수가 많으며 그 배아의 질도 좋아 임신율이 높다고 보고하고 있다²⁰⁾. 또한 최근 학회에서 Menezo B₂ medium과 비교하여 수정률이나, 배아의 질, 냉동배아의 수에서 유사한 결과를 보고한바 있으며²¹⁾, partherogenetic activation에 대한 인간난자의 susceptibility를 증가시키는 것으로 보고 되어 있다²²⁾.

본원 체외수정 연구실에서는 1994년 6월부터 IVF를 시작하여 상반기 7에는 Ham's F-10에 인간제대혈청을 첨가하여 사용하였지만 인간제대혈청이 그 정도 관리에 많은 시간과 비용이 들기 때문에 1995년 1월 부터 Medi-cult로 배양액을 바꾸었다. 전반기에 Ham's F-10에 인간제대혈청을 첨가하여 사용한 시기에는 1예의 임신이 되었으나 계류유산되었고, 배양액을 바꾸는 시기에 1예만이 난자를 Medi-cult와 Ham's F-10으로 나누어 수정, 배양하였으며 그후는 모두 Medi-cult만으로 수정, 배양하였다. 총 22예가 Medi-cult를 배양액으로 체외수정되어 총 8예가 임신되어 3예는 분만하였고 5예는 현재 임신진행중으로 모두 태아 심박동이 있었던 viable pregnancy였다. Medi-cult와 Ham's F-10 에서 채취된 난자수는 거의 같았으나 수정된 난자수, 분할된 배아수가 통계적으로 유의하게 많았으며, 배아 이식수 또한 Ham's F-10보다 높아 임신율 또한 통계적으로 유의하게 나타났다.

두 배양액간의 비교는 전향적으로 연구되어 한 환자의 난자를 두 배양액에 나누어 배양한후 비교하여야 정확한 결과를 알 수 있겠으나, 체외수정 시술예가 적으며 인간

의 난자라는 윤리적인면이 있어서 시행치 못한 제한점이 있다.

본 연구실의 경우는 Medi-cult가 좋은 결과를 보였지만 아직 국내에서 Medi-cult의 임상 결과를 보고한바 없어서 향후 더 많은 연구가 되어야 할 것이며, 아울러 Synthetic protein인 SSR이 어떤 기전을 통하여 수정율을 향상시키는지에 대하여서도 더 연구되어야 할 것이다.

결 론

저자들은 최근 개발된 Medi-cult를 제대혈청을 첨가한 Ham's F-10을 대체해 체외수정에 사용하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 수정된 난자의 수는 평균 Ham's F-10에서 3.86 ± 2.19 개, Medi-cult를 사용한 경우 6.95 ± 5.63 개로 Medi-cult를 사용한 경우 통계적으로 유의하게 더 많은 난자가 수정되었다.

2) 배분할된 배아의 수는 Ham's F-10에서 3.71 ± 2.14 개, Medi-cult를 사용한 경우 6.73 ± 5.48 개로 Medi-cult를 사용한 경우 통계적으로 유의하게 더 많은 난자가 배분화 되었다.

3) 환자당 배아이식수는 Ham's F-10에서 3.86 ± 2.19 개, Medi-cult를 사용한 경우 6.60 ± 4.91 개를 이식하여 Medi-cult를 사용한 경우 통계적으로 유의하게 더 많은 배아를 이식하였다.

4) 임신율은 Ham's F-10에서 14.29%, Medi-cult에서 36.36%로 Medi-cult에서 높은 임신율을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

5) Medi-cult를 사용한 환자중 8예에서 viable pregnancy가 되었다.

References

- 1) Leung P, Granow M, Kellow G : *Serum supplement in human in vitro fertilization and embryo development. Fertil Steril 1984 ; 41 : 36*
- 2) Holst N, Bertheussen K, Forsdahl F : *Optimization and simplification of culture conditions in human in vitro fertilization(IVF)and preembryo replacement by serum-free media. J IVF & ET 1990 ; 7 : 47*
- 3) 김충현 · 정경순 · 박소현 · 황도영 · 김기철 · 민웅

기 : 체외수정 배양액에서 제대혈청에 대한 *Human Serum Albumin*의 대체효과. 대한산부회지 1994 ; 37 : 1792

- 4) Lopata A : *Success and failure in human in vitro fertilization. Nature 1980 ; 288 : 642*
- 5) Adler A, McVicker-Reing A, Bedford MJ, Alikani M, Cohen J : *Plasmanate as a medium supplement for in vitro fertilization. J Assist Reprod Genet 1993 ; 10 : 67-71*
- 6) Weathersbee PS, Pool TB, Ord T : *Synthetic Serum Substitute(SSS) : A Globulin-Enriched Protein Supplement for Human Embryo Culture. J Assist Reprod Genet 1995 ; 12 : 354-360*
- 7) Holst N, Bertheussen K, Forsdahl F, Berger Hakonsen M, Hansen LJ, Nielsen HI : *Optimization and simplification of culture conditions in in vitro fertilization(IVF) and preembryo replacement by serum-free media. J IVF & ET 1990 ; 7 : 47-53*
- 8) Jones HW Jr, Jonews GS, Ardrews MC, Acosta A, Bundren C, Garcia J, Sandow B, Veek L, Wort-ham JE, Wright GL : *The program for in vitro fertilization at Norfolk. Fertil Steril 1982 ; 38 : 14*
- 9) Ogawa T, Marrs RP : *The effect of protein supplementation on single-cell mouse embryo in vitro. Fertil Steril 1987 ; 47 : 156*
- 10) Menezo Y, Testart J, Perone D : *Serum is not necessary in human in vitro fertilization and embryo development. Fertil Steril 1984 ; 42 : 750-755*
- 11) Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF : *The biology of platelet-derived growth factor. Cell 1986 ; 46 : 155-169*
- 12) Halliwell B, Gutteridge JMC : *Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, Clarendon Press, 1986*
- 13) 정구민 · 문신용 · 오선경 : 배양액과 첨가제의 효율적인 품질검사에 관한 연구. 한국수정란이식연구회지 1990 ; 5 : 28
- 14) Quinn P, Kerin JF, Warnes GM : *Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertil Steril 1985 ; 44 : 493*
- 15) Davidson A, Vermesh M, Lobo RA : *Mouse embryo culture as quality control for human in vitro fertilization : the one-cell versus the two cell model. Fertil Steril 1988 ; 49 : 516*
- 16) Chi MMY, Manchester JK, Yang VC : *Contrast in levels of metabolic enzymes in human and mouse ova.*

- Biol Reprod* 1988 ; 39 : 295
- 17) Pool TB, Martin JE : *High continuing pregnancy rates after in vitro fertilization-embryo transfer using medium supplemented with a plasma protein fraction containing α - and β -globulins.* *Fertil Steril* 1994 ; 61 : 714
 - 18) Hargreaves CA, Keefe T, Rahman F, Howell RJS, Cowan D, Chard T, Santis M, Homa ST : *Serum is more effective than albumin in promoting human embryo development and implantation.* *Fertil Steril* 1995 ; 64 : 1162-6
 - 19) Sundae A : *Improvements of IVF culture systems.* *Hum. Reprod* 1993 ; 9(suppl. 4) : 137
 - 20) Muggleton- Harris AL, Glazier AM, Wall M : *A retrospective analysis of the in- vitro development of 'spare' human in-vitro fertilization preimplantation embryos using 'in -house' prepared medium and 'Medi-cult' commercial medium.* *Hum. Reprod* 1995 ; 10(suppl. 4) : 2976
 - 21) De Clerck E, Carle M, Henderix P, Janssens R, Laurier K, Janssenswillen C, Staessen C, Van Steirteghem AC : *Comparison of Menezo B2 medium with Medi- cult univeral IVF medium for human in- vitro fertilization.* *Abstracts of the 10th annual meeting of the ESHRE, brussels 1994* : 25
 - 22) Taylor AS, Shuttleworth G, Rowell P, Murphy S, Braude PR : *A change to a commercially prepared culture medium(Medi- Cult) in an IVF programme has increased the susceptibility of human oocytes to both spontaneous and induced parthenogenetic activation.* *Abstracts of the 10th annual meeting of the ESHRE, brussels 1994* : 20