

체외수정 및 배아의 자궁내 이식에 의한 임신율에 관한 연구*

계명대학교 의과대학 산부인과학교실

이 두 퉁·서 규 표·정 태 일

서 론

최근 체외수정(in vitro fertilization, IVF) 및 배아의 자궁내 이식(embryo transfer, ET)에 의한 임신이 불임치료의 새로운 한 방법으로 대두되고 있으며, 인간에 있어서의 체외수정 및 배아의 자궁내 이식은 1965년 Edwards¹⁾에 의하여 최초로 시도된 후 1976년에 Steptoe와 Edwards²⁾는 체외수정 및 배아의 자궁내 이식에 의하여 자궁외 임신을 보고하였고, 1978년에 자연배란 주기에서 흡인된 난자로 체외수정시켜 세계 최초의 시험관아기를 탄생시켰다^{3,4)}. 1982년 Trounson 등⁵⁾은 Clomiphene citrate로서 정상 월경 주기를 가진 여성에서 과배란을 유도한 후, 난자를 흡인하여 체외에서 수정시켜 배아를 자궁내에 이식한 후 임신에 성공하였음을 보고하였다. 1983년 Garcia 등⁶⁾은 Human Menopausal Gonadotropin(HMG)을 이용하여 정상 월경주기를 가지고 있는 부인에게 과배란을 유도하는 방법을 고안하였으며, Jones 등⁷⁾은 HMG로 과배란을 유도한 후 체외수정 및 배아의 자궁내 이식을 시행하여 임신이 성공되어 분만하였다고 보고하였다. 그 외 과배란을 유도하는 방법으로는 Follicle Stimulating Hormone(FSH)과 함께 HMG로써 월경 3일째, 4일째 각각 근육주사하고 5일째부터 HMG로써 근육주사하는 combo, 최근에는 Gonadotropin Releasing Hormone Agonist(GnRH-a)에 의하여 과거의 과배란 주기에서 premature LH surge가 있었거나, 과배란에서 난자가 잘자라지 않았던 poor response group에서 좋은 결과를 보고하고 있고, 요즈음에는 처음 시작하는 과배란 주기부터 GnRH-a를 주사하여 좋은 결과를 보고하고 있다.

체외수정 및 배아의 자궁내 이식술은 난관이 모두 상실되었거나, 난관의 복원이 불가능하여 다른 방법으로는 임신이 불가능한 경우, 남성 불임증, 원인 불명의 불임증, 자궁경관 점액상태의 불량, 자궁내막증 등에서 시술되고 있다. 체외수정 및 배아의 자궁내 이식이 성공하는데는 대상환자의 염선, 난소의 과배란 유도, 난자의 흡인채취, 정자의 준비, 채취된 난자의 추가 배양, 배양기내의 수정 및 분할, 배아의 자궁내 이식, 초기임신시의 정밀한 추적관찰 등이 성공적으로 진행되어야 한다.

저자들은 계명대학교 의과대학 산부인과학교실 불임크리닉에서 1991년 5월부터 1992년 3월까지 실시된 체외수정 및 배아의 자궁내 이식에 의한 임신율에 관한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

연구대상

1991년 5월부터 1992년 3월까지 10개월간 불임을 주소로 본원 산부인과 불임크리닉을 내원한 환자들 가운데 체외수정시술 적용증을 가진 47명을 대상으로 50주기에서 시도하였다. 대부분의 체외수정의 적용증은 난관성 불임으로 난관이 폐쇄되어 난관성형술을 시행하였으나 수술 후 계속하여 임신이 되지 않거나, 난관폐쇄가 너무 심해서 난관성형술을 시행할 수가 없는 경우와, 과거 자궁외 임신으로 한쪽 혹은 양측 난관이 없는 경우가 38명이었으며, 그 외 원인불명이 6명, 자궁요인이 2명, 남성요인이 1명, 배란장애 1명의 순으로 나타났다.

연구방법

(과배란 유도) : 체외수정시술에 있어서 가장 중

* 이 논문은 1992년도 계명대학교 윤종 연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌다.

요한 것은 배란 직전의 성숙난자를 많이 채취하는데 있다. 따라서 체외수정시술의 여러 과정 가운데 다수의 난포발달과 다수의 배란직전의 성숙 난자 채취를 가능하게 하는 효과적인 과배란유도가 중요하다. 본연구에서의 과배란 유도는 GnRH-a인 Lucrin, Busereline으로 short term protocol 44주기, long term protocol 6주기였다. short term protocol은 Lucrin 1.5 mg/day, 월경주기 2, 3, 4일째에 피하주사하고, 월경주기 5일째부터 HCG투여때 까지 1.0mg/day 주사하였고, 월경주기 3, 4일째에 FSH(75IU) 3 앰플씩 각각 근육주사하였고 월경주기 5일째부터 매일 HMG(75 IU) 2~3앰플씩 난포의 크기가 18mm정도인 것 2~3개가 질초음파(MEDISON 4500) 상에서 보일때까지 근육주사하였다. Busereline인 경우 월경주기 2일째부터 매일 0.6ml씩 HCG 주사때 까지 피하주사 하였고, FSH, HMG 주사는 Lucrin때와 같이 하였다. long term protocol은 Lucrin인 경우 월경주기 21일째부터 매일 1mg씩 10일간 주사후, 11일째부터 HCG 주사때 까지 0.5mg씩 주사하였고 Lucrin 0.5mg씩 주사 5, 6일째에 각각 FSH 2앰플씩 근육주사후, 7, 8일째에 각각 오전에 FSH 2앰플, 오후에 HMG 2앰풀을 근육주사하고, 9일째부터 난포의 크기가 18mm정도인 것 2~3개가 질초음파상에서 보일때까지 매일 HMG 2~3앰플씩 근육주사 하였다. Busereline인 경우 월경주기 21일째부터 10일간 매일 0.6 ml씩 피하주사하였고, 11일째부터 0.3ml씩 HCG주사때 까지 피하주사하였고, FSH, HMG는 Lucrin때와 같이 하였다.

(난포 발달의 추적) : 초음파촬영은 월경시작 첫날 실시하여 꿀반내 난소낭종등 이상여부를 본후 월경 6일째부터는 매일 실시하였다. 방사면역측정(Radioimmunoassay)에 의하여 월경 2일째부터 난자흡인 때까지 매일 혈청 Esradiol(E_2) 및 Luteinizing Hormone(LH) 농도를 측정하였다. 난포의 크기가 18mm정도인것이 2~3개 초음파상에서 보이고 Esradiol(E_2)농도가 계속 증가하거나 plateau를 이룰때 HCG 10,000IU 근육주사 하였다.

(난자의 질식흡인) : HCG 투여 34시간후 Valium 10mg, Demerol 50mg을 정맥주사한후 질식초음파(Kretz 310)에 의한 질벽을 통하여 난자의 흡인을 시행하였다.

흡인후 난포액에서 해부현미경(Dissecting microscope)을 이용하여 난자를 확인한후 가능한한 대기와의 노출을 적게하여 수정배양액의 배양접시로 옮겼다. 난자는 과립막 세포의 발달및 분포정도에 따라 Sandow²³의 분류방법을 응용하여 배란직전의 성숙난자, 중등도 성숙난자, 미성숙난자, 과성숙 난자로 분류하였다.

(배양액과 추가배양) : Ham's F-10(Gibco #430-1200)으로 250ml의 Highly Purified Liquid Chromatograph(HPLC)에 penicillin G(Sigma) 75mg, streptomycin sulfate(Hoechst) 75mg을 첨가한후 monthly stock media를 만들고, 충분히 용해하도록 철저히 혼들후, 0.2 micron Nalgene filter를 통하여 여과 시킨후 4°C 냉장고에 보관하였다. 이와같이 만들어진 monthly stock media 25ml에 HPLC 75ml을 혼합하고, lactic acid calcium salt(Hoechst) 27.8mg과, NaHCO₃ (Mallincrodt) 210.6mg, phenol red(Grand Island Biological Company) 25micro liter를 첨가한 후, 수소이온 농도(PH)는 7.4에 맞추고, 삼투압 280-284 mosm가 되도록하며, CO₂ incubator안에 보관해 두었다가, 신생아 제대혈청의 농도가 수정배양액은 10%, 성장배양액은 20%가 되도록 혈청을 첨가한후 매사용직전 가압여과 시킨후 사용하였다.

배란직전의 성숙된 난자는 10% Ham's F-10 배양액내에서 6~8시간 추가배양을 실시하였다. 미성숙난자는 동일한 배양액내에서 24~48시간이상 추가배양하여 수정을 실시하였다.

(정자의 준비및 수정) : 남편의 정액을 수정 3~4시간전에 수음(masterbation)으로 50ml 멸균소독된 용기(녹십자)에 무균적으로 채취하여 액화되도록 실온에서 30분간 방치하였다. 액화후 기본적인 정액검사를 실시하여 정자의 수, 운동성, 형태등을 관찰한후 과거에 시행한 정액검사 소견과 비교검토 하였다. 정자에 수정능력(capacitation)을 부여하기 위하여 액화된 정액 1~2ml에 2~4ml의 Ham's F-10으로 회석하여 원심분리기에서 800 x g로 10분간 원심분리를 시행하여 정자의 원침(pellet)을 만든다. 상충액을 제거하고 다시 1~2ml의 Ham's F-10으로 같은 과정을 2회 반복한후 정자의 원침을 만든다. 여기에 0.5~1ml의 Ham's F-10을 원침이 흔들리지 않도록 조심하여 추가한후 배양기내에서 2시간 동안 방치하였다. 운동성정자가 상충액에 부유된것을 확인한후, 상충액만 모아 활동성이 증가된 정자의 수와 운동성을 검사하였다. 추가배양이 끝난 난자를 함유하고 있는 수정배양액내의 정자의 농도가 0.5~1.0x 10⁶/ml of medium이 되도록하여 각각의 배양접시에 수정시켰다.

(수정난 배양): 수정시킨후 18~24시간동안 추가 배양시켰다. 이후 역반사 현미경(Invetered microscope)하에서 두개의 전핵이나 제2극체를 관찰하여 수정여부를 확인하였고 수정이 정상적으로 잘일어났으면 수정란은 20% 신생아 제대혈청이 험가된 성장배양액으로 옮겨 더 배양하였다.

(배아의 자궁내 이식): 수정후 36~40시간후 4~6세포기기에 이른 배아를 자궁내에 이식하게 된다. Tomcat catheter 끝에 1ml tuberculin syringe를 부착한후 해부현미경하에서 10 micro liter의 50% 배양액, 공기 10 micro liter, 배아를 담고잇는 50% 배양액 30micro liter, 공기 10 micro liter, 10 micro liter의 50% 배양액의 순으로 Tomcat catheter속으로 배아을 흡인하였다. 환자는 쇄석위의 자세를 하고 자궁경부를 tenaculum을 사용하여 노출시킨후에 자궁경관의 점액을 가제로 닦아내고 Tomcat catheter 끝부분이 자궁강내의 자궁저부 가까이 접근시킨후 Tomcat catheter에 연결된 Tuberculin syringe를 사용하여 배아를 자궁내에 이식시킨후 Tomcat catheter를 현미경하에서 관찰하여 배아의 이식을 확인하였고, 절초음파로써 자궁강내의 배아를 확인하였다. 배아이식후 3일동안 안정시키고 이식후 12일째 혈청 beta-HCG를 측정하여 임신여부를 확인하였고 이식후부터 매일 progesterone 50~100mg씩 근육주사 하였다.

결 과

적응증: 불임의 원인이 난관성(tubal) 38명, 원인 불명 6명, 자궁 2명, 남성측 1명, 배란장애 1명이었다

Table 1. Indication of IVF-ET

Indication	Cases	Percent
Tubal factors	38	79.17
Unknown causes	6	12.50
Uterine	2	4.17
Male factors	1	2.08
Ovulation failure	1	2.08
Total	48	100.00

난자채취율 및 성숙도

난자채취를 시행한 주기는 50주기였으며 이 가운데 난자채취에 성공한 주기는 48주기로 난자채취율은 96% 이었다. 난자채취에 실패한 2주기는 과거 난관 성형수술등으로 난소주위의 심한 유착으로 난자흡인바늘이 난소로 접근이 불가능한 경우 이었다. 난자채취에 성공한 48주기에서 흡인된 난자의 수는 322

개로 난포흡인당 채취된 평균난자수는 6.7개였다.

채취된 난자의 성숙도는 배란직전의 성숙난자가 50개로 채취된 전체난자의 15.52%, 중등도 성숙난자가 219개로 68.01%, 미충석난자가 11개로 3.41%, 과성숙난자가 42개로 13.04%를 차지하였다(Table 2).

Table 2. Classification of oocyte maturity

Preovulatory	50(15.2%)
Intermediate	219(68.01%)
Immature	11(3.41%)
Postmature	42(13.04%)

난자의 난활율

난자채취에 성공한 48주기에서 얻어진 322개의 난자가운데 수정후 142개에서 난활(cleavage)이 있어 난활율은 44.09%로 난자채취당 평균 난자난활수는 2.95개였다.

배아의 자궁내 이식 및 임신

난자채취에 성공한 48주기중 45주기에서 수정난을 얻어 배아이식을 시행하였으며 난자채취당 배아이식율은 93.75%였다.

Table 3. Results of IVF-ET from May 1991 to March 1992

Characteristics	Number of cases
Total patients	47
Aspiration cycle	50
Successful aspiration cycle	48
Transfer cycle	43
Pregnancies, clinical	9
Per aspiration (%)	18.75
Per transfer (%)	19.14
Outcome	
Premature delivery(surrogate)	1
Ongoing pregnancies(1 surrogate included)	7
Combined pregnancy	1
Preclinical(chemical) pregnancies	12

임신된 예는 9례로 난자채취당 임신율은 18.75%였으며, 배아이식당 임신율은 19.14%이었다(Table 3).

임신의 결과

임신이 된 9례중 1명(대리모 임신)은 임신 32주에 사정에 의하여 분만하였으며, 7명은 현재 정상적인 임신상태로 진행중이며(대리모 1명 포함), 1명은 자

궁내 및 난관에 임신이 동시에 된 병합임신으로 수술을 받았고, 그외 12례의 화학임신(precclinical, chemical pregnancy)이 있었다(Table 3).

고 칠

채외수정시술에 있어서 배란되기직전의 성숙난자를 채취하는 것이 중요하다. 자연배란주기에서 혹은 과배란을 유도하여 배란직전의 난자를 채취하는 두 가지로 나눌수 있다. 자연배란주기를 이용하는 경우에는, 스트레스등으로 인하여 배란이 지연되거나 배란일 되지 않는 경우라든지, 정상월경주기에서는 단한개의 성숙난자가 있으므로 성숙난자를 얻을 기회가 적어진다. 또한 자연배란 주기에 대한 기본적인 정보를 얻기 위하여 두번 이상의 월경주기를 감시하여야 할 필요가 있고, LH surge가 시작되고 배란전에 난자채취를 실시하여야 하므로 밤낮없이 주중 주말에 관계가 없이 언제든지 시술할 준비가 되어있어야 하는점, 또한 난자채취율이 낮은점등의 단점이 있다. 그러나 과배란유도를 하지 않으므로서 채외수정시술 대상환자의 정신적 육체적 경제적인 부담을 경감하는 장점이 있다. 그러나 채외수정에 의한 임신성공율의 증가를 갖어온것은 다수의 난자채취와 다수의 배아이식을 가능하게하는 과배란유도방법에 의한 것이라고 생각된다⁶⁾. 채외수정에 의한 임신율은 자궁내로 이식된 배아수와 관계가 있으며^{7~9)}, 특히 성숙난자의 수와 관계가 깊다^{7~11)}. 채외수정시술을 위한 난소의 과배란 유도시 clomiphene citrate, HMG, FSH, GnRH-a등 여러가지 regimen으로 이용되고 있는데, clomiphene citrate 단독투여는 난포수 발달에 한계가 있으며 난자의 quality나 황체에 나쁜 영향을 준다고 하며^{12,13)}, HMG 단독투여는 수정란의 수는 증가되나 난자의 asynchronous development와 황체기 부적합을 유발하여 임신율은 증가하지 않는다고 하였다^{14,15)}. 그외 FSH가 인간의 뇨에서 최근 고농도로 정제되어 실용화된후 FSH/HMG가 과배란유도시 많이 사용되고 있으며^{16~19)}, 본연구에서도 전예에서 사용되었다. Soccia 등²⁰⁾은 난소의 과배란 유도중 HMG에 함유되어있는 LH의 용량이 난포내 androgen생성을 과도하게 증가시킴으로서 난자의 성숙을 저하시킬수 있으며 FSH만을 사용할 경우 난포성장이 더 균일하고 steroid생성이 더 효과적이었다고 하였다. Lavy 등²¹⁾은 난포기 초기에는 상대적으로 LH요구량이 적으므로 FSH regimen이 더욱 생리적이고, HMG사용시에는

FSH투여시에 비하여 성숙한 난자-난구-관상세포 복합체내 aromatase활성도가 조속히 감소되어 난포액내 testosterone농도가 상승되고 E₂/Testosterone비가 감소되므로 이러한 변수가 난자의 질저하와 관련성이 있다고 보고하였다.

현재까지 채외수정을 위한 보편화된 과배란유도 regimen이 없으며 시험관아기센터마다 모두 다른것이 현재의 실정이다. 과배란유도를 시행한 경우 배란유도제에 따른 개개인의 반응정도는 stress, 체질, 환경에 대한 적응성, 감정의 변화등에 의하여 영향을 받는것으로 생각되고 있다²²⁾.

요 약

1991년 5월부터 1992년 3월까지 11개월간 불임치료를 목적으로 본원 산부인과 불임크리닉을 찾아온 환자중 채외수정및 배아의 자궁내 이식의 적용중이 되는 47명을 대상으로 질식초음파로서 채외수정및 배아의 자궁내 이식술을 시행하여 9례에서 임신이 성공되었기에 문헌고찰과 함께 보고하는 바이다.

참 고 문 헌

1. Edwards RG: Maturation of in vitro human ovarian oocytes. *Lancet* 1965; 2: 926-928.
2. Steptoe PC, Edwards RG: Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet* 1978; 1: 880-881.
3. Steptoe PC, Edwards RG: Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2: 336-337.
4. Edwards RG, Steptoe PC: Establishing full term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynecol* 1980; 87: 737.
5. Trounson AO, Mohr LR, Wood DC, et al: Effect of delayed insemination on in vitro fertilization, culture. *J Reprod Fertil* 1982; 64: 285-286.
6. Garcia JE, Jones GS, Acosta AA, et al: Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration phase II. *Fertil Steril* 1983; 39: 174-175.
7. Jones HW Jr, Jones GS, Andrwe MC, et al: The program for in vitro fertilization at Norfork. *Fertil Steril* 1982; 38: 14-15.
8. Speris AL, Lopata A, Gronow MJ, et al: Analysis of benefits and risks of multiple embryo transfer.

- Fertil Steril* 1983; 38:468.
9. Jones HW Jr, Acosta AA, Andrews MC, et al: Three years of in vitro fertilization at Norfork. *Fertil Steril* 1984; 42:826.
10. Trounson AO, Leeton JF, Wood C, et al: Successful human pregnancies by in vitro fertilization and embryo transfer in the controlled ovarian cycles. *Science* 1981; 212: 681-682.
11. Wood C, McMaster R, Rennie G, et al: Factors influencing pregnancy rates following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1985; 43: 254-246.
12. Marrs RP, Paulsan RJ: Ovulation stimulation and monitoring in vitro fertilization. *Curr Prob Obstet Gynecol Fertil* 1986; 22: 508.
13. Quigley MM, Maklad NF, Wolf DP: Comparison of two clomiphene citrate dosage regimen for follicular recruitment in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1983; 40: 178.
14. Laufer N, Decherney AH, Haseltine FP, et al: The use of high dose human menopausal gonadotropin in IVF program. *Fertil Steril* 1983; 40: 734-735.
15. Garcia JE, Acosta AA, Jones HW: Advanced endometrial maturation after ovulation induction with human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1984; 41: 31.
16. Balmaceda JP, Pool TB, Arana JB, et al: Successful in vitro fertilization and embryo transfer on cynomologus monkeys. *Fertil Steril* 1984; 42: 791-792.
17. Venturoli S, Orsini LF, Paradisi R, et al: Human urinary follicle stimulating hormone and human menopausal gonadotropin in induction of multiple follicle growth and ovulation. *Fertil Steril* 1986; 45: 30-31.
18. Musaher SJ, Garcia JE, Rosenswaks Z: The combination of follicle stimulating hormone and menopausal gonadotropin for the induction of multiple follicular maturation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1985; 44: 62-63.
19. Bernadus RE, Jones GS, Acosta AA, et al: The significance of the ratio of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in the induction of multiple follicular growth. *Fertil Steril* 1985; 43: 373-375.
20. Scoccia B, Prins G, Blumenthal P, et al: Comparison of urinary human follicle-stimulating hormone and human menopausal gonadotropins for ovarian stimulation in an in vitro fertilization program. *Fertil Seril* 1987; 48: 446-447.
21. Levy G, Pellicer A, Diamond MP, et al: Ovarian stimulation for in vitro fertilization and embryo transfer, human menopausal gonadotropin versus pure follicle stimulation hormone: A randomized prospective study. *Fertil Seril* 1988; 50: 74-75.
22. Edwards R G, Fishel SB, Cohen J, et al: Factors influencing the success of in vitro fertilization of alleviating human infertility. *J In Vitro Fertil Embryo Trans* 1984; 1: 13.
23. Sandow BA: Characteristics of human oocytes aspiration for in vitro fertilization. *Infertil* 1983; 6: 143-144.

=Abstract=

The Study on Pregnancy Rate by in Vitro Fertilization and Embryo Transfer

Du Ryong Lee, MD; Kyu Poe Suh, MD; Tae Il Jung, MD

*Department of Obstetrics and Gynecology Keimyung University,
School of Medicine, Taegu, Korea*

In vitro fertilization and embryo transfer has been used as a part of treatments for infertile patients. Our IV-ET program began in June 1986 and first IVF-ET baby was delivered in December 8, 1991.

The number of treated subjects in our IVF-ET program were 47 and the number of total cycles of controlled ovarian hyperstimulation were 50. Ultrasound guided transvaginal follicle aspiration was successful in 48 cycles and success rate of follicle aspiration was 96%. The number of ova picked up were 322. The mean number of retrieved oocytes per follicle aspiration was 2.95. The maturity of 322 aspirated ova showed 50 preovulatory mature oocytes(15.2%), 219 intermediate(68.01%), 11 immature(3.41%), 42 postmature(13.04%). Embryo transfer was done in 45 cycles(93.75% of successful aspiration cycles). The mean number of cleaved oocyte per aspiration cycle was 2.95 and successful cleavage rate after insemination was 44.09%. Pregnancies were obtained in 21 cases. Clinical pregnancy rate per follicle aspiration was 18.75%, clinical pregnancy rate per embryo transfer was 19.14%, of these 21 cases, there was 1 premature delivery(surrogate), 7 ongoing pregnancies(1 surrogate included), 1 combined pregnancy(intrauterine and tubal pregnancy) and 12 preclinical (chemical) pregnancies.

Key Words: IVF-ET, Pregnancy rate