

Clinical Application of IVM-IVF Program

최 동 희

포천 중문의대 산부인과

In vitro maturation (IVM)의 요점은 체외에서 germinal vesicle (GV) stage의 난자를 metaphase II 상태의 난자로 성숙 발달을 유도하는 것이다. 적절한 배양액 내에서 human oocyte의 in vitro maturation (IVM)이 가능하다는 것은 이미 1965년 Edwards 등에 의해 보고되었고, 3년 후 같은 저자는 in vitro maturation 된 난자의 fertilization에 성공하였다. IVF-ET 프로그램이 임상에 도입된 이후, 1991년 차 등 (Cha 등, 1991)은 폐기되는 난소에서 채취한 인간 미성숙 난자를 체외 성숙, 수정 후 이식하여 인간에서 미성숙 난자를 이용한 첫 분만을 보고하였다. 또한 1994년 Trounson 등 (Trounson A, 1994)은 다낭성 난소 증후군 (PCOS) 환자에서 과배란 유도 없이 미성숙 난자를 질식 초음파를 이용하여 회수 후 체외수정 임신에 성공하였다.

최근 난자의 체외 배양 기술의 발전과 함께 conventional IVF-ET 프로그램에서 사용되는 과배란 유도 주사에 대한 부작용에 대한 염려 때문에 미성숙 난자를 이용한 불임 치료의 효용성이 부각되고 있다. 과배란 유도하지 않고 미성숙 난자를 이용한 ART program은 gonadotropin의 사용으로 인한 경제 부담, 주사를 맞아야 하는 신체적 고통, 난포 감시 (follicle monitoring)를 위해 혈액검사와 초음파 검사를 해야 하는 번거로움, 고농도의 배란유도제에 의한 부작용 등의 다양한 문제점들을 감소시킬 수 있는 장점이 있다. 특히 PCOS 등의 무배란 환자에서 배란유도제 투여 시 발생빈도가 증가하는 난소과자극증후군 (OHSS)의 위험을 방지 할 수 있는 대안으로 높게 부각되고 있다. Poor responder 환자들에게도 이용이 되고 있으며 (Liu 등, 2003), 1997년부터 최근까지 아직은 적은 수가 보고되고 있으나 정상적인 생리 주기를 갖는 불임환자에 있어서도 미성숙 난자를 이용한 임신의 성공이 보고되고 있다 (Russel 등, 1997).

또한 최근 미성숙 난자 프로그램과 난자의 냉동 프로그램을 접목시키려는 시도가 이루어지고 있는데 이러한 시도는 악성 종양 등으로 인하여 난소의 기능 상실이 예상되는 환자들의 난소를 냉동 보관 후 이용할 수 있는 가능성을 갖게 한다.

이러한 다양한 장점 때문에 동물의 배양체계를 기본으로 하는 다양한 배양 방법들을 도입하여 새로운 인간의 미성숙 난자 프로그램을 개발하려는 노력이 진행되고 있다.

1. 미성숙 난자의 체외 성숙

인간의 난자는 태아기에 제 1 감수분열을 시작하여 제 1 감수분열의 중기에 arrest 되어 있다가 사춘기에 이르러 배란 전에 LH surge를 받으면 제 1 감수분열이 완성되어 제 1극체를 방출하고 바로 제 2 감수분열로 들어가 중기 상태에서 배란이 되며, 배란된 난자는 정자에 의해 fertilization이 되어야 제 2

감수분열을 완성한다.

그런데 직경 2~10 mm인 antral follicle로부터 난자를 회수하면 GV stage, 즉 제 1 감수분열 중기에 있는 미성숙 난자가 회수되는데, 난자가 난포로부터 release되면 in vivo에서 LH surge를 받은 것과 같은 효과를 나타내어 난자의 핵 성숙이 진행되어 metaphase II 상태의 성숙 난자를 얻을 수 있다. 이러한 미성숙 난자를 체외에서 배양 (in vitro maturation: IVM)하여 성숙 난자가 얻어지면 IVF하여 임신 시도를 하게 된다.

2. Patient selection

1) PCOS (다낭성 난소증후군)

다낭성 난소증후군 환자는 배란 유도 주사로 치료받는 경우 난소과자극증후군의 발생 가능성이 높고 초음파로 여러 개의 antral follicles이 쉽게 관찰되므로 미성숙 난자 IVM-IVF의 주된 치료 대상이 된다.

2000년 Cha 등은 PCOS 환자를 대상으로 85주기에서 생리 주기 10~13일째에 미성숙 난자를 채취하여 IVM-IVF 후 27.1%의 임신 성공율을 보고하였다. 이 연구에서는 난자 채취 전 gonadotropin이나 hCG를 투여하지 않았다.

임신율과 착상율을 높이기 위한 노력으로 미성숙 난자 채취 전 FSH나 hCG priming이 시도되었다. 2001년 Mikkelsen 등은 PCOS 환자에서 월경 주기 3일째부터 3일간 rFSH 150 IU를 투여하고 2~3일 후 미성숙 난자 채취하여 FSH priming 하지 않은 군에 비해 높은 임신율 (29.0%:0%)과 착상율 (21.6%:0%)을 얻었다고 보고하였다.

또한 Chian 등은 미성숙 난자 채취 36시간 전에 hCG 10,000 IU를 투여하면 미성숙 난자의 maturation rate이 향상되고 난자 성숙에 걸리는 시간도 짧아지며 회수되는 난자의 수도 증가한다고 하였다. 이 저자는 같은 방법으로 1000 cycles의 multicenter study에서 30~35%의 좋은 임신율을 보고하였다.

2003년 Lin 등은 PCOS 환자의 65 cycles에서 FSH+ hCG 군과 hCG만으로 priming한 군으로 나누어 보았을 때 두 군 사이에 미성숙 난자의 성숙율, 난자의 수정율, 임신율에 차이가 없었다고 하여 FSH priming은 필요하지 않다고 하였다.

2) Poor Responder

Conventional IVF 시술을 위해 gonadotropin을 2주 정도 투여하여도 난포의 성장이 18 mm 이상 일어나지 않는 환자들을 대상으로 하여 직경 12 mm의 난포로부터 미성숙 난자를 채취하여 IVM-IVF 후 3예의 임신이 보고되어 (Liu 등, 2003), 미성숙 난자의 IVM-IVF는 배란유도제에 대한 poor response로 주기 취소를 해야 하는 경우의 환자들을 위한 또 다른 대안으로 생각되고 있다.

3) 정상 배란 주기를 갖는 경우

미성숙 난자의 IVM-IVF는 배란이 되는 환자에서도 시행될 수 있다. Mikkelsen 등 (2001)은 미성숙

난자 채취 시기를 우성 난포가 선택되는 시기로 정했다. 즉 leading follicle 이 10 mm이고 자궁내막 두께가 적어도 5 mm 되었을 때 미성숙 난자를 채취하여 87주기에서 이식 당 18%의 임신율을 얻었다. 이 논문에서는 우성 난포가 있는 난소에서 채취된 미성숙 난자의 성숙율과 수정 후 난할율이, 우성 난포와 반대편 난소에서 채취된 미성숙 난자에 비해 저하되지 않았다.

정상 배란 주기에서도 미성숙 난자 채취 전 FSH priming을 하는 시도가 있었으나 FSH priming을 하지 않은 주기에 비해 장점이 없는 것으로 보고되었다.

3. 난자의 회수 방법

질식 초음파를 이용한 미성숙 난자의 채취 방법은 1994년 Trounson 등이 보고한 방법을 따르고 있다.

성숙 난자 채취와의 차이는 aspiration needle 끝의 경사면이 짧고 (shorter bevel), 난자 채취 시 낮은 압력 (80 mmHg)을 이용한다는 점이다. 동물 실험에서 난자 채취 시 음압을 낮추는 것이 intact COC (cumulus oocyte complex) 회수율을 높이는 것으로 보고되었다. Single 또는 double lumen needle을 사용하는 것의 결과 차이는 없는 것으로 알려져 있다. 마취는 난자 채취에서 일반적으로 사용하는 IV analgesia를 이용하며 직경 2~10 mm 난포로부터 난자를 회수한다.

4. 미성숙 난자의 배양액

난자 성숙을 위한 배양 조건은 크게 핵 성숙과 mitochondria, cytoskeleton, cortical granule 등의 형태 및 분포가 정상적으로 나타나는 세포질 성숙의 모든 조건을 충족시킬 수 있어야 한다.

미성숙 난자의 체외 배양에는 TCM (tissue culture medium)-199, Ham's F-10 또는 Chang's medium 같은 complex culture medium에 bicarbonate나 HEPES를 buffer로 사용하고 serum, gonadotropin, E₂ 등이 보충되어 사용되고 있다.

배양액의 성분 중 glucose, pyruvate, lactate 등은 주된 에너지 대사의 기질로 사용된다. 그런데 cumulus cell은 glucose나 lactate를 pyruvate로 전환시켜 난자로 하여금 pyruvate를 이용하도록 하는 것으로 알려져 있다. 최근 sodium pyruvate는 non-serum maturation medium에서 bovine cumulus-denuded oocyte의 핵 성숙을 촉진시키는 것으로 보고되었다. 하지만 pyruvate 단독으로는 난세포질 성숙 유도에 불충분하다는 보고도 있다.

한편 glucose를 mouse cumulus-oocyte complex에 처리하면 난자 내의 cAMP 농도가 높아져 GVBD rate가 감소하는 것으로 보고되었다. 하지만 최근 보고에 의하면 미성숙 난자의 maturation medium에 glucose가 포함되는 것이 bovine과 human 난자의 핵 성숙과 세포질 성숙에 유익하다고 하였다.

미성숙 난자의 체외 배양액에는 essential and/or non-essential amino acids가 첨가된다. 이들 amino acids는 단백질 합성에 이용되고 osmolytes, intracellular buffer, heavy metal chelator 그리고 energy source로 작용한다. Amino acids는 rabbit, hamster, bovine, porcine oocyte maturation을 support하며, non-essential amino acids와 essential amino acids는 난세포질 성숙에 synergy 효과를 가지는 것으로 보고되어 있다.

수용성 비타민을 oocyte maturation medium 첨가하면 preimplantation embryo의 glucose metabolism에 영향을 미쳐 배 발달 (embryonic development)이 향상된다는 보고가 있다.

1) Serum

Human IVM을 위한 배양액에는 serum을 보통 첨가한다. 그 종류에는 fetal bovine serum, fetal cord serum, synthetic serum substitute, patient serum 등이 있다. Serum이 난자 성숙을 촉진하는 것은 그 안에 포함된 growth factor (EGF, IGF-1 등) 때문이라고 생각된다.

2) Gonadotropins

대부분의 IVM medium에는 FSH 또는 LH가 포함된다. Recombinant FSH, LH는 미성숙 난자 성숙에 도움이 된다고 보고되었고 rhCG와 rLH가 난자 성숙을 촉진시키는 데에 유사한 효능을 가진다고 알려져 있다. 2000년 Anderiesz 등은 배양액 내 FSH:LH가 1:10일 때 human oocyte의 발달능력이 향상된다고 보고하였으나 다른 논문에 의하면 FSH:LH 비는 중요하지 않다.

3) Steroids

인간의 미성숙 난자의 IVM 배양액에 E_2 를 첨가하면 감수분열을 촉진시키는 효과는 없으나 수정율과 난할율은 증가한다고 알려져 있다. 실제 E_2 는 배양액에 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 첨가된다.

그 외에 EGF나 IGF의 등의 growth factor의 첨가, scavenger인 antioxidant의 첨가, 그리고 meiosis activating sterol (MAS) 등의 첨가 등에 대한 관심도 증가되고 있다.

4) Cumulus cell

미성숙 난자의 IVM 중 난자 주위의 난구 세포는 난세포질 성숙에 유리하게 작용한다. 동물 실험 결과 cumulus cell은 배 발달 (embryonic development) 뿐 아니라 수정 후 male pronucleus 형성에도 도움이 된다. Denuded oocyte와 cumulus-intact oocyte의 세포질 내의 단백질 합성 양상도 서로 차이가 있다고 보고되었다. FSH는 cumulus-intact oocyte 내의 단백질 합성을 조절한다. 미성숙 난자와 난구 세포를 같이 배양할 경우, 배양액 내의 gonadotropin에 의해 배양 중 난구 세포로부터 E_2 분비가 촉진되므로 배양액 내에 E_2 를 따로 첨가할 필요가 없다.

5. In Vitro Maturation

Unstimulated cycle에서 회수된 GV stage의 난자는 체외에서 배양하면 36~48시간 후 성숙된 난자인 M II 상태가 된다. 반면 배란유도제를 투여한 주기에서 회수된 GV stage의 미성숙 난자는 IVM 20~24시간 후에는 M II 상태에 도달한다. 또한 같은 환자에서 얻어진 미성숙 난자들도 그 성숙에 걸리는 시간이 다를 수 있으므로 maturation rate에 따라 insemination 시간을 달리하여야 좋은 수정율을 얻을 수 있다.

6. 수정 (fertilization)과 자궁내막의 준비

IVM으로 성숙된 난자의 fertilization을 유도하기 위해서는 conventional insemination보다는 ICSI가 이용되고 있다. 과배란 유도제를 사용하지 않은 PCOS 환자에서 얻어진 IVM oocyte의 수정에 ICSI가

필수적이지는 않다는 보고도 있으나 예상하지 못한 낮은 수정율의 위험성을 줄이기 위해 일반적으로 IVM oocyte의 수정을 위해서는 ICSI를 이용한다. 또한 cumulus cell을 제거하는 것이 제 1극체 방출을 확인하여 난자의 성숙을 확인하는 데에도 도움이 된다.

미성숙 난자를 채취한 주기에서는 자궁내막이 endogenous estrogen에 의해 충분히 노출되지 않았기 때문에 수정란을 착상 시키기에 불충분한 상태를 보이는 경우가 많다. 따라서 exogenous estrogen과 progesterone을 투여하여 receptive endometrium으로 준비시켜야 한다. 난자 채취 일부터 자궁내막 두께에 따라 estradiol valerate를 4~8 mg 투여하며, 미성숙 난자가 성숙되어 fertilization을 유도한 날부터는 progesterone을 같이 투여한다. 임신이 되면 임신 10~12주 정도까지 계속 투약한다.

7. IVM-IVF로 출생한 아기의 산과적 특성

미성숙 난자를 이용한 체외수정 프로그램에서는 난자가 체외에서 장시간 노출되므로 태어난 아기의 건강에 대한 우려가 제기되고 있다. 현재 전 세계적으로 300여명의 아기가 미성숙 난자의 IVM-IVF로 태어난 것으로 보고되어 있다. 그 중 Mikkelsen 등 (2005)은 47명의 아기 중 1예에서 cleft palate, 또 다른 1예에서 20번 염색체에서 부계로부터 유전된, 임상적으로 문제를 초래하지 않는 small pericentric inversion을 보고하였다. 또한 Cha 등 (2005)은 임신한 41예 중 follow up이 가능했던 38예를 분석한 결과 유산율은 36.8%였고, 23예에서 건강한 아기를 분만하였다. 유산된 경우 1건에서 omphalocele을 보였고, 다른 1건에서 fetal hydrops를 나타냈으며, 분만된 아기 중 한 아기에서 cleft palate를 나타내었으나 stimulated cycle에서 IVF-ICSI 기술을 한 경우와 별 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 태어난 아기의 출생 시 체중이나, 제태기간 등도 일반적인 IVF-ET 결과와 유사함을 확인할 수 있었다.

8. IVM-IVF, ET program에 영향을 미치는 요소들

2001년 Child 등은 회수된 미성숙 난자의 수가 IVM-IVF 후 임신율을 결정하는 중요 인자라고 하였고 Tan 등 (2002)은 초기 난포기에 초음파로 측정된 antral follicle의 수가 IVM-IVF의 성공을 예측할 수 있는 인자라고 하였다.

또한 여성의 나이와 basal FSH 치는 고식적 체외수정에서와 같이 미성숙 난자의 IVM-IVF 프로그램에 영향을 미치는 예후 인자로 작용한다.

1996년 Barnes 등은 정상 배란 주기를 갖는 환자에서 회수된 미성숙 난자의 성숙율, 수정율, 난할율이 무배란성 환자에 비해 모두 높았다고 하였다.

9. 미성숙 난자 프로그램의 연구 방향

과배란 유도 없는 natural 주기의 미성숙 난자의 IVM-IVF의 경우, 배아의 이식 시기가 일반적인 시험관 아기 시술보다 빨라지게 되어 자궁내막이 배아의 착상에 적당하게 준비되지 않아 임신율이 감소하는 문제가 있어, 많은 보고들에서는 E₂나 hCG 등을 사용하여 자궁내막의 상태를 조절하여 자궁내막의 조건을 착상에 적절하게 준비시키는 시도를 하고 있다.

또 다른 시도로는 IVM 배양을 두 단계로 시행하는 것이다. 즉 본 성숙 (maturation) 시기 이전에

meiotic arrest를 유지하는 물질들을 사용하여, 난자의 성숙을 일시적으로 중지하였다가 다시 재개 시키는 전성숙 (prematuration)이 시도되고 있다. 이러한 방법의 이론적 장점은 성숙의 시기도 조절할 수 있지만 좀 더 충분한 세포질 성숙이 가능하게 된다는 것이다.

10. 결 론

배란유도제를 사용하지 않고 회수한 미성숙 난자의 IVM-IVF는 경제적이며, monitoring 과정이 간단하여 초음파 및 혈청 호르몬 검사에 따른 노력과 시간이 절약되고 과배란 유도 부작용으로부터 환자를 보호할 수 있으므로, 고식적 IVF-ET의 좋은 대안으로 생각된다. 특히 다낭성 난포증후군 (PCOS) 환자는 좋은 치료의 대상이 된다. 하지만 모든 불임환자에게 보편적으로 사용할 수 있는 새로운 보조 생식술로 정립되기 위해서는 난자 채취 방법의 개선으로 좀더 많은 미성숙 난자의 채취가 가능해야 하며, IVM을 위한 배양체계 확립, 임신율 향상을 위한 자궁내막의 준비 등에 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

한편 최근 보고에 의하면, IVM시 핵 성숙은 성공적으로 이루어지나 IVM으로 성숙된 난자에서 세포질 성숙의 문제로 인한 cytoplasmic reprogramming 이상으로 초기 배 발달과 착상 전후에 영향을 줄 가능성에 대한 염려가 제기되고 있어, in vivo maturation을 조절하는 과정을 유전자나 단백질 분석의 차원에서 좀더 깊게 연구해 봐야 할 것으로 사료되며, 임상 전체에 좀더 광범위하게 이러한 미성숙 난자 프로그램이 정착되기 위해서는 in vitro maturation들에 영향을 주는 다양한 조건 특히 epigenetic factor들에 대한 연구가 반드시 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Anderiesz C, Ferraretti AP, Magli C, et al. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. *Human Reprod* 2000; 15: 1140-8.
2. Barnes FL, Kausche A, Tiglias J, et al. Production of embryos from in vitro matured primary human oocytes. *Fertil Steril* 1996; 65: 1151-6.
3. Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, et al. Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000; 73: 978-83.
4. Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular human oocytes collected from non stimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991; 55: 109-13.
5. Cha KY, Chung HM, Lee DR, Kwon H, Chung MK, Park LS, Choi DH, Yoon TK. Obstetric outcome of patients with polycystic ovary syndrome treated by in vitro maturation and in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2005; 83: 1461-5.
6. Chian RC, Buckett WM, Tan SL. In vitro maturation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2004; 8:

148-66.

7. Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2001; 76: 936-42.
8. Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature* 1969; 221: 632-5.
9. Lin YH, Hwang JL, Huang LW, Mu SC, Seow KM, Chung J, Hsieh BC, Huang SC, Chen CY, Chen PH. Combination of FSH priming and CG priming for in-vitro maturation of human oocytes. *Human Reprod* 2003; 18: 1632-6.
10. Liu J, Lu G, Qian Y, Mao Y, Ding W. Pregnancies and births achieved from in vitro matured oocytes retrieved from poor responders undergoing stimulation in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2003; 80: 447-9.
11. Mikkelsen AL, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome. A randomized prospective study. *Reproduction* 2001; 122: 587-92.
12. Mikkelsen AL. Strategies in human in-vitro maturation and their clinical outcome. *Reproductive Bio Medicine Online* 2005; 10: 593-9.
13. Russell JB, Knezevich KM, Fabian KF, Dickson JA. Unstimulated immature oocyte retrieval: early versus midfollicular endometrial priming. *Fertil Steril* 1997; 67: 616-20.
14. Trounson A, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994; 62: 353-62.