

인간난자의 체외수정 및 배아의 자궁내 이식

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

장 윤 석

서 론

체외수정(in vitro fertilization; IVF) 및 배아의 자궁내이식(embryo transfer; ET)은 오래전부터 생리학자들의 관심의 대상이었으며, 인간에서는 1965년에 Edwards에 의해 최초로 체외수정이 시도되었다. 그후 Steptoe와 Edwards가 1976년에 체외수정된 배아를 자궁내 이식하여 자궁외임신이 성립되었다고 보고하였으며, 1978년에 자연배란 주기에서 용인된 난자를 체외수정 및 배아의 자궁내이식에 의하여 Louise Joy Brown양이 탄생되었다고 보고하였다(Edwards 등, 1980).

1980년에는 Lopata 등이 clomiphene citrate를 사용하여 과배란을 유도하여 체외수정에 의한 임신에 성공하였다고 보고하였다.

그후 체외수정 및 배아의 자궁내이식술은 불임증 치료의 한 방법으로 인정되어 전세계적으로 시술되어 있으며, 이때 이 방법에 의해 약 2,000명의 아기가 탄생된 것으로 추산된다. 지난 몇년동안 이 분야에서 획기적인 진보와 발전이 이루어졌으며, 국내에서도 1985년 체외수정에 의한 쌍태아가 탄생된 이래(장등, 1986) 여러 center에서 이에 관한 광범위한 연구 및 시술이 시행되고 있다.

저자는 체외수정 및 배아의 자궁내이식 시술의 대상환자, 과배란유도 및 모니터, 난자의 채취, 체외수정, 배아의 이식 등에 관하여 저자의 경험 및 다른 연구보고 등을 종합하여 요약하고자 한다.

대상환자

불임증의 치료는 불임의 원인에 대한 검사를 상세히 시행한 후에 그 원인에 따라 치료방법을 결정하여야 한다. 체외수정시술은 본 시술이외에도 불임증을 치료할 수 있는 다른 방법이 없다고 여겨지는 환자가 대상이 된다. 주요 적응증은 ① 양쪽 난관이 모두 없거나, 복원이 불가능하다고 판단된 경우, ② 남편이 뱀정자증이 있는 환자로 활동성이

있는 정자가 어느 정도 있는 경우, ③ 자궁경관의 점액상태가 불량한 경우(hostile cervical mucus), ④ 불임의 원인이 밝혀지지 않는 경우(unexplained infertility), ⑤ 자궁내막증 치료후에도 불임의 상태가 계속되는 경우 등이다.

초기에는 대상환자의 연령을 35세 이하인 경우로 제한하였으나, 최근에는 배란유도제의 사용으로 35세 이상의 부인에게도 본 시술이 고려되어 지나 연령이 많은 경우에는 선천성기형 및 자연유산의 빈도가 증가한다.

불임검사가 끝난 후, 환자의 선정이 완료되면 환자의 대기조를 편성하고, 이들 환자와 계속적인 면담을 하여 체외수정 및 배아의 자궁내이식의 전과정을 설명하고, 여기에 부수되는 위험 및 합병증의 가능성을 부부에게 상세히 알려주어야 한다.

특히 정신적인 스트레스, 복강경시술의 위험도, 배아의 자궁내이식후의 실패율등을 꼭 설명하여야 한다. 그밖에 체외수정 이외의 다른 방법, 즉 난관성형술을 재시도하거나, 양자를 택하던가 불임을 부부가 인정하고 부부생활을 영위하는 방법등의 카운슬링은 꼭 필요하다.

대상환자는 체외수정의 프로그램 시술전에 다음과 같은 검사등을 시행받아야 한다. 첫째, 만삭임신 상태에 이르기 위해서는 자궁내강의 상태가 정상인 것이 바람직하므로 자궁조영술에 의하여 자궁내강의 상태를 확인하고 자궁내강의 소식자법(uterine sounding)을 미리 시행하여 그 결과를 기록하여 배아의 이식시술시에 참조하도록 한다. 둘째, 일상적인 수술 전 검사를 하여 전신상태를 파악한다. 셋째, 진단복강경검사를 시행하여 난소의 접근 가능성과 난소의 상태, 유착, 자궁내막증 또는 다른 질환의 유무를 파악하고 난소의 이용정도(availability)를 백분율로 기록하여 둔다. 유착이 심하여 난소가 이용되기 어려운 상태이면 복강내 시술이외의 다른 방법에 의하여 난자의 채취를 시도한다. 넷째, 남편의 정액검사 및 정액의 세균배양 검사를 시행한다.

배란의 조절 및 모니터

체의수정 시술에 있어서 배란되기 직전의 충분히 성숙된 난자를 획득하는 것이 중요하다. 그 방법은 크게 두가지로 나눌 수 있는데, 첫째는 정상적인 월경주기에서, 둘째는 과배란을 유도하여 배란직전의 시기에 난자를 채취하는 방법이다.

1. 정상적인 월경주기

Edwards와 Steptoe 등도 초기에는 human menopausal gonadotropin(이하 hMG로 약함)을 이용하여 과배란 유도를 시행하여 체외수정을 시도하였으나 성공하지 못하였고, 정상월경주기에서 시술하여 임신에 성공하였는데 소변에서 LH(luteinizing hormone) surge를 측정하여 배란시기를 예측하였다(Edwards 등, 1980).

그러나 이 방법은 아래와 같은 이유로 현재는 거의 사용되어 지지않고 있는 상태이다. 첫째, 월경주기가 규칙적이었던 환자들이 스트레스로 인하여 종종 배란이 지연되거나 배란이 되지 않았다. 둘째, 난자채취시에 난포의 과립막세포(granulosa cell)가 많이 흡입된 경우에는 황체에 progesterone의 분비가 감소할 수 있다(Garcia 등, 1981). 셋째, 정상월경주기에는 채취가 가능한 난포가 1개이므로 성숙된 난자를 얻을 기회가 감소한다. 넷째, 환자의 월경주기에 대한 기본적인 정보를 얻기 위하여 시술을 하기전에 두번 이상의 월경주기를 모니터해 볼 필요가 있다. 다섯째, LH surge가 시작되고 28시간 후에 난자의 채취를 해야하므로 낮과 밤, 요일에 관계없이 언제든지 시술을 할 준비가 되어 있어야 한다.

2. 과배란유도(ovarian hyperstimulation)

최근의 체외수정 시술에 의한 임신들의 증가에

는 과배란유도 방법의 향상이 기여하는 바가 크다. 정상월경주기에 clomiphene citrate, hMG, follicle stimulating hormone(이하 FSH로 약함), human chorionic gonadotropin(이하 hCG로 약함)등을 사용한 여러 종류의 과배란유도법이 체외수정의 시술에 사용되어지고 있다.

(1) Clomiphene citrate

Clomiphene citrate를 사용한 과배란유도는 1978년 Lopata 등에 의해 처음으로 시작되었으며, 1981년 Trounson 등이 이 방법에 의하여 임신에 성공하였다고 보고한 이래 여러 center에서 사용되어 왔다. 가장 흔히 사용된 방법은 월경주기 제5일부터 제9일까지 매일 clomiphene citrate 50~150mg씩을 경구투여 하는 방법이다. 난포의 성장은 난소난포의 초음파단층촬영에 의하여 측정되어진다.

hCG를 추가로 사용하지 않는 경우에는 혈청이나 소변에서 LH(Hi-Gonavis test)치를 4시간 간격으로 측정하여 자연적인 LH surge가 일어나기 시작하고 24~26시간 후에 난자의 흡인을 시행한다.

hCG를 투여하는 경우에는 초음파단층촬영에 의하여 가장 큰 난소난포의 직경이 18~20mm에 이르거나, 매일 측정할 혈청 estradiol(이하 E₂로 약함)치의 양상이 plateau를 형성하는 경우에 hCG를 투여하고 34~38시간후에 난자의 흡인을 시행한다.

그러나 clomiphene citrate만을 사용하는 경우에는 ① 채취되는 난자의 숫자가 다른 과배란유도제를 사용한 경우에 비해 현저히 적으며, ② 자연적인 LH surge가 예상치 않게 일어나는 일이 흔하며, ③ clomiphene citrate의 anti-estrogenic 특성에 의하여 자궁내막의 cytosol estrogen 수용기(receptor)의 농도를 감소시킴이 밝혀져(Kokko 등, 1981)배아의 자궁내 이식후 착상이 잘 되지 않는 한 원인으로 여겨지며, ④ clomiphene citrate가 쥐의 난자와 배아의 성숙 및 발육을 억제하는 것으로 밝혀져(Laufer 등, 1983) 현재 clomiphene citrate만

Table 1. hMG and/or FSH protocols

Protocol	Cycle Day						
	3	4	5	6	7	8	
2HMG	AM						
	PM	2hMG	2hMG	2hMG	2hMG	2hMG	2hMG, etc.
Combination FSH/hMG	AM	2FSH	2FSH				
	PM	2hMG	2hMG	2hMG	2hMG	2hMG	2hMG, etc.
Pure FSH	AM	2FSH	2FSH				
	PM	2FSH	2FSH	2FSH	2FSH	2FSH	2FSH, etc.

hHG, 75 IU LH, 75 IU FSH/ampule, Pergonal(Serono Laboratories, Inc., Randolph, Mass.) Pure FSH, 75 IU FSH/ampule, Metrodin(Serono Laboratories, Inc., Randolph, Mass.)

을 사용하여 과배란유도를 시행하는 체외수정 center는 거의없다.

(2) Clomiphene citrate 와 hMG 의 병용

1976년 Kistner가 clomiphene citrate와 hMG를 병용하여 배란유도에 성공한 이래 이와 유사한 여러 종류의 regimen들이 많은 체외수정 프로그램에서 사용되어 지고 있다. 보고자에 따라 차이는 있으나 흡인되는 난자의 숫자, 난자의 성숙도, 이식되어지는 배아의 숫자, 임신률등에 있어서 전체적으로 좋은 성적을 보이는 것으로 보고되고 있다 (Lopata, 1983; Quigley 등, 1985; Vargyas 등, 1984, 1985).

저자들의 체외수정 프로그램에서는 clomiphene citrate를 사용하여 과배란유도를 시행하는 경우에는 월경주기 제5일부터 제9일까지 매일 clomiphene citrate 100mg씩을 투여하고 월경주기 제9일에 측정된 혈청 E₂치가 100pg/ml이하이거나, 난소난포의 초음파단층촬영상 가장 큰 난포의 직경이 14mm 이하인 경우에 당일 오후부터 매일 hMG를 투여한다. 매일 측정된 혈청 E₂치의 양상이 plateau를 이루거나, 가장 큰 난소난포의 직경이 18mm에 도달한 경우에 hCG를 투여하고 34~38시간후에 난자의 흡인을 시행한다.

(3) hMG 및 FSH 의 사용

1981년 Norfolk의 체외수정 프로그램에서 과배란유도를 위하여 hMG/hCG가 사용되어졌다 (Garcia 등, 1981). 저온 hMG를 사용한 후 3가지의 혈청 E₂의 양상이 인공적으로 밝혀졌으며 (Ferraretto 등, 1983), E₂의 반응이 좋은 환자인수록 임신률이 높음이 확인되어 월경주기 제3일과 제4일에 순수한 FSH를 추가로 투여하는 과배란유도법을 고안하였으며, 이 방법들에도 반응이 좋지 않은 경우에는 FSH만을 사용하여 과배란 유도를 시행하였다 (Table 1 참조).

HMG/hCG 방법은 hMG 2앰플을 월경주기 제3일 또는 제5일부터 근주하기 시작하여 월경주기 제6일부터 estrogen의 반응을 매일 임상적으로 모니터링하여 질벽의 성숙수 (maturation index, MI) 검사상 핵농축세포 (pyknotic cell)가 30% 이상이고 다음 중에서 4개 이상의 변화가 일어난 경우를 임상적인 이동 (clinical shift)이 일어난 것으로 판단한다. 첫째, 자궁경관의 점액의 양이 0.2mm 이상, 둘째, spinbarkeit가 10cm 이상, 셋째, ferning이 4+, 넷째, 자궁경관점액의 모양이 clear, 다섯째, 자궁경관이 개대된 경우 등이다.

매일 혈청 E₂ 농도를 측정하며, 초음파단층촬영에 의한 난소난포의 직경등을 측정하여 상기의 검

사결과등을 종합하여 hMG의 투여를 중지할 시기를 결정한다 (Table 2 참조).

즉 hMG의 투여를 중지하는 시기는 첫째로 혈청 E₂치가 300pg/ml 이상이면서 clinical shift가 일어났거나, 둘째로 clinical shift가 일어나지 않았어도 혈청 E₂치가 600pg/ml 이상인 경우, 셋째로 혈청 E₂치에 관계없이 clinical shift가 3일 이상 지속되거나, 넷째로 난소난포의 초음파단층촬영검사상 가장 큰 난소난포의 성장이 steady하고 그 직경이 14mm에 도달한 경우 등이다. 단 혈청 E₂치가 300pg/ml에 도달하였으나 clinical shift가 일어나지 않은 경우는 혈청 E₂치가 600pg/ml 이상이거나 clinical shift가 일어날 때까지 hMG를 투여용량을 하루 2앰플에서 1앰플로 감량하여 투여한다.

마지막 hMG를 투여하고 50시간 후에 hCG 10,000u를 근주하고 34~36시간 후에 난자채취를 시행한다. 단 다음과 같은 경우에는 마지막 hMG를 투여하고 28~36시간후에 hCG 10,000u를 근주한다. 첫째, 이전의 과배란유도시에 hCG를 투여하기 전에 endogenous LH surge가 있었던 경우. 둘째, 가장 큰 난소난포의 직경이 16mm에 도달한 경우. 셋째, 전날의 혈청 E₂치부터 E₂치의 양상이 plateau를 형성한 경우. 넷째, 혈청 E₂치가 급격히 상승해서 전날의 E₂치의 거의 2배에 도달한 경우 등이다.

FSH/hMG/hCG 방법은 FSH 2앰플을 각각 월경주기 제3일과 제4일에 투여하고 hMG 투여는 hMG/hCG 과배란유도법과 같다 (Table 2 참조). HMG의 투여를 중단하는 시기는 hMG/hCG 방법에 비하여 혈청 E₂치의 기준이 300pg/ml 및 600pg/ml에서 400pg/ml 및 900pg/ml로 바뀐 것 이외에는 똑같으나 저자들의 경험으로는 한국여성에 있어서는 FSH에 대한 E₂의 반응이 매우 급격하여 가장 큰 난소난포의 직경이 10mm 이하인 경우에도 이미 혈청 E₂치가 900pg/ml 이상인 경우가 많아서 그런 경우에는 가장 큰 난소난포의 직경이 12mm에 도달할 때까지 hMG를 1앰플로 감량하여 투여하였다.

FSH/hCG 투여 방법은 Table 2와 같으며 FSH의 투여를 중지하는 기준은 FSH/hMG/hCG 방법과 동일하다.

상기한 과배란유도 방법을 제안한 Norfolk의 체외수정 프로그램의 성적은 Table 3과 같다.

난자의 채취

난자의 획득 방법은 첫째는 개복술을 시행하는 방법이며, 둘째는 복강경시술을, 셋째는 초음파를 이

Table 2. hMG-hCG protocol

General

1. The clinical parameters, blood for E₂, and other assays, and the ultrasound are performed at approximately 8:00 am.
2. All medications such as hMG should be given at about 4:00 pm so that advantage can be taken of the assays performed on the 8:00 am.
3. hCG should be given at 6:00 pm with a laparoscopy posted at 7:00 am, 37½hr later, so that by the time the egg is harvested it will be more or less 38hr.

Day 3 (day 5 if a long cycle)

- 8:00 am Clinical parameters, blood, and ultrasound.
- 4:00 pm Two ampules of hMG.

Day 4 and 5

- 8:00 am Clinical parameters and ultrasound may or may not be repeated, depending on the clinical situation, but no blood need be taken on these days.
- 4:00 pm Two ampules of hMG.

Days 6 and each day until hMG is discontinued

- 8:00 am Clinical parameters, blood and ultrasound.
- 4:00 pm Two ampules of hMG.

Indications for the discontinuation of hMG

hMG should be discontinued on the day when the E₂ in 300pg/ml or more and the clinical parameters have shifted for at least 1 day

or

E₂ reaches 600pg/ml without a shift in clinical parameters

or

the clinical parameters have shifted for 3 consecutive days regardless of the level of the E₂

or

by ultrasound study the enlargement of the largest follicle has been steady and has reached 14mm in diameter.

Indications for administration of hCG

The hCG will be given 50hr after the last hMG if the E₂ continues to be greater each day after the discontinuance of hMG

or

the largest follicle has steadily progressed and has reached 18mm in diameter.

General

Clinical parameters, the blood, and ultrasound all to be continued at 8:00 am daily through the day prior to laparoscopy, beginning with day 6. On the day of laparoscopy, blood will be drawn at the time of laparoscopy for such assays as seem appropriate.

Table 3. Preovulatory oocytes retrieved and transferred by method of stimulation

Stimulation	Series	No. of Laparoscopies	Preovulatory Eggs/Laparoscopy	% Preovulatory/Total Oocytes	Preovulatory Oocytes Transferred/Transfer	Pregnancy Rate/Transfer of Preovulatory Oocytes
hMG	2~16	453	1.6	41	1.4	24.3%
FSH/hMG/hCG	14~18	228	3.0	47	2.6	32.0%
FSH/hCG	14~18	55	2.7	51	2.4	25.0%

Table 4. Culture media

Ham's F-10(Gibco # 430-1200)	
Benzyl penicillin G(Sigma #PEN-NA)	0.075g
Streptomycin sulfate(Sigma #S-6501)	0.075g
Calcium lactate(Calbiochem/Behring # 4272)	0.2452g
Sodium bicarbonate(Sigma # S-8875)	2.10g
Insemination medium: Fetal cord serum	7.5%
Growth medium : Fetal cord serum	15%
* Osmolality 280mOsm/kg	
* pH 7.35~7.4	

Table 5. Aspiration solution

Dulbeccos phosphate buffered saline (Gibco #450-1300)	
Calcium chloride(Gibco # 450-1300)	0.1g
Benzyl penicillin G(Sigma #PEN-NA)	0.075g
Streptomycin sulfate(Sigma #S-6501)	0.075g
* Osmolality 280m Osm/kg	
* PH 7.35~7.4	

용하는 방법(ultrasound guided aspiration)등이 있다.

개복술에 의하여 난자의 흡인을 시행하는 방법은 현재 거의 사용되지 않고 있다.

1970년 Steptoe 와 Edwards에 의하여 복강경시술에 의한 난자의 흡인이 시도된 이후 대부분의 center에서 이 방법이 사용되어지고 있다. 몇 가지의 복강경에 의한 난자흡인 방법이 고안되었으나 저자들은 Jones 등(1982)의 방법을 사용한다. 즉 복강경시술시 두곳을 puncture 하여 한쪽은 Semm's 형태의 비외상성의 forcep을 사용하여 난소를 지지하고 다른 쪽의 천자부위로 흡입바늘(aspiration needle)을 넣어 난소난포를 천자하여 난자및 난포액을 흡인한다. 이 흡입바늘은 12gauge 이고(내경이 2.16 mm) 바늘끝이 45°의 각도로 되어 있으며 바늘끝에서 5mm 뒤에 작은 고리가 있다 바늘은 DeLee suction trap의 plastic tube에 연결되고 이 trap은 두 번째 plastic tube에 의해 60cc syringe에 연결되어 있다(Jones 등, 1984).

복강경시술시 전신마취를 시행한다(Evans, 1983).

Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS) 2cc 를 미리 흡입바늘을 통하여 trap에 흡입해 놓고 난자 흡입후에 다시 Dulbecco's 식염수 2cc로 흡입바늘을 관류(flush)한다.

복강경시술을 하지 않고 초음파에 의하여 난자를 흡인하는 방법은 1981년 Lenz 등에 의하여 시도되

었으며 흡인에 사용되어지는 바늘은 대개 내경이 1~1.6mm이다. 복부를 통하는 방법(transabdominal route)과 질벽을 통하는 방법(transvaginal route)이 사용되어지고 있다.

복부를 통하는 방법은 방광이 충만된 상태에서 국소마취를 시행하고 초음파로 보면서 방광을 통하여 흡입바늘을 삽입하여 난자의 흡인을 시행한다.

질벽을 통하는 방법은 가장 최근에 고안된 방법으로(Lauritsen, 1983), 초음파 transducer는 복부에 대고 국소마취하에서 질원개(vaginal fornix)를 통하여 더글라스와천자(culdocentesis)를 시행하여 난자흡인을 시행한다. 내경이 1.4mm인 가는 흡입바늘이 사용되고 이 방법에 의한 임신도 보고되어 있다(Dellenbach, 1984).

초음파를 이용한 난자의 채취는 낮은 난자의 획득성공률이 가장 큰 단점이나 최근 Lewin 등(1985)은 복강경에 의한 난자채취와 비슷한 75%의 난자 획득률 및 62%의 수정성공률을 보고하였다.

배양액의 준비 및 정도관리(Quality Control)

체외수정의 성공에 있어서는 임상적인 측면과 실험실적인 측면이 모두 중요하다. 체외수정의 성공 여부에 배양액의 상태가 미치는 비중은 매우 크므로 항상 배양액의 상태를 점검하기 위한 정도관리를 게을리하지 않아야 한다.

인간의 체외수정에 여러 종류의 배양액이 사용되었다. 저자들의 경우는 Jones 등(1982)의 방법과 동일하게 Ham's F-10 배양액을 사용하였으며 신생아 제대혈청을 준비하여 배양액에 첨가하였다. 저자들이 사용하는 배양액 및 aspiration 용액은 Table 4, Table 5와 같다.

배양액의 정도관리 검사가 매우 중요하며 여러 종류의 검사방법이 고안되었으나 저자들의 경우는 배양액을 준비할 때 마다 mouse를 이용하여 배양액의 정도(quality)를 검사한다. 즉 mouse를 체내에

Table 6. Criteria for classification of aspirated oocytes

Oocyte Classification	Granulosa	Cumulus	Corona	Oocyte
Preovulatory	Mature	Present (may be absent)	Expanded (may be absent)	Regular Light
Immature	Immature (may be mature)	Absent (may be present and dense)	Compact (may be absent or slightly expa fled)	Regular Light (may have germinal vesicle)
Atretic	Degenerate (may be mature)	Absent (may be present and degenerate)	Absent (may be a few cells present)	Irregular Dark
Postmature	Mature (may be dark)	Present (may be degenerate)	Present (irregular)	Irregular Dark Fractured zona pellucida

서 수정시켜서 2세포의 배아를 mouse의 난관에 서 추출하여 배양하여 60% 이상이 상실배(morula) 또는 포배(blastocyst)에 이른 경우에만 그 배양액을 일련의 체외수정에 사용하며, 매일 배양액의 pH 및 삼투압을 측정하며, water bath와 incubator의 온도를 정정하며 CO₂ tank의 reading 및 CO₂ 농도를 분석한다.

출인된 난포액과 난자의 특성

난자흡인 직후 해부현미경이나 역반사 현미경을 사용하여 난자를 확인하고 분류하여야 한다. 이때에는 가능하면 대기중에 노출되는 시간을 단축하기 위하여 최단시간내에 난자의 존재를 확인한 후 이미 완성된 수정배양액으로 옮겨야 한다.

성숙된 배란직전 난포액은 핑크색이고 pH는 7.2~7.4이다. 몇 가지의 난자의 분류방법이 고안되었으나(Sandow, 1983; Marrs 등, 1984), 저자들의 경우는 Sandow(1983)의 방법을 이용하여 배란직전의 난자(preovulatory oocyte), 미성숙난자(immature oocyte), 퇴화된 난자(atretic oocyte) 및 과성숙난자(post-mature oocyte)로 분류한다(Table 6 참조). 즉 과립세포의 특징이 난포의 성숙도와 잘 비례한다. 성숙된 과립세포는 크고 밀집하게 집합되어 있고 약간 팽창되어 있으며 보통세포들이 난포액내에 잘 흩어져 있다. 반대로 미성숙된 과립세포는 작고 밀집되어 있으며 세포질이 거의 없으며 작은 덩어리로 떨어져 있는 경향이 있다.

정자의 준비

여러 종류의 방법이 고안되었으나 가장 많이 쓰

여지는 방법은 정액을 회석하여 원심분리한 후에 운동성이 있는 정자를 선택하는 방법이다(Marrs 등, 1983). 저자들이 사용하는 방법은 다음과 같다. 남편은 3~5일간 금욕하고 수정(insemination) 시키기 2시간 전에 polypropylene 용기에 무균적으로 수음(masturbation)에 의하여 채취한다. 실온에서 액화(liquefaction)시킨 후에 정액검사를 시행하고 같은 양의 수정배양액으로 회석하여 4개의 tube에 나누어 427G로 10분간 원심분리한 후에 상층액은 버리고 다시 배양액을 섞은 후 잘 혼합하여 원심분리하고 상층액은 버린다. 각 tube에 0.5ml의 수정배양액을 섞어 잘 혼합한 후에 5% CO₂의 공기중에서 약 45~60분간 잠복(incubation)시킨 후에 상층액을 채취하여 정자의 농도와 운동성을 측정한다. 후에 운동성이 있는 정자가 5×10⁶~10⁶개/ml의 농도가 되도록 수정용기(insemination dish)에 수정시킨다. 뱀정자증이 있는 경우는 정액을 같은 용량의 수정배양액과 섞은 후에 10~20개의 미세원심분리 tube에 나누어 270G로 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 0.5~1ml의 수정배양액을 모든 미세원심분리 tube에 나누어 잘 섞어 37°C의 5% CO₂의 incubator에 1시간동안 잠복시킨후 상층액을 채취하여 정액의 농도와 운동성을 측정한다. 후에 운동성이 있는 정자가 약 5×10⁶~10⁶개/ml의 농도가 되도록 수정용기에 수정시킨다.

체외수정

초기에 Edwards와 Steptoe는 난자채취후 즉시 수정할 것을 권하였으나 그 후의 경험으로 시험관내에서 preincubation을 하면 수정이 잘 되는 것이 알려졌으며, preincubation을 얼마동안 할 것인가

는 난자의 성숙도에 의하여 결정이 된다(Trounson 1982; Testart 등, 1983). 미성숙 난자를 22~36시간 preincubation하여 성숙시킨 후 수정시켜 임신된 여가 Veek 등(1983)에 의하여 보고되었다.

배양접시 1개당 난자 1개와 3cc의 배양액을 사용하고 모든 잠복은 37°C의 5% CO₂의 공기중에서 한다. 수정시킨 난자는 정액에 12~18시간동안 노출시킨후 난자는 성장배양액으로 옮긴다. 수정의 상태는 두개의 전핵(pronucleus)의 존재와 제 2극체(polar body)의 추출로 확인된다(Veek, 1983).

수정후 빠르면 22시간 후에 2세포기의 수태아(conceptus)를 관찰할 수 있으나 보통 24시간 후에 분열이 일어나며, 36~48시간후에 4~8세포기의 수태아가, 48~72시간후에 10~16세포기의 수태아가 관찰된다. 수태아의 부형상태가 변동하지 못하더라도 임신이 되었다는 보고가 있으므로 모든 수태아를 자궁내 이식한다.

배아의 자궁내이식

어떤 center에서는 수태아가 2-전핵 또는 1세포기에 이식을 시켜 임신이 되었다고 보고하나 Jones 등은 수정후 42~72시간 후에 이식한다(Jones, 1983; Jones 등, 1982).

저자들은 수정후 40~44시간후에 난합상태를 재확인하여 수정후 44~48시간 후에 Jones 등 (1983)의 방법을 사용하여 배아를 자궁내이식한다. 즉 좌자는 자궁의 굴절면에서 따라 슬로쉬(Knee-chest position) 또는 복외위(prone position)의 자세를 하여 자궁경관을 통하여 이식한다. 배아를 이식할때까지 항생제를 복용시켜 자궁경관의 점액상태를 좋게한다. 길이가 46cm, 직경이 1.2mm인 나일론 관을 사용하는데 관의 끝은 딱딱하고 둥글며 한쪽에 1.2mm의 notch가 있어 그곳을 통해서 수태아를 흡입한다. Tuberculin syringe를 이식관의 끝에 부착하고 이식관을 외경이 1.9mm인 철제의 배관속에 넣고 배관을 자궁결관의 2/3 정도에 넣고 이식관을 자궁내강에 집어넣어 이식관에 연결된 tuberculin syringe를 사용하여 배아를 이식시킨다.

배아이식후 최소한 4시간 정도 안정을 시키고 progesterone을 12.5mg씩 매일 근주한다. 황체기 제12일에 혈청β-hCG치를 측정하여 임신여부를 검사하고 임신이 확인되면 17-hydroxy progesterone caproate(dealutin) 250mg을 일주일에 한번씩 임신 18주까지 근주한다.

결 론

이상에서 살펴본 바와 같이 생체내에서 일어나는 자연적인 수정과정을 생체외에서 인위적으로 재현시키는 것이 체외수정이다. 그러므로 체외수정이 발전함에 따라 배아를 다른 여성의 자궁에 이식하는 등 여러 종류의 법적, 윤리적인 문제가 발생한다. 국내에서도 최근 다음과 같은 윤리요강이 제창된 바 있다. 즉 체외수정기술은 ① 시험관외에 프로그램이외의 방법으로는 임신이 불가능한 경우에만 시행한다. ② 법률적 부부사이에만 시행한다. ③ 유전자조작을 시행하지 않는다. ④ 최고의 시술및 기술로 배아를 신중히 취급한다. ⑤ 환자 개인의 비밀을 보장한다.

인간의 생식력은 불충분하다고 여겨진다. 즉 보통 여성이 한번의 월경주기에 약 25%만이 임신이 되어 만삭에 이른다(Oxel, 1980). 체외수정기술은 흡인된 난자의 수와 질, 수정되어 적절히 분열된 난자의 수, 이식된 수태아의 수등에 의하여 그 효율이 측정되어질 수 있는데 현재 임신성공률은 25~30%를 넘지 못하고 있으며 여러 개의 배아를 이식한 결과로 다태임신의 빈도가 높다.

REFERENCES

장운석·이진용·문신용·김정구: 인간난자의 체외 수정및 배아의 자궁내이식에 의한 임신 및 분만 -한국최초 시험관외기 분만 1례- 대한산부회지, 29: 354, 1984.

Dellenbach, P., Nisand, I. and Moreau L. et al. Transvaginal, sonographically controlled ovarian follicle puncture for egg retrieval (Corres) Lancet 1984; 1: 1467.

Edwards, R.G.: Maturation in vitro of human ovarian oocytes. Lancet 2: 926, 1965.

Edwards, R.G., Steptoe, P.C. and Purdy, J.M., Establishing full term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. Br. J. Obstet. Gynecol. 87: 737, 1980.

Evans, J.M.: Anesthesia for In Vitro Fertilization Oocyte Retrieval. Infertility, 6: 97, 1983.

Ferraretti, A.P., Garcia, J.E., Acosta, A.A. and Jones, G.S.: Serum luteinizing hormone during orulation induction with human menopausal gonadotropin for in vitro fertilization in normally menstruating women. Fertil Steril 40: 742, 1983.

Garcia, J.E., Jones, G.S., Acosta, A.A. and Wright, G.Jr.: Human Menopause Gonadotropin/

- Human Chorionic Follicular Maturation for Oocyte Aspiration; Phase I, 1981. Fertil. Steril.*, 39:167, 1983.
- Jones, H.W. Jr.: *Transfer. Infertility*, 6:183, 1983.
- Jones, H.W. Jr, Jones, G.S. and Andrews, M.C., et al: *The Program for In Vitro Fertilization at Norfolk. Fertil. Steril.*, 38:14, 1982.
- Jones, H.W., Jr., Acosta, A.A. and Garcia, J.E., et al: *On the Transfer of Conception from Oocytes Fertilized In Vitro. Fertil. Steril.*, 39:241, 1983.
- Jones, H.W., Jr., Acosta, A.A. and Garcia, J.: *A technique for the aspiration of oocytes from human ovarian follicles. Fertil. Steril.* 37:26, 1982.
- Jones, H.W. Jr., Acosta, A.A. and Garcia, J.: *A Technique for the Aspiration of Oocytes from Human Ovarian Follicles. Fertil. Steril.*, 37:1090, 1984.
- Jones, H.W., Jr., Jones, G.S., Andrews, M. C., Acosta, A., Bundren, C., Garcia, J., Sandow, B., Veeck, L., Wilkes, C., Witmyer, J., Wortham, J.E. and Wright, G.L.: *The program for in vitro fertilization at Norfolk. Fertil. steril.* 38:14, 1982.
- Kistner, R.W.: *Sequential use of clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin in ovulation induction. Fertil. Steril.* 26:72, 1976.
- Kokko, E., Janne, O., Kaupila, A. and Vihko, L.: *Cyclic clomiphene citrate treatment lowers cytosol estrogen and progesterin receptor concentration in the endometrium of postmenopausal women on estrogen replacement therapy. J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52:345, 1981.
- Laufer, N., Pratt, B.M., De Cherney, A.H., Nafotolin, F., Merino, M. and Markert, C.L.: *The in vivo and in vitro effects of clomiphene citrate in ovulation, fertilization and development of cultured mouse embryos. Am. J. Obstet. Gynecol.* 147:633, 1983.
- Lauritsen, J.G.: *Collection of human oocytes for in-vitro fertilization. Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 62(4):333, 1983.
- Lenz, S., Lauritsen, J.G. and Kjellow, M.: *Collection of human oocytes for in vitro fertilization by ultrasonically guided follicular puncture. Lancet.* 1:1163, 1981.
- Lewin, A., Margalioth, E.J., Rabinowitz, R. and Shenker, J.G.: *Comparative study between ultrasonically guided percutaneous aspiration with local anesthesia and laparoscopic aspiration of follicles in an in-vitro fertilization program. Am. J. Obstet. Gynecol.* 151(5):621, 1985.
- Lopata, A.: *Concepts in human in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil. Steril.* 40:289, 1983.
- Lopata, A., Brown, J.B., Leeton, J.F., McTalbot, J. and Wood, C.: *In vitro fertilization of preovulatory oocytes and embryo transfer in infertile patients treated with clomiphene and human chorionic gonadotropin. Fertil. Steril.* 30:27, 1978.
- Lopata, A., Johnston, IWH, Haut, J.J. and Speirs, A.I.: *Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by in vitro fertilization of a preovulatory egg. Fertil. Steril.* 33:117, 1980.
- Marrs, R.P., Saito, H., Yee, B., Sato, F. and Brown, J.: *Effect of variation of in vitro culture techniques upon oocyte fertilization and embryo development in human in vitro fertilization procedures. Fertil. Steril.* 41:519, 1984.
- Marrs, R.P., Vargyas, J.M., Gibbons, W.E. Saito, H. and Mishell, D.R., Jr.: *A modified technique of human in vitro fertilization and embryo transfer. Am. J. Obstet. Gynecol.* 147:318, 1983.
- Marrs, R.P., Vargyas, J.M., H., Gibbons, W.E., Breger, L. and Mishell, D.R., Jr.: *Chinical applications of techniques used in human in vitro fertilization research. Am. J. Obstet. Gynecol.* 146:477, 1983.
- Obel, E.B.: *Long-Term Sequelae following Legally Induced Abortion. Dan. Med. Bull.*, 27:61, 1980.
- Quigley, M.M., Schmidt, C.L., Beauchamp, P.J., Maklad, N.F., Berkowitz, A.S. and Wolf, D. P.: *Preliminary experience with a combination of clomiphene and variable dosages of menopausal gonadotropins for enhanced follicular recruitment. J. In Vitro. Fertil. Embryo. Transfer.* 2:11, 1985
- Sandow, B.A.: *Characteristics of Human Oocytes Aspirated for In Vitro Fertilization. Infertility*, 6:143, 1983.

- Stephoe, P.C. and Edwards, R.G.: *Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming the ovaries with gonadotrophins. Lancet. 1: 683, 1970.*
- Stephoe, P.C. and Edwards, R.G.: *Reimplantation of a human with subsequent tubal pregnancy. Lancet 1: 880, 1976.*
- Testart, J., Frydman, E. and DeMouzon, J., et al.: *A Study of Factors Affecting the Success of Human Human Fertilization In Vitro. I. Influence of Ovarian Stimulation upon the Number and Conditions of Oocytes Collected. Biology of Reproduction. 28: 45, 1983.*
- Trounson, A.D., Mohr, L.H., Wood, C. and Leeton, J.F. *Effect of Delayed Insemination on In Vitro Fertilization and transfer of Human Embryos. J. Reprod. Fertil., 64: 85, 1982.*
- Vargyas, J.M. Marrs, R.P., Hoffman, D. and Yee, B.: *Use of various ovarian stimulation methods to improve oocyte and embryo production for human in vitro fertilization: in vitro fertilization and embryo transfer. Ann. N. Y. Acad. Sci. 442: 112, 1985.*
- Vargyas, J. M., Morente, C., Shangold, G. and Marrs R.P.: *The effect of different methods of ovarian stimulation for human in vitro fertilization and embryo replacement. Fertil. Steril. 42: 1, 1984.*
- Veeck, L.: *Fertilization and Development. Infertility, 6: 155, 1983.*
- Veeck, L., Wortham, J. W.E. and Witmyer, J., et al.: *Maturation and Fertilization of Morphologically Immature Human Oocytes in a Program of In Vitro Fertilization. Fertil. Steril., 39: 594, 1983.*