

시험관아기 시술시 미세조작에 의한 임신율의 증진에 관한 연구

차병원 여성의학연구소

노환철 · 김은경 · 구정진 · 고정재 · 윤태기 · 차광열

Improvement of Pregnancy Rate by Micromanipulation in Human in Vitro Fertilization-Embryo Transfer Program

Hwan Cheol Rho, Eun Kyung Kim, Jung Jin Koo, Jung Jae Ko,
Tae Ki Yoon and Kwang Yul Cha

*Department of Obstetrics and Gynecology, Infertility Medical Center of
Cha Women's Hospital, Seoul, Korea*

= Abstract =

This study was carried out to improve pregnancy rate in IVF-ET program through Assisted Hatching (AH) by the use of micromanipulation technique.

Among 72 IVF patient, randomized 29 IVF patients were performed for AH by Partial Zona Dissection(PZD). Two to eight cell embryos were micromanipulated just before uterine transfer. The results were as follows:

1. The implantation rates of embryos between PZD group and control group were 10.0%, 4.9%, respectively.
2. The clinical pregnancy rates of both groups were 34.5%, 20.9%, respectively.
3. Among 131 PZD embryos, only 2 embryos were damaged mechanically.

Although there were no statistical difference in the rates of implantation and pregnancy between PZD group and control group due to small sample size, the PZD group had increasing trend in the rates of implantation and pregnancy.

In conclusion, it would be thought that PZD could be adequately used to improve implantation rate and pregnancy rate in IVF-ET program as an assisted technique if much more studies were done. Also the risks resulting from this study can be reduced because of technical stability, which showed the low rate of damaged embryos.

서 론

인간에 있어 남성불임에 의한 불임부부의 수정율을 증진시키기 위해 미세조작술이 사용된 이래(Cohen et al., 1988; Ng et al., 1988) 수정된 난자의 착상을 증가시키기 위한 보조적인 수단으로서 미세조작에 의한 수정란의 투명대

본 논문의 요지는 1991년 추계 불임학회에서 발표되었음.

를 절개하여 hatching을 도와줌으로서(assisted hatching) 임신율을 증가시키고자 제시된 방법이 보고 되었다(Cohen et al., 1990).

본 연구에서는 본원에 내원한 불임환자를 대상으로 수정란의 장기체의배양시 부적절한 배양조건, 또는 이로 비롯되는 투명대경화현상을 극복, IVF-ET의 착상을 및 임신율을 증진시키기 위해서 무작위로 환자를 선택하여 이식직전의 수정란을 assisted hatching방법중의 하나인 PZD방법을 이용 미세조작을 실시하여 PZD를

실시하지 않은 일반 IVF환자와 수정율, 착상율 그리고 임신율을 비교하여 보았다.

재료 및 방법

1. 연구대상

이 연구는 1991년 5월부터 1991년 8월사이 에 본원 여성의학연구소에서 불임치료를 받은 환자 들중 시험관아기시술을 실시한 환자 72명을 무작 위추출을 실시하였다. 이때 실험군은 29명이었고, 대조군은 43명이었다. 수정을 위해 사용된 남편 의 정자는 정상상태의 정자를 사용하였다.

난자를 채취하기 위한 과배란 유도방법으로서는 FSH+HMG, clomiphene citrate+HMG, GnRHa+HMG를 사용하였으며 hCG를 주사후 36시간후에 질식초음파(vaginal ultra-sonography)에 의해 난자채취를 시도하였다. 난자는 채취한 당일부터 assisted hatching을 실시하는 환자에게 면역억제를 위해 Methylprednisolone (Upjohn, 16mg/day)과 Doxycycline-hyclate (Pfizer, 200mg/day)를 4일간 투여하였다.

2. 수정란 준비

채취된 난자는 10% 신생아제대혈청(Fetal Cord Serum)이 첨가된 Ham's F-10(Gibco, USA) 배양액이 담긴 배양용 접시에 옮겨 수정시키기 전까지 5% CO₂배양기에서 4-8시간 배양을 시킨후 미리 준비된 정상적인 상태의 남편정자중 활동성이 있는 정자만을 골라 수정을 시킨후 12-16시간후 수정을 확인한 후 20% 신생아제대혈청이 첨가된 Ham's F-10배양액에서 24시간 추가배양을 실시하였다. 이식직전 2-8세포기 수정란을 미세조작 하였으며 미세조작후 수정란은 50% 신생아제대혈청이 첨가된 Ham's F-10에 옮긴후 Tom cat catheter(Sovereign, USA)를 이용 바로 자궁내에 이식을 하였다. 임신여부는 배아 이식후 12일째 혈중 β -hCG를 검사하여 측정하였다.

3. 미세조작술

1) 미세조작을 위한 배양액

수정이 된후 배발달이 일어난 2-8세포기 상태의 수정란을 미세조작을 하기 위하여 이식하기 직전에 20% 신생아제대혈청(FCS)이 첨가된 PBS(Phosphate Buffered Solution, Gibco) 배양액 50ul drop을 dish에 만든후 light paraffin oil(Sigma)으로 덮은 후 37°C, 5%CO₂ 배양

기에서 20시간정도 평형을 시킨 다음 미세조작술에 들어갔다.

2) 기구준비

부분적투명대절개술(PZD)을 위한 미세조작기(Leitz, Germany)는 도립현미경(Inverted microscope, Nikon, Japan)에 부착시켰다. 사용되는 미세관(microneedle, Leitz, Germany)은 vertical pipette puller(Kopf, USA)를 이용해서 뽑았다. 배양중인 2세포기에서 8세포기의 수정란은 전평형상태의 drop에 옮긴후 paraffin oil(Sigma)이 덮인 상태로 250배 현미경하에서 시행되었다.

3) 부분적 투명대 절개술(PZD, Partial Zona dissection)

수정란의 투명대를 incision needle을 이용하여 부분적으로 절개하는 방법(Cohen, 1989)으로 액상 paraffin oil(Sigma)이 덮인 상태의 배양액 drop에 수정란을 넣고 수정란에서 공간이 넓은 곳이 12시 방향에 오도록 Holding pipette으로 수정란을 9시 방향에 잡고 12시와 1시 사이에 미세관을 움직여 일부를 절개해준다. 이때 부분적 투명대절개술은 수정간 2-3개정도를 3-4분 이내에 실시했다(그림 1).

결 과

이 연구를 위해 난자채취를 시행한 총 주기는 미세조작을 실시한 29주기와 미세조작을 실시하지 않은 대조군 43주기로 총 72주기였다. 흡인된 주기당 평균 난자수는 실험군과 대조군에서 각각 10.1개와 9.0개였다. 흡인된 난자의 수정율은 실험군에서 293개중 225개가 수정되어 76.6%의 수정율을 보였다. 환자당 평균 수정란이식수는 실험군은 4.8개 대조군은 4.7개였다. 실험군에서 수정란 이식시 assisted hatching을 실시했을 때 상해를 입은 수정란은 131개중 2개로 1.5%였다(표 1).

이 연구에서 임신성공율을 살펴보면, 실험군에서 β -hCG에 양성을 보인 주기는 29주기중 11주기를(37.9%) 대조군은 43주기중 9주기(20.9%)를 보였고 임상적인 의미의 임신은 각각 34.5%(10/29), 20.9%(9/43)였다. 이식한 수정란당 착상율은 10.0%(14/140), 4.9%(10/201)였다. 이 연구에서 각 실험군의 예수가 적어 통계적인 유의성은 볼 수가 없었지만 임신율 및 착상율에서 증가하는 경향을 나타내고 있다(표 2).

Table 1. Comparison of Clinical Characteristics in PZD Group and Control Group

Treatment	No. of patients	Mean No. of oocytes collected/patient	Fertilization rate	Mean No. of transferred/patient	Damaged embryos (%)
Control group	43	9.0 ± 5.42	73.7	4.7 ± 4.7-0.91	-
PZD	29	10.1 ± 5.65	76.7	4.8 ± 0.95	2/131(1.5)

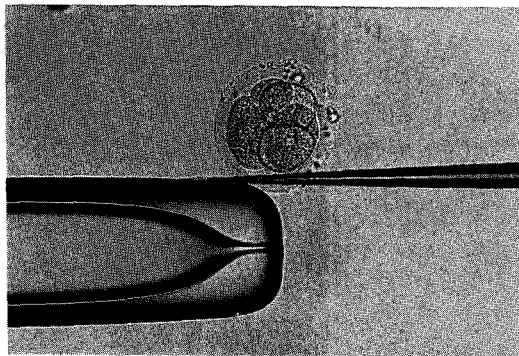
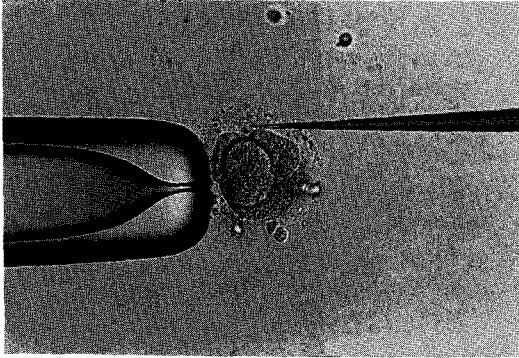


Fig. 1. Assisted Hatching using Partial Zona Dissection.

고 찰

처음으로 시험관아기가 탄생된 이래 생식보조기술의 많은 발전에도 불구하고 아직 시험관아기의 임신율은 만족할 만한 결과를 얻지 못하고 있는 실정이다. 이는 과배란 및 체외배양조건의 부적절함, endometrium receptivity (Glissant et al., 1985; Gone et al., 1989) 등 여러 가지 요인이 작용한다고 알려져 오고 있다.

최근 Cohen 등(1989)의 보고에 의하면 수정란을 체외에서 장시간 배양을 하면 체내에서의 투명대경화현상보다 훨씬 큰 경화현상을 보여, 결과적으로 착상전 투명대의 hatching이 잘 이루어 지지않아 착상에 실패하여 임신율이 떨어진다고 보고하였다.

Table 2. Clinical Results of Assisted Hatching in IVF-ET Program

Pregnancy	Embryo zona pellucida (%)	
	Intact	Incision
Positive beta-hCG	9/ 43(20.9)	11/ 29(37.9)
Clinical	9/ 43(20.9)	10/ 29(34.5)
Delivery	8/ 43(18.6)	8/ 29(27.6)
Implantation	10/203(4.9)	14/140(10.0)

발달단계중인 난자에 의해 합성되는(Bousquet et al., 1981) 투명대는 난자나 대부분 포유동물의 초기 수정란의 형태를 유지해주며(McLaren, 1972), 수정란을 안전하게 oviduct로 수송할 수 있다. 투명대의 구조를 살펴보면 3개의 주된 glycoprotein이 느슨하게 망상구조를 이루고 있으며(Greve and Wassarman, 1985), 수정이 된 이후에는 망상구조에 변화가 오는 경화현상이 일어나 hatching 직전까지 그 형태가 유지된다(DeFelice et al., 1982; Edwards et al., 1984; Wassarman, 1988). 배반포가 팽창이 되면 embryonic 혹은 uterine component (Yoshinaga, 1976)에 의한 투명대의 분해를 통해 hatching이 일어나게 되는데, hatching 전에 일어나야할 투명대의 thinning 현상 그리고 수정란과 자궁으로 부터 분리되는 lysin(Parr, 1973; Pinsker, 1974)이 투명대에 작용하지 못하게 되면 수정란은 hatching을 하지 못한 채 퇴행되고 만다. 이를 극복하기 위해서 수정란의 투명대를 인공적으로 얇게 만들어주거나, 절개해줌으로써 hatching을 증가시킬 수가 있었다.

Hatching을 돕기위한 최초의 시도가 1989년 Cohen에 의해 IVF program에 있어서 99명의 환자로부터 114개의 2세포기에서 8세포기 사이의 수정란에 미세조작을 실시하여 미세조작을 하지 않은 대조군 51명중 17명(34%) 보다 높은 40명중 24명(50%)으로 높은 임신율을 보였다. 또 Cohen의 다른 보고에서는 69명의 환자를 대상으로 assisted hatching을 실시하여

38명이 임신되어 55%의 임신율을 보였고, 역시 대조군은 68명중 29명으로 43%의 임신율을 보여 여기서도 assisted hatching을 실시한 실험군의 임신율이 높음을 알 수 있었다(in press 1991). 본 실험에서도 assisted hatching을 실시한 실험환자 29명중 10명(34.5%)이 임신을 해 미세조작을 실시하지 않은 대조군 43명중 9명(20.9%) 보다 높은 임신율을 보였고 착상율에서도 마찬가지로 assisted hatching군이 10.0%로 대조군 4.9%보다 좋은 결과를 보였다. 비록 sample 숫자가 적어 유의성은 없었지만 미세조작군이 임신율, 착상율에 있어서 나은 경향을 보임을 알 수 있었다.

본 연구에서는 미세조작된 수정란을 자궁내의 다른 외부물질 특히 macrophage, leucocyte 등 면역세포들로부터 수정란보호를 위해 Cohen (1990)의 면역억제 방법을 참고로 면역억제를 실시하였으며, Cohen의 결과에 의하면 면역억제를 실시한 PZD환자의 착상율이 실시하지 않은 환자군보다 4배이상 높음을 보고했다. 자궁내에서 수정란에 대한 면역억제기전은 exogenous corticosteroid를 장기간 투여할 경우 조직내에서 감소된 백혈구가 혈액내로 역설적으로 증가(Jandle, 1987)하여 자궁내에 있는 미세조작된 수정란을 보호할 수 있다고 한다.

많은 assisted hatching 방법중 수정란에 상해를 줄이는 방법으로서 PZD 방법이 많이 이용되고 있는데, 1989년 Cohen과 1992년 Vanderzwalmer의 연구에 의하면 PZD방법이 수정란에 최소의 상해를 입히는 방법이라고 보고하였다. 본 연구에서도 131개중 2개(1.5%)가 상해를 입어 결과적으로 PZD방법이 수정란에 상해를 거의 입히지 않음을 증명하였다. 한편 Malter(1989a)등이 지적한 PZD의 단점으로 너무 좁게 투명대를 절개할 경우 hatching시 투명대 사이에 trap 현상이 발생할 가능성이 있어 비정상적인 착상이 발생할 우려가 있다고 보고하였다.

본 연구 결과에 따라, PZD에 의한 수정란 미세조작방법이 IVF-ET program의 착상율 및 임신율에 있어서 좋은 결과를 보임을 알 수 있었고, 수정란에 대한 상해율이 낮은것으로 보이므로 이 방법을 좀더 보완하여 연구를 진행하면 ART program에 있어 좋은 보조적인 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

과배란 방법과 체외배양의 결과로 배아 착상에 문제를 극복하기 위하여 시험관아기기술시 착상율을 향상시키기 위하여 Assisted Hatching의 한 방법인 PZD를 시행하였다. 결과는 아래와 같다.

1. 임상적 임신율은 대조군과 실험군에 있어서 각각 20.9%, 34.5%로 나타났다.
2. 수정란당 착상율은 4.0%, 10.0%였다.
3. PZD를 시행한 군에서 수정란의 상해율은 1.5%로 나타났다.

실험예가 적어서 통계적 유의차는 없었지만 PZD에 의해 미세조작된 수정란 이식한 환자에서 임신율, 착상율이 증가된 경향을 보였고, 또 미세조작시 수정란의 손상이 거의 없어 앞으로 좀더 연구가 진행되면 ART program에 있어서 훌륭한 보조적인 수단으로서 사용될수 있으리라 사료된다.

인 용 문 헌

- Bousquet D, Leveille MC, Chapdelaine A, Bleau G: The culture origin of zona pellucida antigen in the human and hamster. *J Exp Zool* 1981, 215, 215-218.
- Cohen J, Kort H, Massey J, Elsner C, Mayer MP: Immunosuppression supports implantation of zona pellucida dissected human embryos. *Fertil Steril* 1990, Vol. 53, No. 4. pp 662-665
- Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z: Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* Vol. 7 No. 5 pp 685-691.
- Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP, Weimer K: Impairment of hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum Reprod* 1990a, 5, 7-13.
- Cohen J, Feldberg D: Effects of the size and number of zona pellucida openings on hatching and trophoblast outgrowing in the mouse embryo. *Mol Reprd Dev* 1991, In

- Press.
- Cohen J, Malter H, Fehilly C, Wright G, Elsner C, Kort H, Massey J: Implantation of embryos after partial opening of zona pellucida to facilitate sperm penetration. *Lancet* 1988, ii 162.
- Cohem J, Malter H: Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 1989, Vol 51, No. 1, 139-148.
- DeFelice M, Salusstri A, Siracusa G: 'Spontaneous' hardening of the zona pellucida of mouse oocyte during in vitro culture II. The effect of follicular fluid and glycosaminoglycans. *Gamete Res* 1982, 12, 227-235.
- Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Salter JM, Steptoe PC, Webster JM: Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1984, 1, 3-23.
- Glissant A, de Mouzon J, Frydman R: Ultrasound study of endometrium during in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 1985, 44, 786-790.
- Conen Y, Casper RF, Jacobson W, Blankier J: Endometrial thickness and growth during ovarian stimulation: a possible predictor of implantation in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1989, 52, 446-50.
- Gordon JW, Talansky BE: Assisted fertilization by zona drilling. A mouse model for correction of oligospermia. *J Exp Zool* 1986, 239, 347-354.
- Greve JM, Wassarman PM: Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J Mol Biol* 1985, 181, 253-264.
- Jandl JH: Chorionic lymphatic leukemia. In *Blood*, Edited by JH Jandl, Boston, Little Brown Co, 1987, p 769.
- Khalifa EAM, Tusker MJ, Hunt P: Cruciate thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse. *Hum Reprod* 1992, Vol. 7 No. 4, pp 532-536.
- Malter HE, Cohen J: Blastocyst formation and hatching in vitro following zona drilling of mouse and human embryos. *Gamete Research* 1989b, 24, 67-80.
- Malter HE, Cohen J: Partial zona dissection of the human oocyte: A nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 1989a, 51, 139-148.
- McLaren A: The fate of the zona pellucida in mice. *J Embryol Exp Morphol* 1972, 23, 1-19.
- Ng SC, Bongso A, Ratnam SS, Sathanathan H, Chang CLK, Wong PC, Hagglund L, Anandakumar C, Wong YC, Coh VHH: Pregnancy after transfer of multiple sperm under the zona. *Lancet* 1988, ii, 790.
- Parr EL: Shedding of the zona pellucida by guinea pig blastocysts: An ultrastructural study. *Biol Reprod* 1973, 8, 531-544.
- Pinsker MC, Sacco AG, Mints BC: Implantation associated proteinase in mouse uterine fluid. *Dev Biol* 1974, 38, 285-290.
- Vanderzwalmer P, Barlow P, Nijs M, Bertin G, Leroy F, Schoysman R: Usefulness of partial zona dissection of the zona pellucida in a human in vitro fertilization program. *Hum Reprod* 1992, Vol 7, No. 4, pp 537-544.
- Wassarman PM: Zonapellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* 1988, 57, 415-442.
- Yoshinaga K: Implantation of the ovum. *Harvard univ. press* 1976, pp 127-154.