

생쥐에서 과배란 유도시 인간융모 성선자극 호르몬 투여 방법이 체외수정 및 배자의 체외성장에 미치는 영향에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실

양승희 · 김향미 · 오승은 · 손영수 · 유한기 · 우복희

The Effect of the Timing and Dose of Human Chorionic Gonadotropin on Oocyte Recovery, in Vitro Fertilization, and Preimplantation Development in Superovulation of Mouse

S.H. Yang, M.D., H.M. Kim, H.D., S.H. Oh, M.S., Y.S. Son, M.D., H.K. Yoo, M.D.
and B.H. Woo, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ewha University Seoul, Korea

= Abstract =

This study was carried out to investigate the effect of the timing and dose of human chorionic gonadotropin(hCG) on oocyte recovery, in vitro fertilization, and preimplantation development in superovulation of mouse.

F1 hybrid(C57BL×CBA) mice were obtained and superovulation was induced in female mice by sequential intraperitoneal injection of PMSG and hCG.

In the first series of experiments, mice received 5 IU of PMSG given intraperitoneally, and 48 hours later were injected 1 IU, 5 IU, or 10 IU of hCG respectively. In the second series of experiments, mice received 5 IU of PMSG given intraperitoneally and were injected 5 IU of hCG 36, 48, or 60 hours later respectively.

1. When the mice received 5 IU of PMSG given intraperitoneally and 48 hours later were injected 1 IU, 5 IU, or 10 IU of hCG respectively, there were no differences in the total number of the oocytes obtained from the three experimental groups.

When the cultures were examined 48 hrs after the termination of insemination the proportion of unfragmented oocytes which had developed over two-cell stage was observed to be lowest in 10 IU hCG group.

When the cultures were examined 120 hour after termination of insemination the proportion of embryos which had developed to the blastocyst stage was observed to be significantly higher in 10 IU hCG group than 5 IU hCG group($p < 0.05$), but there was no difference between 10 IU hCG group and 1 IU hCG group.

2. When the mice received 5 IU of PMSG and were injected 5 IU of hCG 36, 48, or 60 hours later respectively, there were no differences in the total number of oocytes obtained from the three experimental groups.

When cultures were examined 48 hour after the termination of insemination the proportion of unfragmented oocytes which had developed over two-cell stage was observed to be significantly lower in 36 hour interval group than 48 hour interval and 60 hour interval group($p < 0.05$).

When the cultures were examined 120 hour after termination of insemination the propor-

tion of embryos which had developed to the blastocyst stage was found to be higher in 60 hour interval group than 36 interval or 48 hour interval group($P < 0.05$), and the proportion of hatching blastocyst was found to be higher in 60 hour interval group as well.

In this study, it was concluded that the administration of adequate dose of hCG, and long (60 hour) PMSG-hCG interval were necessary in superovulation of mice(C57BL×CBA) in order to get a large number of oocytes which had an early oocytes which had an early embryonic developmental capability when fertilized in vitro, and especially it had better have been avoided to administer a large dose of hCG.

서 론

난자의 체외수정 및 배아의 자궁내 이식(in vitro fertilization and embryo transfer, 이하 체외수정시술이라 약함)을 시술하는 경우 수정 가능한 성숙한 난자를 다수 얻기 위하여 과배란유도를 시행하게 된다.

과배란유도의 방법은 다양하지만 어떤 방법이나 공통적으로 마무리 과정은 인간용모 성선자극호르몬(human chorionic gonadotropin, 이하 hCG로 약함)의 투여로 최종 성숙을 유도하는 것이다.

체외수정시술에서 성패의 중요한 인자의 하나인 난자의 질과 체외수정된 배자의 생존력은 과배란유도 주기에서 hCG투여까지의 기간의 장단과 투여용량에 따라 많은 영향을 받고 있다. Jones(1984)는 체외수정시술을 위한 과배란유도에서 human menopausal gonadotropin(이하 hMG로 약함) 최종 투여 후 약 2일간의 "coasting period"를 둔 후에 hCG를 투여하여야 난자 세포질의 충분한 성숙을 이룰 수 있다고 하였으며, Hillier 등(1985)은 생쥐를 이용한 실험에서 pregnant mare's serum gonadotropin(이하 PMSG로 약함) 최종투여에서 hCG투여까지의 간격을 42시간에서 50시간으로 길게했을 때 체외수정율이 증가함을 보여주었다.

반대로 Laufer 등(1984)은 체외수정술을 위한 과배란유도시 hMC 최종투여 24시간 후에 hCG를 투여한 경우에서 48-72시간 후에 hCG를 투여한 경우에 비해 난자의 체외수정율이 유의하게 높았다고 보고하였다.

Abdalla 등(1987)은 체외수정시술 중 과배란유도 과정에서 환자들에게 2,000 IU, 5,000 IU 및 10,000 IU의 hCG를 투여하여 난자 흡입을 시행한 결과 2,000 IU의 hCG를 투여한 군에서 5,000 IU 및 10,000 IU hCG 투여군에

비해 유의하게 난자흡입율이 낮았다고 하였고, Baukloh 등(1982)은 생쥐(C57BL/6)를 이용하여 다양한 용량(3, 5, 10 IU)의 PMSG와 hCG로 과배란유도를 하여 난자의 채집한 결과 PMSG와 hCG의 용량이 증가할수록 난자의 수는 증가하지만 변형된 난자의 비율이 또한 유의하게 증가함을 보여 주었으며 과배란유도시 PMSG와 hCG의 용량은 최소 필요량으로 줄여야 한다고 하여 생쥐에서의 과배란유도에는 PMSG 5 IU, hCG 5 IU가 적절한 용량이라고 하였다. Zieck 등(1987)은 돼지(gilt)의 과배란유도 주기에서 500 IU, 1,000 IU 및 1,500 IU의 hCG를 각각 투여하여 세군 모두에서 estradiol의 분비가 hCG 투여 직후 감소하고, hCG 투여 60시간 후에 progesterone의 조기 분비가 hCG 비투여 대조군에 비해 현저해짐을 보고하였다.

이와같이 과배란유도 과정에서 hCG의 투여 시기 및 용량이 난자의 획득, 체외수정 및 배자의 체외성장에 미치는 영향에 대한 연구보고가 일정하지 않다.

이에 저자는 생쥐(C57BL×CBA)를 이용하여 과배란유도 과정에서 hCG의 투여시기와 용량이 난자의 획득, 체외수정 및 배자의 체외성장에 미치는 영향에 대해 종합적으로 관찰, 비교 분석하기 위하여 본 연구를 시도하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 생쥐 제 1대 잡종(C57BL×CBA)을 선택하여 동물사육실에서 광량(12시간:12시간), 온도($22 \pm 2^\circ\text{C}$) 및 환풍조절하에서 1-2주동안 환경에 적응시킨 후 본 실험에 사용하였다.

암컷은 생후 6-8주의 개체를 사용하였고, 수컷은 생식능력이 증명된 8-11주령의 개체

를 사용하였으며, 사육시 과밀사육으로 인한 스트레스를 방지하기 위하여 한 우리는 5-6마리씩 수용하고 사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 해 주었다.

2. 과배란유도

1) 제 1군:과배란을 유도하기 위하여 6-8주령의 암컷 생쥐를 사육우리에서 임의 추출하여 발정주기에 관계없이 5IU의 PMSG(Sigma No. G4877)를 복강내 주사하고 48시간 후에 각각 8마리의 생쥐에 1IU, 5IU 및 10IU의 hCG(Sigma No. CG-2)를 투여하여 hCG 투여용량의 효과를 관찰하였다.

2) 제 2군:hCG투여 시기에 따른 효과를 관찰하기 위하여 각각 10마리의 생쥐에 PMSG 5IU 투여 36시간 후, 48시간 후, 60시간 후에 5IU의 hCG를 투여하였다.

3. 난자의 채집

hCG주사 16시간 후 생쥐를 경추탈구법으로 희생시키고 멸균조작으로 복막을 열어 난소, 난관 및 자궁을 노출시켜서 양측난관만을 분리하여 2ml의 배양액이 담긴 35mm의 배양접시(Falcon 3001)에 모았다. 해부현미경하에서 30G 주사침을 사용하여 난관을 배양액으로 세척하여 난자를 획득하였다. 이때 난자에 존재하는 정자수용체의 손상을 방지하기 위하여 난구세포는 제거하지 않았다.

4. 난자배양액의 제조

배양액은 Ham's F-10+0.4% bovine serum albumin(이하 BSA로 약함)을 사용하였다. Ham's F-10(Gibco #430-1200)을 이용하여 250ml의 5차 증류수로 배양액(4×)을 만들고, penicillin G 74mg, Streptomycin sulfate 75mg을 추가한 후 가압여과 소독을 시행하여 4°C 냉장고에 보관하였다.

이와같이 제조된 배양액(4×) 25cc에 5차 증류수 75cc를 첨가하고, calcium lactate 24.52mg과 NaHCO 210.6mg을 추가한 후 pH를 7.4에 맞추고 삼투압은 280-385 mOsm이 되도록 하여, 우혈청 알부민의 농도가 0.4%가 되도록 첨가하여 실험용 배양액으로 사용하였다. 이 배양액은 다시 0.2μ millipore filter(Gelman)로 가압여과하여 5% 탄산가스 배양액에서 16시간 평형시킨 후 사용하였다. 모든 배양액은 최초 제조 후 2주 이내에 사용하였다.

5. 정자처리

난자배양액에 10% 난포액을 첨가하여 정자의 수정능획득 배양액으로 하였다. 난포액은 배란직전 여성의 난포액으로서 본원 산부인과 학교실의 자연배란주기를 이용한 체외수정시술 프로그램에서 공급되었다. 난포액을 4°C에서 단기보존(20-30분, 난자흡인시술이 끝날 때까지)한 후 1,000rpm에서 30분간 원심분리하여 난구세포를 제거한 다음 항온 수조에서 (56°C) 60분간 유지하였다.

그 다음 filter(Gelman #4192)로 여과하여 5ml 플라스틱 튜브에 1ml씩 분주하여 -20°C에서 사용전까지 보존하였다.

체외수정용 정자는 8-11주령의 생쥐 제 1대 잡종(C578BL×CBA)의 정소상체 미부의 정자를 사용하였다. 정소로부터 정소상체미부를 분리한 후 2ml의 난자배양액(Ham's F-10, 4% BSA)에서 26G 주사침으로 정자괴를 유리시켰다. 정자괴를 확산시키기 위해 37°C 5% 탄산가스 배양기에서 10분간 배양하였다. 그 다음 이 정자부유액 0.2-0.4ml를 2ml의 수정능 획득배양액(Ham's F-10+0.4% BSA+10% human preovulatory follicular fluid)으로 옮기고 동일한 배양기에서 20-30분간 배양함으로써 수정능 획득을 야기하였다.

이와같이 만들어진 제 2차 정자부유액 0.1-0.3ml를 난자를 포함하는 배양액에 넣어줌으로써 체외수정을 시행하였으며 이때 정자의 최종 농도는 Makler Counting Chamber(Sefi Medical Instruments)를 이용하여 1×10^6 /ml로 맞추었다.

정자주입 후 12시간동안 37°C, 5% 탄산가스 배양기에서 배양한 후 난자배양액으로 옮겨서 배양을 계속하였다. 배양액의 교환은 정자주입 48시간 후에 한번 시행하였다.

6. 정자 및 난자 배양 용기

정자처리와 난자배양용 용기는 organ tissue culture dish(Falcon #3037)를 사용하였다. 이 용기의 내조(inner well)는 정자처리에 매우 편리하며 난자 배양에 있어서도 배양 전 난자의 세척 및 배양시 습도유지 등으로 외조(outer well)를 효율적으로 이용할 수 있는 장점이 있다.

7. 배자의 관찰

정자주입 48시간 후에 정상적으로 2세포기

이상 분열한 배자와 분열하지 않은 1세포기 및 변형된 난자의 수를 관찰 비교하였으며, 정자주입 120시간 후에는 포배기 배아와 부화(hatching) 포배기 배아의 수를 관찰하여 비교 분석하였다.

8. 통계분석

통계학적 유의성 검정은 X^2 -test, Z-test 및 percent test를 이용하여 시행하였다.

실험 결과

1. hCG 투여 용량에 따른 효과

1) 획득난자 총수

PMSG 5IU투여 48시간 후에 hCG 투여 용량을 1IU, 5IU, 10IU 세군으로 나누어 각각 8마리에 투여한 후 배란된 난자의 총수는 1IU의 hCG 투여군에서 199개(1마리당 평균 24.9개)이었고, 5IU의 hCG 투여군에서는 231개(1마리당 평균 35.3개)이었으며, 10IU의 hCG 투여군에서는 231개(1마리당 평균 28.9개)로 세군간에 배란된 난자 숫자에 유의한 차이는 없었다(표 1).

2) 생쥐 개체별 획득 난자수의 분포

1IU의 hCG투여군 중 0-10개, 11-20개, 31-

Table 1. Effect of dose of human chorionic gonadotropin on superovulation of mice

	Dose of hCG		
	1IU	5IU	10IU
No. of mice treated	8	8	8
No. of eggs ovulated	199	282	231
	^a (24.9 ±15.5)	^b (35.3 ±12.2)	^c (28.9 ±10.4)

(): mean ± 2S.D., The differences among a, b and c were insignificant.

40개의 난자를 획득한 개체수는 각각 2마리, 1마리, 5마리이었고, 5IU의 hCG 투여군에서는 11-20개, 21-30개, 31-40개, 41-60개의 난자를 획득한 개체수는 각각 1마리, 2마리, 2마리, 3마리이었으며 10IU의 hCG 투여군에서는 11-20개, 21-30개, 31-40개, 41-60개의 난자를 획득한 개체수는 각각 2마리, 4마리, 1마리, 1마리이었다(표 2).

3) 정자주입 48시간 후의 체외수정된 배자의 성장상태

1IU의 hCG 투여군에서는 총 199개의 난자 중 151개(75.9%)가 정상적으로 2세포기 이상 분열하였고 5IU의 hCG 투여군에서는 총 282개의 난자 중 244개(86.5%)가 정상적으로 2세포기 이상 분열하였으며 10IU의 hCG 투여군에서는 총 231개의 난자 중 140개(60.6%)가 정상적으로 2세포기 이상 분열하여, 5IU의 hCG 투여군에서 1IU 및 10IU의 hCG 투여군에 비해 유의하게 높았으며(Percent 검정, $p < 0.05$), 1IU의 hCG 투여군은 5IU의 hCG 투여군에 비해서는 유의하게 낮았으나 10IU의 hCG 투여군에 비해서는 유의하게 높았다($p < 0.05$).

비정상난자 중 분열하지 않은 1세포기 난자의 비율은 10IU의 hCG 투여군에서 1IU 및 5IU의 hCG 투여군에 비해 유의하게 높았고 ($p < 0.05$), 변형된 난자의 비율은 5IU의 hCG 투여군에서 1IU 및 10IU의 hCG 투여군에 비해 유의하게 낮았다($p < 0.05$)(표 3).

4) 정자주입 120시간 후의 체외수정된 배자의 성장상태

정자주입 48시간 후에는 정상적으로 2세포기 이상으로 분열한 배자를 배양액을 교환해 준 다음 계속 배양하여 정자주입으로 부터 120시간 후에 다시 성장상태를 관찰한 결과, 포배기에 도달한 배자의 비율은 10IU의 hCG 투여군에서 90.0%로 5IU의 hCG 투여군의

Table 2. Correlation between number of eggs and dose of human chorionic gonadotropin

Number of eggs Ovulated		Dose of hCG		
		1IU	5IU	10IU
	0-10	25 (2/8)	0 (0/8)	0 (0/8)
% (No.) of mice with the number of eggs	11-20	12.5(1/8)	12.5(1/8)	25 (2/8)
	21-30	0 (0/8)	25 (2/8)	50 (4/8)
	31-40	62.5(5/8)	25 (2/8)	12.5(1/8)
	41-60	0 (0/8)	37.5(3/8)	12.5(1/8)

Table 3. Effect of dose of human chorionic gonadotropin on the quality of eggs from superovulation of mice

Embryonic stages at 48hrs after insemination	Dose of hCG		
	1 IU	5 IU	10 IU
Total No. of eggs	199	282	231
% of eggs normally cleaved over 2-cell	^a 75.9	^b 86.5	^c 60.6
% of abnormal eggs	^{a1} 24.1	^{b1} 13.5	^{c1} 39.4
Uncleaved 1-cell	^{a2} 9.0	^{b2} 6.1	^{c2} 14.8
Fragmented eggs	^{a3} 15.1	^{b3} 7.4	^{c3} 15.6

The differences between a0 & b0, b0 & c0, and c0 & a0 were significant ($p < 0.05$).

The differences between a1 & b1, b1 & c1, and c1 & a1 were significant ($p < 0.05$).

The differences between b2 & c2, and c2 & a2 were significant ($p < 0.05$).

The differences between a3 & b3, b3 & c3, were significant ($p < 0.05$).

Table 4. Effect of dose of human chorionic gonadotropin on the in vitro developmental ability of eggs fertilized in vitro

Embryonic stages at 120hrs after insemination	Dose of hCG		
	1 IU	5 IU	10 IU
No. of eggs developed over 2-cell	151	244	140
% of blastocysts	83.3	*81.1	*90.0
% of hatching blastocysts	66.9	67.2	72.9

*($p < 0.05$).

Table 5. Effect of the interval between pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin injection on superovulation of mice

	Hours between PMSG and hCG		
	36	48	60
No. of mice treated	10	10	10
No. of eggs ovulated	222	356	249
	^a (33.8 ± 13.7)	^b (52.9 ± 8.9)	^c (37.1 ± 9.3)

() : mean ± 2S.D., The differences among a, b and c were insignificant.

81.1%에 비해 유의하게 높았으며 ($p < 0.05$), 1IU의 hCG 투여군의 83.3%에 비해서는 다소 높게 나타났으나 통계학적으로 유의한 수준은 아니었다.

또한 1IU의 hCG 투여군과 5IU의 hCG 투여군 사이에는 유의한 차이가 없었다. 포배기 배자 중 부화포배기 배자가 차지하는 비율은 1IU의 hCG 투여군에서 66.9%, 5IU의 hCG 투여군에서 67.2%, 그리고 10IU의 hCG 투여

군에서 72.9%로 세군간에 유의한 차이는 없었다(표 4).

2. hCG 투여 시각에 따른 효과

1) 획득난자 총수

PMSG 5IU를 투여하고 36시간 후, 48시간 후, 60시간 후에 각각 10마리의 생쥐에 5IU의 hCG를 투여한 결과 배란된 난자의 총수는 36시간 후 투여군에서 222개(1마리당 평균 33.8개), 48시간 후 투여군에서는 356개(1마리당 52.9개), 60시간 후 투여군에서는 249개(1마리당 37.1개)로 세 군간에 획득난자의 숫자에 유의한 차이는 없었다(표 5).

2) 생쥐 개체별 획득 난자수의 분포

36시간 후 투여군 중 0-10개, 11-20개, 21-30개 31-40개의 난자를 획득한 개체수는 각각 2마리, 2마리, 3마리, 1마리이었고, 48시간 후 투여군에서는 11-20개, 21-30개, 31-40개, 41-50개의 난자를 획득한 개체수는 각각 1마리, 1마리, 5마리, 3마리이었으며, 60시간 후 투여군에서는 11-20개, 21-30개, 31-40개의 난자를 획득한 개체수는 각각 5마리, 1마리,

Table 6. Correlation between number of eggs and the interval of pregnant mare's serum gonadotropin-human chorionic gonadotropin injection

Number of eggs Ovulated		Hours between PMSG and hCG		
		36	48	60
% (No.) of mice with the number of eggs	0-10	20(2/10)	0(0/10)	0(0/10)
	11-20	20(2/10)	10(1/10)	50(5/10)
	21-30	30(3/10)	10(1/10)	10(1/10)
	31-40	10(1.10)	50(5/10)	40(4/10)
	41-50	20(2/10)	30(3/10)	0(0/10)

Table 7. Effect of the interval between pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin injection on the quality of eggs from superovulation of mice

Embryonic stages at 48 hrs after insemination	Hours between PMSG and hCG		
	36	48	60
Total No. of eggs	222	356	249
% of eggs normally cleaved over 2-cell	^{a0} 68.9	^{b0} 82.6	^{c0} 79.1
% of abnormal eggs	^{a1} 31.1	^{b1} 17.4	^{c1} 20.9
Uncleaved 1-cell	13.1	9.0	11.2
Fragmented eggs	^{a2} 18.0	^{b2} 8.4	^{c2} 9.6

The differences between a0 & b0, and c0 & a0 were significant ($p < 0.05$).
 The differences between a1 & b1, and c1 & a1 were significant ($p < 0.05$).
 The differences between a2 & b2, and c2 & a2 were significant ($p < 0.05$).

Table 8. Effect of the interval between pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin injection on the in vitro developmental ability of eggs fertilized in vitro

Embryonic stages at 120 hrs after insemination	Hours between PMSG and hCG		
	36	48	60
No. of eggs over 2-cell	153	294	197
% of blastocysts	^{a0} 73.2	^{b0} 74.8	^{c0} 86.8
% of hatching blastocysts	^{a1} 44.4	^{b1} 45.9	^{c1} 58.9

The differences between b0 & c0, and c0 & a0 were significant ($p < 0.05$).
 The differences between b1 & c1, and c1 & a1 were significant ($p < 0.05$).

4마리이었다(표 6).

3) 정자주입 48시간 후의 체외수정된 배자의 성장상태

36시간 후 hCG 투여군에서는 총 222개의 난자 중 153개(68.9%)가 정상적으로 2세포기 이상 분열하였고, 48시간 후 hCG 투여군에서는 총 356개의 난자 중 294개(82.6%)가 정상적으로 2세포기 이상 분열하였으며 60시간 후 hCG 투여군에서는 총 249개의 난자 중 197개(79.1%)가 정상적으로 2세포기 이상 분열하여, 36시간 후 hCG 투여군에서 48시간 후 및 60시간 후 hCG 투여군에 비해 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

비정상난자 중 분열하지 않은 1세포기 난자의 비율에는 세 군간에 유의한 차이가 없었다. 그러나 변형된 난자의 비율은 36시간 후 hCG 투여군에서 18.0%로 48시간 후 hCG 투여군의 8.4%와 60시간 후 hCG 투여군의 9.6%에 비해 유의하게 높았다($p < 0.05$)(표 7).

4) 정자주입 120시간 후의 체외수정된 배자의 성장상태

정자주입 48시간 후에 정상적으로 2세포기 이상으로 분열된 배자를 배양액을 교환해 준 다음 계속 배양하여 정자주입으로 부터 120시간 후에 다시 성장상태를 관찰한 결과, 포배기에 도달한 배자의 비율은 60시간 후 hCG

투여군에서 86.8%로 36시간 후 hCG 투여군의 73.2%와 48시간 후 hCG 투여군의 74.8%에 비해 유의하게 높았다($p < 0.05$).

포배기 배자 중 부화포배기 배자가 차지하는 비율에서도 60시간 후 hCG 투여군에서 58.9%로 36시간 후 hCG 투여군의 44.4%와 48시간 후 hCG 투여군의 45.9%에 비해 유의하게 높았다($p < 0.05$)(표 8).

고 찰

체외수정기술에 의한 최초의 임신 성공은 과배란유도를 시행하지 않은 자연 배란 주기에서 난자를 흡인하여 이루어졌으나(Steptoe와 Edwards 1978), 최근 체외수정기술을 위한 과배란유도 과정에 외인성 hCG를 투여로 난자의 성숙을 마무리하여 난자흡인을 시행하는 것이 일상적인 통례로 되었다(Jones등 1984, Thornton등 1990, Nader와 Berkowitz 1990).

자연 배란주기에 있어서 난포의 성장과 성숙은 성성자극호르몬과 난소에서 분비되는 홀몬 및 각종화학물질의 조화를 통해 이루어지며 최종적으로 황체화호르몬(LH) surge로서 발현되는 LH surge가 나타나고 24-36시간 후 배란이 일어나게 된다(Fritz와 Speroff 1982).

체외수정기술에서 정상 배란주기를 가지고 있는 여성에 성성자극호르몬을 투여하여 과배란유도를 시행하는 경우 내인성 LH surge의 발현을 관찰할 수 없었다는 보고가 있는(Littman과 Hodgen 1984) 한편, 최근에는 외인성 성성자극호르몬을 투여하는 경우에 LH surge가 완전히 억제되지 아니하고 LH surge가 발현될 수 있다는 보고도 많이 있다(Eibuchitz등 1986, Lejeune등 1986, Nader등 1986, Huang등 1987).

Ferraretti 등(1983)은 정상배란주기를 가지고 있는 여성에 hMG를 투여하여 과배란유도를 시행한 경우에서 hMG에 의한 난포성장유도 후 108시간이 지나도록 내인성 LH surge의 발현이 없었다고 보고하였고, Laufer 등(1984)은 hMG를 최종 투여하고 48-72시간 후까지 난포의 성장이 장애없이 지속적으로 유지됨을 관찰하고 이는 hMG의 대량투여(225IU/day of FSH & LH)이 효과와 hMG에 포함된 FSH 성분의 비교적 긴 반감기에 의한 효과때문일 것이라고 하였으며, hMG로 난포성장을 유도한 후 48-72시간까지 높은 estradiol의 농도에도 불구하고 내인성 LH surge 발

현에 의한 배란은 일어나지 않았다고 보고하였다.

Sopelak와 Hodgen(1984)은 Florisil/Charcoal 처리한 돼지 난포액을 거세한 monkey에 투여하였을때 estradiol benzoate에 의해 유발된 내인성 LH surge의 발현을 억제하였으나 LH-releasing hormone(LHRH)에 의한 유발된 내인성 LH surge의 발현은 억제하지 못하였음을 관찰하고 hMG를 투여한 여성의 난포액내도 이와 같은 물질이 존재하여 estrogen에 의해 유발되는 LH surge의 발현이 억제된다고 설명하였다.

내인성 LH surge가 발현하는 경우 과배란유도에 사용하는 배란유도제에 따라서 그 발생빈도에 차이가 난다고 보고하고 있다. hMG만으로 과배란유도를 시행한 경우 Vargyas 등(1984)은 33%, Huang 등(1987)은 42%, Talbert(1988)는 21%에서 내인성 LH surge의 발현을 보고하였고, clomiphene citrate와 hMG를 병용한 경우에는 Vargyas 등(1984)은 0-15%, Talbert(1988)는 9.8%의 내인성 LH surge의 발현을 보고하였다. 장광장(1989)은 FSH와 hMG를 사용한 과배란유도 과정에서 44.7%의 높은 내인성 LH surge 발현율을 보고하고 다른 보고와 차이가 나는 원인으로 배란유도제의 차이, hCG 투여기준(난포성숙기준)의 차이, 대상환자의 개체 차이를 들었다.

체외수정기술에서 난자흡인은 내인성 LH surge가 발현되거나 외인성으로 hCG를 투여한 후 배란이 일어나기 전에 시행해야 한다.

인위적으로 hCG를 투여하는 경우 난자흡인시각을 다소 자유롭게 정할 수 있다는 잇점이 있으나(Hillier등 1985), 너무 늦게 투여하는 경우에는 내인성 LH surge의 발현에 의해서 난포가 터져버릴 수 있고(Eibschitz등 1986, Lejeune등 1986, Nader등 1986, Huang등 1987), 너무 일찍 투여하는 경우에는 난포의 성장이 도중에 멈추고 퇴화해 버리며 규칙적인 배란주기의 일시적 교란이 일어날 수 있다(Williams와 Hodgen 1980).

이와 같이 외인성 hCG 투여의 난포성장 및 성숙에 대한 효과는 난포성장의 시기에 따라 상반되게 나타날 수 있다. 그러나 hCG 투여시점의 결정은 다양한 매개변수에 의해 이루어지며, 난포성숙에 대한 완벽한 매개변수는 없으므로 경우에 따라 적기보다 빠르거나 늦게 투여하게 될 수 있다. 또한 사람에서는 난

포성장의 동시성이 없기 때문에 과배란유도 과정 중 hCG 투여시점에서는 필연적으로 다양한 성숙 단계에 있는 난자가 존재하게 되어 어떤 난자에 대해서는 적절한 시점에서 hCG가 투여되지만 다른 난자에 대해서는 적절하지 못한 시점에서 hCG가 투여되는 결과가 된다(Thebault 등 1982, El-Badrawi와 Hafez 1982).

따라서 hCG 투여시점에 따라 흡인되는 난자의 성숙도, 질, 체외수정을 및 배자의 체외성장율이 다르게 나타난다.

쥐(rat), 햄스터, 생쥐에서 외인성 PMSG의 투여는 난포에 대해서 항 퇴화작용(anti-atretic action)을 나타낸다(Braw와 Tsafriiri 1980, Hubbard와 Greenwald 1983, Peters 등 1975). 따라서 외인성 PMSG의 투여를 중단하면 난포는 퇴화가 유발될 수 있다. Laufer 등(1980)은 사람의 체외수정시술시 과배란 유도 과정에서 hMG-hCG 간격을 24시간에서 48시간으로 한 결과 흡인된 난자의 성숙도에 있어서는 차이가 없었으나 체외수정율이 낮아지고 변형된 난자의 비율이 높아졌음을 보고하고, hMG-hCG 시간간격을 42시간, 46시간, 50시간으로 하여 과배란 유도를 했을 때 PMSG-hCG 시간간격이 짧을수록 난자의 체외수정율이 유의하게 낮아짐을 보고하였으며, Edgar 등(1987)도 생쥐를 이용한 실험에서 PMSG-hCG 간격을 36시간, 48시간, 60시간으로 하여 과배란 유도를 시행하였을 때 2세포기까지의 성장율은 세 군간에 차이가 없었으나 포배기 배자까지의 성장율은 PMSG-hCG 시간간격이 길어질수록 유의하게 높아졌으며, PMSG-hCG 시간간격이 36시간과 48시간인 군에서 채집된 난자를 배양기 속에서 각각 24시간, 12시간 체외배양하여 수정시킨 결과 체내에서의 시간결손을 보상하지 못했을 뿐 아니라 포배기 배자까지의 성장율이 오히려 낮아졌음을 보고하였다. 저자의 연구의 결과는 Hillier 등(1985)과 Edgar 등(1987)의 연구결과와 일치한다.

사람의 체외수정시술시 난자의 마무리 성숙을 위해 투여하는 hCG의 용량은 2,000 IU로부터 10,000 IU 또는 그 이상의 hCG를 투여해야 한다고 하는 보고가 있는 한편(Notation 등 1978, Tssapoulis 등 1978, Crooke 등 1967, Brown 등 1969), 그 보다 적은 용량으로도 효과적으로 배란을 일으킬 수 있다는 보고도 있다(Hancock 등 1970).

배란에 필요한 외인성 hCG의 용량은 환자에 따라 다르며(O Herlihy 등 1982), 아마 최소 역치(minimum threshold)가 존재할 것으로 생각하고 있다(Crooke 등 1973). Abdalla 등(1987)은 환자마다 hCG의 최소 역치가 각기 다르며, 과배란 유도시 hCG 투여용량은 최소한 5,000 IU는 되어야 한다고 하였다.

Baukloh 등(1982)은 생쥐를 이용한 실험에서 PMSG 10IU/hCG 10IU, PMSG 5IU/hCG 5IU, PMSG 3IU/hCG 5IU를 세 군에 각각 투여하여 난자를 채집한 결과, PMSG와 hCG의 투여용량이 증가함에 따라 채집된 난자의 수는 유의하게 증가하지만, 변형된 난자의 비율이 또한 유의하게 증가함을 보고하였는데 그와 같은 결과는 주로 hCG 투여용량의 증감보다는 PMSG 투여용량의 증감에 의한 효과로 보인다.

사람에서 난포의 성장과 그에 따른 난자흡인율은 과배란 유도시 투여된 성선자극 호르몬의 양에 대해서도 영향을 받는다(Abdalla 등 1987). 생쥐의 경우에는 난포로부터 분리된 난구의 팽창은 FSH에 의존적으로 일어나고 LH에 의해서는 일어나지 않으나(Eppig 1979), 사람에서는 투여된 hMG에 포함되어 있는 LH의 존재가 난포벽으로부터의 난자 난구 복합체의 능동적인 분리에 필요하며 과배란 유도시 pure FSH-hCG를 사용하는 환자에 대해서는 LH의 농도가 낮아지므로 hCG의 투여용량을 높이는 것이 바람직하다고 하였으며, 결론적으로는 사람의 난구의 팽창은 LH에 의해 매개되거나, 적어도 LH/FSH 비(ratio)에 의존적이며 hCG 투여용량을 높임으로써 LH의 부족을 보상할 수 있다고 하였다(Abdalla 등 1987).

저자의 연구결과를 종합하여 볼때 생쥐(C57BL×CBA)의 체외수정을 위한 PMSG-hCG 투여는 가급적 피하는 것이 바람직하다고 생각되며, hCG 투여시각에 있어서는 PMSG 투여 36시간 후에 투여하면, 체외수정 및 체외성장이 가능한 정상적인 난자의 획득율이 낮아지므로 48시간 내지 60시간 후에 투여하는 것이 적절하며 포배기와 부화 포배기까지의 배자의 체외성장은 60시간 후에 투여하는 것이 더욱 좋은 성적을 얻을 수 있다고 생각된다.

결 론

생쥐 제 1대 잡종(C57BL×CBA)을 이용한 PMSG-hCG 과배란 유도에서 hCG 투여시기 및 투여용량이 난자의 획득, 체외수정 및 배자의 체외성장에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여 6-8주령의 암컷 생쥐에 5IU의 PMSG를 복강내 주사하고 48시간 후에 1IU, 5IU, 10IU의 hCG를 각각 투여하고, 또한 PMSG 5IU 투여 36시간 후, 48시간 후, 60시간 후에 5IU의 hCG를 각각 투여하여 난자를 채집하고 체외수정 시켜서 배자의 체외성장을 관찰, 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. hCG 투여 용량에 따른 효과

1) PMSG 투여 48시간 후에 1IU, 5IU, 10IU의 hCG를 각각의 생쥐군에 투여하는 모든 개체에서 배란이 유도되었으며 채집된 난자의 총수는 각각 199개(1마리당 24.9개), 282(1마리당 35.3개), 231(1마리당 28.9개)로 세 군간에 유의한 차이는 없었다.

2) 정자주입 48시간 후의 체외수정된 배자의 성장 상태를 관찰한 결과 정상적으로 2세포 이상 분열한 배자의 비율은 5IU의 hCG 투여한 군에서 86.5%로 1IU 투여군의 75.9%와 10IU 투여군의 60.6%에 비해 유의하게 높았으며, 1IU와 10IU의 hCG를 투여한 두 군 사이에서는 오히려 소량의 1IU의 hCG를 투여한 군에서 10IU의 hCG를 투여한 군에 비해 유의하게 높았다.

3) 정자주입 48시간 후에 정상적으로 2세포기 이상 분열한 배자중 정자주입 120시간 후에 포배기에 도달한 배자의 비율은 10IU의 hCG 투여군에서 90.0%로 5IU의 hCG의 81.1%에 비해 유의하게 높았으나, 1IU의 hCG 투여군의 83.3%에 비해서는 유의한 차이가 없었다.

또한 부화 포배기에 이른 배자의 비율은 1IU, 5IU, 10IU의 hCG 투여군에서 각각 66.9%, 67.2%, 72.9%로 세 군 사이에 유의한 차이가 없었다.

2. hCG 투여 시기에 따른 효과

1) PMSG 5IU를 투여하고 36시간 후, 48시간 후, 60시간 후에 각각의 생쥐군에 5IU의 hCG를 투여하여 모든 개체에서 배란이 유도되었으며 채집된 난자의 총수는 각각 222개(1마리당 33.8개), 356개(1마리당 52.9개),

249개(1마리당 37.1개)로 세 군 간에 유의한 차이는 없었다.

마찬가지로 분열하지 않았거나 변형된 난자의 비율은 36시간 후 hCG 투여군에서 48시간 후 및 60시간 후 hCG 투여군에 비해 유의하게 높았으며, 48시간 후 투여군과 60시간 후 투여군 사이에는 유의한 차이가 없었다.

2) 정자주입 48시간 후의 체외수정된 배자의 성장 상태를 관찰한 결과 정상적으로 2세포기 이상 분열한 배자의 비율은 36시간 후 hCG 투여군에서 68.9%로 48시간 후 및 60시간 후 hCG 투여군의 82.6%와 79.1%에 비해 유의하게 낮았으며, 48시간 후 투여군과 60시간 후 투여군 사이에는 유의한 차이가 없었다.

3) 정자주입 48시간 후에 정상적으로 2세포기 이상 분열한 배자중 정자주입 120시간 후에 포배기에 도달한 배자의 비율은 60시간 후 hCG 투여군에서 86.8%로 36시간 후 투여군의 73.2%와 48시간 후 투여군의 74.8%에 비해 유의하게 높았으며, 부화 포배기에 도달한 배자의 비율도 60시간 후 hCG 투여군에서 58.9%로 36시간 후 투여군의 44.4%와 48시간 후 투여군의 45.9%에 비해 유의하게 높았다.

본 연구의 결과를 종합하여 볼때 생쥐(C57BL×CBA)의 체외수정을 위한 PMSG-hCG 과배란 유도시 체외수정 및 체외수정이 가능한 정상적인 난자를 많이 획득하기 위해서는 과용량의 hCG 투여는 가급적 피하는 것이 바람직하다고 생각되며, hCG 투여 시각에 있어서는 PMSG 투여 36시간 후에 투여하면 체외수정 및 체외성장이 가능한 정상적인 난자의 획득율이 낮아지므로 48시간 내지 60시간 후에 투여하는 것이 적절하며 포배기와 부화포배기까지의 배자의 체외성장은 60시간 후에 투여하는 것이 더욱 좋은 성적을 얻을 수 있다고 생각된다.

이상의 결과를 미루어 보아 사람의 체외수정기술에 있어도 과배란 유도시 hCG 투여용량은 과용량이나 저용량이 되지 않도록 특히 과용량의 hCG 사용은 가급적 피하는 것이 바람직하며, hCG 투여시기는 적어도 coasting period를 지난 후 투여하는 것이 바람직할 것으로 추정된다.

인 용 문 헌

Abdalla HI, Ah-Moye M, Brinsden P, Howe

- DL, Okonofua F, Craft I: The effect of the dose of human chorionic gonadotropin and the type of gonadotropin stimulation on oocyte recovery rates in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1987, 48, 958-963.
- Ahuja KK, Smith W, Tucker M, Craft I: Successful pregnancies from the transfer of pronuclear embryos in an outpatient in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1985, 44, 181-184.
- Baukloh V, Mettler L, Seki M, Maas DHA: In vitro fertilization of the mouse. *In vitro Fertilization and Embryo Transfer*. In Hafez ESE, Semm K (eds). Falcon House, Lancaster, England: MTP press Limited, 1982, 89-95.
- Braw RH, Tsafriri A: Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J Reprod Fert* 1980, 59, 267-272.
- Brown JB, Evans JH, Adey FD, Taft HP: Factors involved in the induction of fertile ovulation with human gonadotropins. *J Obstet Gynecol Br Common* 1969, 76, 289-307.
- Crooke AC, Butt WR, Bertrand PV, Morris R: Current trends in the treatment of amenorrhea with human gonadotropin. *Proc R Soc Med* 1967, 60, 12-14.
- Crooke AG, Sutaria UD, Bertrand PV: Unusual responses of infertile women to human gonadotropins. *Am J Obstet Gynecol* 1973, 116, 706-710.
- Edgar DH, Whalley KM, Mills JA: Preimplantation development following in vitro fertilization of mouse oocytes: effects of timing of superovulation and preincubation in vitro. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1987, 4, 111-115.
- Eibitz I, Belaisch-Allart JC, Frydman R: In vitro fertilization management and results in stimulated cycles with spontaneous luteinizing hormone discharge. *Fertil Steril* 1986, 45, 231-236.
- EL-Badrawi HH, Hafez ESE, Factors and mechanisms affecting success of in vitro fertilization and embryo transfer. In Hafez ESE, Semm K (eds). *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. Falcon House, Lancaster, England MTP: Press Limited, 1982, 361-379.
- Eppig JJ: Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion in vitro. *J Exp Zool* 1979, 208, 111-120.
- Ferraretti AP, Garcia JE, Acosta AA, Jones GS: Serum luteinizing hormone during ovulation induction with human menopausal gonadotropin for in vitro fertilization in normally menstruating women. *Fertil Steril* 1983, 40, 742-747.
- Fritz MA, Speroff L: The endocrinology of the menstrual cycle: the interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms. *Fertil Steril* 1982, 38, 509-529.
- Garcia JE, Jones GS, Acosta AA, Wright (Jr) G: Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: phase II, 1981. *Fertil Steril* 1989, 39, 174-179.
- Hancock KW, Stinch SR, Oakey RE, Scott JS, Levell MJ, Ellis FR: Ovulation stimulation: Problems of prediction of response to gonadotropins. *Lancet* 1970, 2, 482-485.
- Hillier GS, Afnan AMM, Margara RA, Winston RML: Superovulation strategy before In vitro Fertilization. *Clin Obstet Gynecol* 1985, 12, 687-723.
- Hillier SG, Parsons JH, Margara RA, Crofton ME: Serum estradiol and preovulatory follicular development before in-vitro fertilization. *J Endocrinol* 1984, 101, 113-118.
- Hillier SG, Siddiquy AKS, Winston RML: Fertilization In Vitro of Cumulus-Enclosed Mouse Oocytes: Effect of Timing of the Ovulatory HCG Injection. *Int J Fertil* 1985, 30(2), 34-38.
- Huang KE, Chang SY, Muechler EK, Graham MC: The outcome of continued treatment of luteinizing hormone surged cycles in vitro fertilization with the use of human menopausal gonadotropin. *Fertil Steril* 1987, 47, 816-820.
- Hubbard CJ, Greenwald GS: In vitro effects of

- luteinizing hormone on induced atretic graafian follicles in the hamster. *Biol Reprod* 1983, 28, 849-859.
- 장준홍, 장윤석:과배란 유도시 내인성 LH surge에 관한 연구. *대한산부회지* 1989, 32, 684-692.
- Jones GS:Update on in vitro fertilization. *Endocrine Rev* 1984, 5, 62-75.
- Jones HWJ, Acosta AA, Andrews MC, Garcia JE, Jones GS, Mayer J, McDowell JS, Rosenwaks A, Sandow BA, Veeck LL, Wilkes CA:Three years of in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 1984, 42, 826-834.
- Laufer N, DeCherney AH, Tarlatzis BC, Zuckerman AL, Polan ML, Dlugi AM, Graebe R, Barnea ER, Naftolin F:Delaying human gonadotropin administration in human menopausal gonadotropin-induced cycles decreased successful in vitro fertilization of human oocytes. *Fertil Steril* 1984, 42, 198-203.
- Lejeune B, Degueldre M, Camus M, Vekemans M, Opsomer L, Leroy F:In vitro fertilization and embryo transfer as related to endogenous luteinizing hormone rise or human chorionic gonadotropin administration. *Fertil Steril* 1986, 45, 377-383.
- Littman BA, Hodgen GD:Human menopausal gonadotropin stimulation in monkeys: blockade of the luteinizing hormone surge by a highly transient ovarian factor. *Fertil Steril* 1984, 41, 440-447.
- Nader S, Berkowitz AS, Maklad N, Wolf DP, Held B:Characteristics of patients with and without gonadotropin surges during follicular recruitment in an in vitro fertilization/embryo transfer program. *Fertil Steril* 1986, 45, 75-78.
- Nader S, Berkowitz AS:Study of the pharmacokinetics of Human Chorionic Gonadotropin and Its Relation to Ovulation. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1980, 7, 114-118.
- Notation AD, Tagatz GE, Steffes MW:Serum 17-estradiol:Index of follicular maturation during gonadotropin therapy. *Obstet Gynecol* 1978.
- O'Harlihy C, Evans JH, Brown JB, Ch. de Crespigny LJ, Robinson HP:Use of ultrasound in monitoring ovulation induction with human pituitary gonadotropins. *Obstet Gynecol* 1982, 60, 577-582.
- Peters H, Byskov AG, Braw RH, Faber M:Follicular growth:The basic event in the mouse and human ovary. *J Reprod Fert* 1975, 45, 559-566.
- Quigley MM, kSchmidt CL, Beauchamp PJ, Pace-Owens S, Berkowitz AS, Wolf DP:Enhanced follicular recruitment in an in vitro fertilization program:clomiphene alone versus a clomiphene/human menopausal gonadotropin combination. *Fertil Steril* 1984, 42, 25-33.
- Sopelak VM, Hodgen GD:Blockade of the estrogen-induced luteinizing hormone surge in monkeys:a nonsteroidal, antigenic factor in porcine follicular fluid. *Fertil Steril* 1984, 41, 108-113.
- Stephens PC, Edwards RG:Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2: 366.
- Talbert LM:Endogenous luteinizing hormone surge and superovulation *Fertil Steril* 1988, 49, 24-25.
- Thebault A, Testart J, Castanier M, Frydman R:Oocyte quality after clomiphene-HCG treatment in women:relation to follicle size and steroidogenesis. in Hafez ESE, Semm K.(eds) *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. Falcon House, Lancaster, England MTP Press Limited, 1982, 171-180.
- Thornton SJ, Pantos C, Speirs A, Johnston I:Human chorionic gonadotropin to oocyte retrieval interval in vitro fertilization-how critical is it? *Fertil Steril* 1990, 53, 177-179.
- Tsapoulis AD, Zourlas PA, Comninos AC:Observations on 320 infertile patients treated with human gonadotropins(human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin). *Fertil Steril* 1978, 29, 492-495.

Vargyas JM, Morente C, Shangold G, Marrs RP: The effect of different methods of ovarian stimulation for human in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1984, 42, 745-749.

Williams RF, Hodgen GD: Disparate effects of human chorionic gonadotropin during the late follicular phase in monkeys: normal ovulation, follicular atresia, ovarian

acyclicity, and hypersecretion of follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 1980, 33, 64-68.

Ziecik A, Tilton JE, Espana F, Weigl R: Effect of human chorionic gonadotropin on preovulatory luteinizing hormone surge and ovarian hormone secretion in gilts. *J Anim Sci* 1987, 64, 1134-1143. Abstract from Medline.