

## 체외수정시술시 배아의 보조부화술을 이용한 임신을 향상에 관한 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

김석현 · 김광례 · 채희동 · 이재훈 · 김희선 · 류범용 · 오선경  
서창석 · 최영민 · 김정구 · 문신용 · 이진용

### Improvement of Pregnancy Rate by Assisted Hatching of Human Embryos in In Vitro Fertilization and Embryo Transfer Program

Seok Hyun Kim, Kwang Rye Kim, Hee Dong Chae, Jae Hoon Lee, Hee sun Kim,  
Buom Yong Ryu, Sun Kyung Oh, Chang Suk Suh, Young Min Choi,  
Jung Gu Kim, Shin Yong Moon and Jin Yong Lee

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Seoul National University,  
Seoul, Korea*

#### = Abstract =

In spite of much progress in in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) program, the pregnancy rate remains at 20-30%, and the endometrial implantation rate per embryo transferred at 10-15%. As a result, about 90% of embryos may fail to implant to the endometrium, and many attempts such as optimization of follicular development, improvement of in vitro culture system including coculture, and micromanipulation of zona pellucida have been made to improve embryonic implantation after IVF-ET. Recently, several procedures of assisted hatching (AH) using micromanipulation have been introduced, and pregnancies and births have been obtained after AH.

To develop and establish AH as an effective procedure to improve embryonic implantation, AH with partial zona dissection (PZD) was performed in 116 cycles of 89 infertile couples who had previous repeated failures of standard IVF-ET more than two times (Group I: 71 cycles in 54 patients), or who had implantation failure of embryos with good quality (Group II: 15 cycles in 13), or who had undergone AH without specific indication (Group III: 30 cycles in 22) from January, 1995 to February, 1996, and the outcomes of AH were analyzed according to pregnancy rate.

The number of oocytes retrieved after controlled ovarian hyperstimulation (COH) was  $9.9 \pm 7.1$  in Group I,  $11.5 \pm 4.5$  in Group II, and  $7.9 \pm 6.4$  in Group III. The number of embryos transferred after AH was  $4.7 \pm 1.8$  in Group I,  $5.3 \pm 1.3$  in Group II, and  $3.5 \pm 2.4$  in Group III. The mean cumulative embryo score (CES) was  $56.8 \pm 30.0$  in Group I,  $76.1 \pm 35.9$  in Group II, and  $38.5 \pm 29.9$  in Group III. The overall clinical pregnancy rate per cycle and per patient was 12.7% (9/71) and 16.7% (9/54) in Group I, 33.3% (5/15) and 38.5% (5/13) in Group

\*이 연구는 서울대학교 발전기금 포항제철 학술연구비(96-15-2128)의 지원에 의해 수행되었음.  
Supported by Grant No. 96-15-2128 from S. N. U. POSCO Research Fund.

II, and 6.7% (2/30) and 9.1% (2/22) in Group III, respectively. There were significant differences in the numbers of oocytes retrieved and embryos transferred, CES, and the clinical pregnancy rate per cycle among three groups. There was a significant inverse correlation between basal serum FSH level and CES, and no pregnancy occurred in patients with CES less than 20.

In conclusion, AH of human embryos with PZD prior to ET has improved the implantation and pregnancy rates in IVF-ET patients with the past history of repeated failures, especially in spite of transfer of embryos with good quality, and AH will provide a range of novel techniques which may contribute much to effective management of infertile couples.

**Key Words:** In vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET), Implantation rate, Pregnancy rate (PR), Micromanipulation, Assisted hatching (AH).

## 서 론

전체 부부의 10-15%를 차지하고 있는 불임 부부에서 체외수정기술 (in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)에 의한 임신 성공율은 최근의 괄목할만한 배양 조건의 향상과 제반 기술의 발달에도 불구하고 20-30%에 그치고 있으며, 수정 후 자궁내로 이식된 배아의 자궁내막 착상율은 생화학적 임신 (biochemical pregnancy)을 제외하면 12.5%에 불과하다 (Edward *et al.*, 1994). 배아의 착상 실패는 자궁내막의 환경이나 염색체 이상 유무 등에 더불어 배아 자체의 질 (quality), 실험실의 표준화, 배아이식 기술 등의 여러 인자들에 의하여 유발된다. 현재로는 배아 착상율의 향상을 위하여 배아를 체외에서 다른 세포와 공동배양 (coculture)하는 방법과 인위적으로 배아의 투명대를 열어주는 보조부화술 (assisted hatching, AH) 방법이 임상에서 이용될 수 있는 기술 방법이다.

배아의 자궁내이식 후 배아의 자궁내막 착상 과정은 아직 잘 규명되어 있지는 않지만, 체외에서 수정된 배아가 자궁내막에 착상하기 위해서는 배아의 부화 (hatching)가 선행되어야 하므로 배아의 부화 현상은 착상 및 임신 성립과 밀접한 관계가 있을 것으로 알려져 있다. 수정된 난자는 난할 등 배아의 발달이 시작되어 4-5일 정도가 경과되면 난자를 둘러싸고 있는 투명대 (zona pellucida)로 부터 탈출하여 자궁내막에 착상하게 된다. 인간 배아의 체외배양시 배양 조건이 적절하여도 투명대 경화 (hardening)가 흔히 발생하는데, 투명대가 비정상적으로 두꺼워지는 현상은 일부의 배아에서만 관찰되기도 하지만 일부 환

자에서는 모든 배아에서 투명대가 두꺼워진다. 이와 관련된 임상 및 실험적 상황으로는 환자의 연령이 많거나, 기초 혈중 난포자극호르몬 (follicle stimulating hormone, FSH) 농도가 증가된 경우, 혹은 불량한 배아의 질 등으로서 투명대 경화 현상에 영향을 미치는 인자들로 알려져 있다. 여성의 연령이 많거나, 기초 혈중 FSH 농도가 증가되어 있는 경우 등에서는 난포 발달 과정 동안 생성되는 난자의 투명대가 두꺼워질 수 있고, 따라서 착상 전 배아에서 투명대의 부화 현상이 잘 일어나지 않아 자궁내막 착상에 실패할 수 있을 것으로 추론할 수 있다.

이에 따라 체외수정기술시 부화 과정의 실패에 의하여 임신이 이루어지지 않을 것으로 추정되는 환자를 대상으로 최근 여러 연구자들이 체외수정기술을 위한 과배란유도 후 채취된 난자의 체외수정으로 얻어진 배아를 미세조작 (micromanipulation)을 이용한 보조부화술을 시행하여 배아가 쉽게 부화할 수 있도록 함으로써 보조부화술 시술시 배아의 착상과 임신율에 미치는 영향을 연구하고, 더불어 보조부화술의 불임증 치료에 있어서의 임상적 유용성을 규명하려는 시도가 있어 왔다. Cohen 등 (1990)은 투명대 부분 절개술 (partial zona dissection, PZD)에 의한 방법으로 배아의 보조부화술을 시행하여 대조군에 비하여 9%의 착상율과 20%의 임신율의 상승을 보고한 바 있다.

그러나 배아의 보조부화술을 체외수정기술의 기본적인 과정으로 이용할 것인지에 대하여는 아직 논란이 많이 있고, 이에 따라 보조부화술의 적응증에 대하여도 임상적으로 확립된 바가 없는 실정이다. 이에 연구자들은 체외수정기술 대상 불임환자 중 과거 시술시 연속적으로 3회 이

상 임신 성립에 실패하였던 환자와 과거 시술 시 배아의 상태가 양질임에도 불구하고 착상에 실패하였던 환자를 대상으로 미세조작을 이용한 배아의 보조부화술을 시행하여 배아가 용이하게 부화될 수 있도록 하여 배아의 착상과 임신율에 미치는 영향을 연구 분석하고, 보조부화술의 불임증 치료에 있어서의 임상적 유용성을 규명하고자 본 연구를 고안하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

1995년 1월부터 1996년 2월까지 불임을 주소로 서울대학교병원 산부인과 불임클리닉을 방문하여 시행한 불임검사 결과 치유될 수 없는 난관 질환, 자궁내막증, 만성 무배란, 원인불명 불임증 등으로 판명되어 체외수정시술 이외에는 다른 불임 치료 방법이 없다고 판단된 환자들 중 과거의 체외수정시술 시행 주기에서 3회 이상 임신 성립에 실패한 환자 군을 I군, 과거의 체외수정시술시 정상적인 배아 발달을 보였으나 임신 성립에 실패한 환자 군을 II군, 대조군으로서 특별한 적응증이 없이 보조부화술을 시행받은 환자 군을 III군으로 대별하여 보조부화술을 시행하였다.

대상 환자의 배우자에서 시행되었던 정액검사 상 정자의 수, 운동성 정자의 분포, 정자의 형태 등에서 비정상 범위를 나타내어 남성인자 불임증이 병합되어 있는 것으로 진단된 환자들은 연구 대상에서 제외하였다.

### 2. 연구방법

#### 1) 과배란유도

대상 환자에서 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist (Decapeptyl, D-Trp-6-LH, Ferring, Malmö, Sweden)를 사용한 황체기 장기투여법 (luteal phase long protocol)을 실시하여 과배란유도를 시행하였다 (Chang *et al.*, 1990 & 1994; 김 등, 1995 & 1996). 과배란유도 주기 전 월경주기 제 3일 오전 8시에 채혈하여 혈중 황체화호르몬 (lutening hormone, LH), 난포자극호르몬 (follicle stimulating hormone, FSH) 및 estradiol (E<sub>2</sub>) 농도를 측정하며, 질식 초음파검사 (transvaginal ultrasonography)를 시행하여 골반내 이상 유무를 확인하였다. 월경주기가 일정한 환자에서는 월경

주기 제 14일에 난포의 크기 및 배란 유무를 확인하여 월경주기 제 21일에 GnRH agonist의 피하 주사를 시작하였다 (ovarian suppression phase).

GnRH agonist의 피하주사 후 월경이 있으면 월경주기 제 3일에 뇌하수체의 기능 억제 유무를 확인하기 위하여 혈중 LH, E<sub>2</sub>, progesterone (P<sub>4</sub>)을 측정하여 LH < 5 mIU/ml, E<sub>2</sub> < 50 pg/ml, P<sub>4</sub> < 1 ng/ml인 경우 과배란유도를 시작하였다. 또한 월경주기 제 3일에 질식 초음파검사를 시행하여 GnRH agonist에 의한 난소 낭종이 발생하였거나 난관 수종이 있는 경우를 확인하여 질식 초음파 유도하에 질식 천자를 실시하여 흡인 제거하였다. 월경주기 제 3일에 과배란유도를 시작하며, 과배란유도제는 FSH (Metrodin, Serono, Switzerland)와 hMG (Pergonal, Serono, Switzerland)를 복합 사용하였다 (ovarian stimulation phase). 과배란유도를 시작하는 날을 과배란유도 제 1일로 하고, 제 1일과 제 2일에는 오후 6시에 FSH 150 IU를 근육주사하며, 제 3일부터는 매일 오전, 오후에 각각 hMG 150 IU를 근육주사하면서 환자의 난소 반응 상태 및 혈중 E<sub>2</sub> 농도에 따라 과배란유도제 용량의 증감을 조절하였다. 과배란유도 제 6일 부터는 혈중 E<sub>2</sub> 농도와 질식 초음파검사를 시행하여 난포 성장을 관찰하였다. 여성난포 크기의 평균 직경이 18 mm 이상이거나 16 mm 이상인 난포가 3개 이상 관찰되면서 혈중 E<sub>2</sub> 농도가 계속 상승하고, 직경 10 mm 이상인 난포당 혈중 E<sub>2</sub> 농도가 300 pg/ml 이상이면 hCG (Profasi, Serono, Switzerland) 10,000 IU를 근육주사하여 배란을 유도하였다.

LH와 FSH의 혈중 농도는 단일분지계 항체 (monoclonal antibody)를 이용한 immunoradiometric assay (IRMA; Medgenix, Fleurus, Belgium)로 측정하였다. LH 측정의 민감도는 0.2 mIU/ml, intraassay coefficient of variation (CV)는 3.5-6.5%, interassay CV는 4.5-8.8% 이었으며, FSH 측정의 민감도는 0.1 mIU/ml, intraassay CV는 1.6-2.7%, interassay CV는 3.6-5.3% 이었다. E<sub>2</sub>의 혈중 농도는 방사면역측정법 (radioimmunoassay, RIA; Spectria, Orion, Finland)으로 측정하였으며, E<sub>2</sub> 측정의 민감도는 20 pg/ml, intraassay CV는 2.9-9.7%, interassay CV는 2.3-10.2%, estrone (E<sub>1</sub>)과의 교차반응도는 1.3%, estriol (E<sub>3</sub>)과의 교차반응도는 0.4% 이었다. P<sub>4</sub>의 혈중 농도는 progesterone Maia kit를 이용한 방사면역측정법 (RIA; Biodata S.p.A.,

Roma, Italy)으로 측정하였으며, P<sub>4</sub> 측정의 민감도는 0.022 ng/ml, intraassay CV는 5.7-9.0%, interassay CV는 4.6-8.2% 이었다.

질식 초음파검사는 과배란유도 주기 전 월경주기 제 3일에 처음 실시하여 골반강내의 여러 기관에 대한 이상 유무를 평가한 후 GnRH agonist 투여 시작일과 FSH/hMG 투여 시작일에 실시하며, 과배란유도 제 6일 부터는 hCG 투여 다음날 까지 매일 실시하여 성장하는 난포의 지름을 측정하였다. 오전 8시부터 오전 9시 사이에 동일한 검사자에 의해 실시하며, 질식 초음파단층촬영기는 5.0 MHz frequency의 질식 transducer가 부착된 transvaginal real-time sector scanner (Combison 310, Kretztechnik, Austria)를 사용하였다.

## 2) 정액 채취 및 정자 처리

정액의 채취는 남자채취 당일 아침에 수음으로 50 ml pyrex beaker에 무균적으로 채취하여 실온에서 30-40 분간 방치하여 액화시킨 후 기본적인 정액검사를 실시하였다. 정액의 양, 정자의 농도 및 운동성의 평가는 세계보건기구 (World Health Organization, WHO, 1992)의 규정에 따라 시행하였으며, 정자의 형태를 판정하기 위하여 Kruger 등 (1986)에 의하여 고안된 정자의 정밀 형태 분석 (strict morphology criteria)을 실시하였다. 정자의 회수를 위하여 액화된 정액을 80% percoll 5 ml가 들어있는 15 ml conical tube에 넣어 희석한 후 600G로 20분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 정자괴를 잘 풀고, 그 위에 2 ml의 수정배양액 (insemination media, IM)을 넣어 섞은 후 다시 300G로 10분간 원심분리하여 2차 세척을 실시하였다. 세척하여 얻어진 정액을 3.6mM pentoxifylline (3,7-dimethyl-1,5-oxohexylxanthine, Sigma, USA)으로 30분간 처리한 후 원심분리하여 다시 swim-up 처리한 정자를 사용하였다.

## 3) 난자 채취 및 수정

난자의 채취는 hCG 10,000 IU 근육주사 36시간 후에 질식 초음파 유도하에 질벽을 통하여 난포의 흡인 천자를 이용하여 시행하였다. 난자를 포함하고 있는 난포액을 2 ml의 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS)을 포함하고 있는 난포액 수집통에 흡인하고, 그 직후 다시 2 ml의 D-PBS용액을 사용하여 난자흡인 주사 집안에 붙어있는 난자가 없도록 재확인하였다. 난포액과

D-PBS 용액이 들은 혼합액을 즉시 배양실로 옮겨서 혼합액의 양과 색을 기록하고 배양접시 (#3002, Falcon Plastics, USA)에 옮긴 후 해부현미경 (dissecting microscope)으로 난자의 존재 여부를 확인하고, 난자의 존재가 확인되면 역반사현미경 (inverted microscope)으로 난자의 형태를 관찰하였다. 채취된 난자는 미성숙 (immature), 성숙 (mature), 과성숙 (postmature), 변성퇴화 (degenerative) 등으로 구분하였다.

Jones 등 (1982)의 방법을 이용하여 배란 직전의 성숙난자는 7.5% 신생아 제대혈청을 함유한 Ham's F-10 배양액내에서 6-8시간 추가배양을 시행하였다. 미성숙난자는 Veck 등 (1983)의 방법을 이용하여 동일한 배양액 내에서 23-35시간 추가배양하여 제 1 극체 (first polar body)가 방출된 것을 확인한 후 수정을 실시하였다.

배양액은 Ham's F-10 (Gibco #430-1200)을 이용하여 250 ml의 5차 증류수로 배양액 (4X)을 만들고, penicillin G 75 mg, streptomycin sulfate 75 mg을 추가한 후 가압여과 소독을 시행하여 4℃ 냉장고에 보관하였다. 이와 같이 제조된 배양액 (4x) 25 cc에 5차 증류수 75 cc를 첨가하고, calcium lactate 24.52 mg과 NaHCO<sub>3</sub> 210.6 mg을 추가하여 pH는 7.4, 삼투압은 280-285 mOsm/liter가 되도록하여 매 실험 직전 가압 여과 소독한 후 신생아 제대혈청의 농도가 수정배양액에서는 7.5%, 성장배양액에서는 15%가 되도록 혈청을 첨가한 후 실험에 사용하였다.

## 4) 난자의 수정 확인

수정 후 16-18시간이 경과한 후 미세피펫 (micropipette, 직경 200 μm)을 이용하여 난자 주위의 난자-난구-관상세포 복합체 (oocyte-cumulus-corona complex, OCCC)를 제거하고 각각의 난자에 2개의 전핵 (2 pronuclei, 2 PN)이 형성되었는지를 ×40, ×100, ×200의 역반사현미경으로 관찰하였다. 2 PN이 단 한개에서도 관찰되지 않은 환자의 난자는 미수정 (unfertilized) 난자로 간주하여 미세보조 수정술을 시도하였다. 이때 제 1 극체가 보존되었으며, 세포질 (cytoplasm)도 건강한지를 판정하여 실시하였다. Petri 접시 중앙 부위에 3-5 μl의 정자 세적 (sperm droplet)을 만들고, 그 주위로 25 μl 정도의 Ham's F-10 배양액 droplet를 8개 정도 만들어 내부에 난자를 1개씩 넣은 후 light weight 파라핀오일 (paraffin oil)로

덮고 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

깨끗하고 선명한 2개의 전핵이 관찰되고 내부에 핵소체를 포함하고 있을 때 정상적인 수정으로 간주하며, 만일 1 PN이 관찰되면 4시간 후에 PN 상태가 변하는지를 관찰하였다. 정상적으로 수정이 이루어진 난자만을 선별하여 성장배양액 (growth media, GM)인 15% human fetal cord serum (FCS)을 함유한 Ham's F-10 2.5 ml가 들어 있는 culture dish로 옮긴 후 24-28시간 배양하여 배아의 발달 상태, 즉 할구 (blastomeres)가 균등한지, 핵이 제거된 할구파편 (anucleate fragments)이 있는지에 따라 배아의 질적 등급 (embryo grading)을 평가하였다 (김 등, 1995).

### 5) 배아의 보조부화술 (Assisted Hatching, AH)

미세조작을 이용한 보조부화술을 위한 집게피펫 (holding pipettes) 및 투명대 절개피펫 (incision pipettes)은 유리모세관 (glass capillary tube; GD-1, Narishige)을 사용하여 만들었다. 유리모세관은 2% 7x 세척제 (detergent)에서 초음파 세척 후 다시 초순수 증류수에서 30분씩 2회 초음파 세척하고 100℃ dry-oven에서 건조 멸균한 후 사용하였다. 집게피펫은 피펫 puller를 이용하여 피펫을 가늘고 길게 뽑은 후 microforge (MF-9, Narishige)에서 자르고 불에 달구어서 (fire polishing) 내경이 30 μm, 외경이 100 μm 정도 되게 다듬어서 사용하였다. 절개피펫은 피펫 puller로 가늘고 길게 뽑은 피펫을 microforge를 이용하여 외경이 1 μm 되게 날카롭게 제조하였다.

준비된 집게피펫 및 절개피펫을 역반사현미경에 부착된 3차원 수압식 미세조작기 (micro-manipulator)의 기구버팀목 (tool holder)에 고정하고, 미세주입기 (microinjector)에 연결하였다. 피펫의 설치는 ×40 - ×100 배율하에서 집게피펫을 9시 방향, 절개피펫을 3시 방향으로 10° 정도 어긋나게 설치하였다.

투명대 절개를 위하여 60 mm Falcon dish에 mineral oil을 덮어 전배양된 10-20 μl의 성장배양액 소적에 배아를 넣었다. 집게피펫에 가벼운 음압을 가하여 배아가 움직이지 않도록 고정하고, 배아의 1시 방향에서 11시 방향으로 배아의 세포막이 상처받지 않도록 투명대를 관통하였다. 집게피펫에서 배아를 유리시킨 후 절개피펫에 끼워진 상태로 집게피펫의 모서리에 마찰시키면서 투명대를 절개하였다. 투명대가 부분적으로

절개된 배아는 신선한 성장배양액으로 옮겨 세척한 후 환자의 자궁내로 이식하였다.

### 6) 배아 이식 및 임신 확인

난할이 확인된 배아는 Jones 등 (1983)이 고안한 배아이식관 (transfer catheter)을 이용하여 등급이 좋은 배아를 최고 6개까지 환자의 자궁내로 이식하며, 여분의 배아는 냉동보존 (cryopreservation)시켰다 (문 등, 1994). 배아의 자궁내이식 후에는 최소한 4시간 정도 안정을 취하고, 난자 채취 당일부터 progesterone in oil 12.5 mg (Progest, Samil, Korea)을 임신이 확인될 때까지 계속 근육주사하여 황체기 보강을 실시하였다.

임신의 확인은 배아이식 후 제 11일에 혈중 β-hCG 농도를 확인하여 3 mIU/ml 이상이고, 1주일 후 실시한 추적검사에서 혈중 β-hCG의 상승을 보이며, 임신 제 5-6주경에 실시한 질식 초음파 검사에서 태낭 (gestational sac) 및 태아의 심장 박동이 관찰되는 경우와 임상적으로 유산이 의심되어 실시한 인공소파술에 의하여 병리조직학적으로 태아 조직이 확인된 경우를 임상적 임신으로 판정하였다. 생화학적 임신 (biochemical pregnancy)은 혈중 β-hCG 농도의 상승 후 감소를 보이는 경우로 정의하였으며, 임상적 임신의 범주에서 제외하였다. 임상적 임신으로 진단된 환자는 임신 및 분만의 결과를 추적 관찰하여 확인하였다.

β-hCG의 측정은 hCG-beta-kit (Serono Diagnostics, Switzerland & International)를 이용한 방사면역측정법 (RIA)을 사용하였으며, 측정의 민감도는 3 mIU/ml, intraassay CV는 3.1%, interassay CV는 6.0% 이었다.

### 7) 연구 결과 분석 및 통계 방법

연구 결과에 대한 통계학적 분석은 SAS 6.0 program에서의 one-way ANOVA with multiple comparisons, 2-tail Fisher's exact test 등을 이용하였으며,  $p < 0.05$ 인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 연구 결과

본 연구 기간 동안 서울대학교병원 산부인과 불임클리닉에서 체외수정술을 시행받은 불임 환자 중 본 연구의 대상이 되는 미세조작을 이용

한 보조부화술을 시행받은 환자는 총 89명, 116주기 이었다. 대상 환자들에서 체외수정시술의 적응증은 난관인자 불임증이 67명, 원인불명 불임증이 9명, 자궁내막증이 8명, 골반내 유착증이 3명, 만성 무배란에 의한 불임증이 2명 이었다 (Table 1). 대상 환자들의 배우자에서 시행되었던 정액검사 결과 정자의 수, 운동성 정자의 분포, 정자의 형태 등은 모두 정상 범위내로서 본 연구 대상 환자에서 남성인자 불임증은 없었다.

I군, 즉 과거의 체외수정시술 시행 주기에서 연속 3회 이상 임신 성립에 실패한 환자 군은 54명, 71주기 이었는데 이 중 환자의 연령이 37세 이상인 경우는 18명, 24주기, 월경주기 제 3일에 측정된 기초 혈중 FSH 농도가 15 mIU/ml 이상인 경우는 19명, 20주기 이었으며, 평균  $5.0 \pm 0.3$ 회 (3 - 14)의 체외수정시술에 실패한 기왕력이 있었다. 과거의 체외수정시술시 양질의 정상적인 배아 발달에도 불구하고 배아이식 후 착상, 즉 임신 성립에 실패한 환자 군, 즉 II군은 13명, 15주기 이었으며, 대조군으로서 상기한 특정 임상 적응증이 없이 보조부화술을 시행받은 환자 군, 즉 III군은 22명, 30주기 이었다 (Table 1).

대상 환자들의 평균 연령은 I군에서 35.1  $\pm$  3.3세 (29 - 43), II군에서 33.1  $\pm$  1.6세 (30 - 35),

III군에서 34.4  $\pm$  2.9세 (29 - 39)로서 3군 간에 통계학적으로 유의한 차이가 있었다 ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

월경주기 제 3일에 측정된 기초 혈중 FSH 농도는 I군에서 15.0  $\pm$  7.4 mIU/ml, II군에서 10.7  $\pm$  3.4 mIU/ml, III군에서 16.0  $\pm$  10.3 mIU/ml로서 3군 간에 유의한 차이가 없었다 (Table 1).

체외수정시술을 위한 과배란유도 후 채취된 난자의 수는 I군에서 9.9  $\pm$  7.1개 (1 - 38개), II군에서 11.5  $\pm$  4.5개 (2 - 20개), III군에서 7.9  $\pm$  6.4개 (1 - 24개)로서 3군 간에 통계학적으로 유의한 차이가 있었다 ( $p < 0.05$ ) (Table 2).

체외수정 및 배양 후 자궁내이식에 적합한 수정란의 발달 단계를 보여 보조부화술을 시행한 후 자궁내이식을 실시한 배아의 수는 I군에서 4.7  $\pm$  1.8개 (1 - 8), II군에서 5.3  $\pm$  1.3개 (2 - 7), III군에서 3.5  $\pm$  2.4개 (1 - 7)로서 3군 간에 유의한 차이가 있었다 ( $p < 0.05$ ) (Table 2). 자궁내이식된 배아들에서의 누적배아지수 (cumulative embryo score, CES)는 I군에서 56.8  $\pm$  30.0 (9 - 120), II군에서 76.1  $\pm$  35.9 (16 - 120), III군에서 38.5  $\pm$  29.9 (5 - 90)로서 3군 간에 유의한 차이가 있었다 ( $p < 0.001$ ) (Table 2).

배아이식 후 제 11일에 실시한 혈중  $\beta$ -hCG 농

**Table 1.** Clinical characteristics of IVF-ET patients undergoing assisted hatching (AH)

No.	Group I	Group II	Group III
Patients	54	13	22
IVF-ET cycles	71	15	30
Age of patients (yr) <sup>a</sup>			
Mean	35.1 $\pm$ 3.3	33.1 $\pm$ 1.6	34.4 $\pm$ 2.9
Range	29 - 43	30 - 35	29 - 39
Basal serum FSH (mIU/ml)	15.0 $\pm$ 7.4	10.7 $\pm$ 3.4	16.0 $\pm$ 10.3
Indications of IVF-ET	Total		
Tubal factor	67		
Unexplained	9		
Endometriosis	8		
Pelvic adhesion	3		
Chronic anovulation	2		

Mean  $\pm$  SD

Group I: Patients with previous 3 or more IVF-ET failures

Group II: Patients with implantation failure of embryos with good quality

Group III: Patients without definite indication of AH

a:  $p < 0.05$

**Table 2.** Outcomes of IVF-ET in patients undergoing assisted hatching (AH)

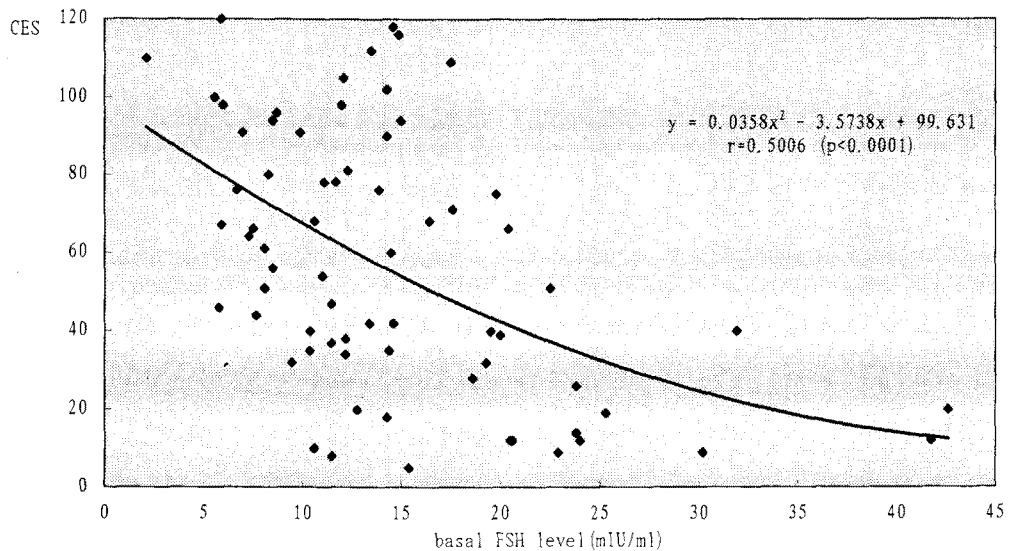
No.	Group I	Group II	Group III
Patients	54	13	22
IVF-ET cycles	71	15	30
Oocytes retrieved <sup>a</sup>			
Mean	9.9 ± 7.1	11.5 ± 4.5	7.9 ± 6.4
Range	1 - 38	2 - 20	1 - 24
Embryos transferred <sup>b</sup>			
Mean	4.7 ± 1.8	5.3 ± 1.3	3.5 ± 2.4
Range	1 - 8	2 - 7	1 - 7
Cumulative embryo score (CES) <sup>c</sup>			
Mean	56.8 ± 30.0	76.1 ± 35.9	38.5 ± 29.9
Range	9 - 120	16 - 120	5 - 90
Clinical pregnancies	9	5	2
PR/cycle (%) <sup>d</sup>	12.7 (9/71)	33.3 (5/15)	6.7 (2/30)
PR/patient (%)	16.7 (9/54)	38.5 (5/13)	9.1 (2/22)

Mean ± SD

PR: pregnancy rate

a, b, d: p < 0.05

c: p < 0.001



**Fig. 1.** Inverse correlation between basal serum FSH level and cumulative embryo score (CES).

도 측정 결과  $\beta$ -hCG의 상승을 보이고, 이후 질식 초음파검사로 자궁내 태반이 확인되어 임상적 임신으로 판정된 경우는 I군에서 9명, II군에서 5명, III군에서 2명으로서 시술주기당 임상적 임신율은

각각 12.7% (9/71), 33.3% (5/15), 6.7% (2/30) 이었 으며, 시술환자당 임상적 임신율은 각각 16.7% (9/54), 38.5% (5/13), 9.1% (2/22) 이었다 (Table 2). 시술주기당 임상적 임신율은 3군 간에 유의한

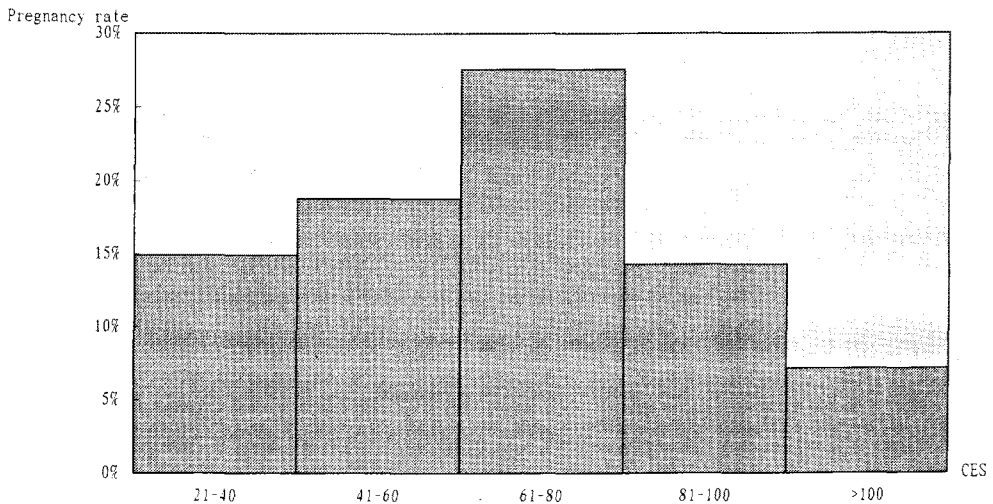


Fig. 2. Clinical pregnancy rate according to grouped cumulative embryo score (CES).

차이가 있었지만 ( $p < 0.05$ ), 시술환자당 임상적 임신율은 3군 간에 유의한 차이가 없었다.

전체 대상 환자들에서 기초 혈중 FSH 농도와 누적배아지수 (CES) 간에 상관관계를 알아보기 위하여 회귀분석 (regression analysis)을 실시한 결과 기초 혈중 FSH 농도 (x)와 누적배아지수 (y)는 회귀방정식  $y = 0.0358x^2 - 3.5738x + 99.6310$ , 상관계수 (correlation coefficient)  $r = -0.5006$ 의 역상관관계를 나타내어 기초 혈중 FSH 농도가 높을수록 누적배아지수 (CES)는 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 1).

누적배아지수 (CES)에 따른 임상적 임신율을 분석한 결과 누적배아지수 (CES)가 20 이하인 27명의 환자에서는 1예도 임신이 성립되지 않았고, 41 - 80에서 많은 예의 임신이 성립되었으며, 100 이상인 경우에는 오히려 임상적 임신율이 감소하였다 (Fig. 2).

## 고 찰

현재까지 체외수정시술 (IVF-ET) 프로그램에 있어서 일반적인 불임 부부의 경우 난자의 수정율은 약 80 - 90%에 이르고 있으나 수정후 체외배양하여 정상적으로 발달된 배아를 자궁내로 이식하였을 때 임신율은 20% - 30% 정도로 보고되고 있으며, 한개의 배아가 자궁내막에 착상될 수 있는 착상율은 10% - 15%에 그치고 있는 실정으로서 결과적으로 대다수의 배아는 자궁내막

착상에 실패하는 것이 된다. Cohen 등 (1989a)은 체외수정시술시 배아의 자궁내막 착상율은 과배란유도 주기에서 12%, 자연배란 주기에서 16%를 넘지 못한다고 보고하였고, 이는 결국 자연적인 주기당 임신율인 25%와 비교할 때 상대적으로 훨씬 낮은 결과이다. 이에 따라 배아의 착상율을 증진시키기 위한 많은 노력이 지속적으로 있어 왔으며, 여기에는 과배란유도 주기에서 난포 성장의 극대화 (Chang *et al.*, 1990 & 1994; 김 등, 1995 & 1996), 체외배양 조건의 개선 (Bongso *et al.*, 1990 & 1991), 미세조작을 이용한 미세보조수정술 (microassisted fertilization, MAF) (Cohen *et al.*, 1992a & 1992b) 등이 포함되게 되었고, 더불어 배아의 자궁내막 착상에 관한 생식생리학적 연구의 중요성이 심각하게 대두되게 되었다.

인간을 포함한 포유류의 난자는 glycoprotein으로 구성된 투명대로 둘러싸여 있으며 (Bleil & Wassarman, 1980a & 1980b; Wassarman, 1988), 정상적인 수정을 위하여 정자는 우선적으로 투명대를 통과하여 난황막과 융합하는 과정을 거쳐야만 한다. 수정 후 배아는 투명대가 경화되는 생리학적 과정인 투명대 반응 (zona reaction)을 개시하는데 이러한 기전에 의하여 다정자 침입증 (polyspermy)이 방지되며 (Austin, 1961), 배아의 정상적인 발달을 위한 보호 작용이 이루어지고 (Gwatkin, 1977), 난관내 이동시 배아의 손상을 막아준다 (Bleil & Wassarman, 1986; Bleil *et al.*, 1988). 투명대는 난관내에서 배아의 자유로



은 이동을 원활하게 하는데 필수적인 구조로 알려져 있으며, 생쥐의 경우 인공적인 보조부화술 시 투명대에 생긴 홈 (breach)의 크기가 이식된 배아의 운명을 좌우하게 된다는 보고도 있다 (Nicholas *et al.*, 1989).

정상적인 수정이 이루어진 난자는 할구 분할, 즉 난할 (cleavage)이 이루어지며, 약 3일 후 8-세포기에 도달한다. 이 시기 이후 느슨하게 결합되어 있던 할구들은 구조적으로 단단한 결합 (tight junction)을 하여 배아의 통합력을 유지하면서 발달하게 된다 (Edwards, 1964). 따라서 수정 후 초기의 배아 발달에 있어서는 투명대가 배아의 구조적 형태 유지에 중요한 역할을 수행하지만 착상에 이르는 시기가 되면 할구들의 치밀한 결합으로 배아 발달에 있어서 투명대에 대한 의존력이 떨어지게 된다. 투명대의 또 다른 역할은 배아의 면역세포 (immune cell)에 대한 보호기능으로서 연구 결과에 따라 미세조직에 의하여 투명대가 절개된 배아를 자궁내 이식한 경우에 있어 초기에 면역억제제를 투여받은 여성에서 배아의 착상율이 증가됨이 보고되었다.

착상 이전의 배아와 자궁내막에 대한 분자생물학적 지식의 축적으로 착상 과정 중 배아가 자궁내막에 달라붙게 되는 현상 (attachment) 등에 관하여 많은 사실들이 규명되게 되었다. 수정 이후 배아는 착상에 대비한 준비 과정으로서 난할을 하게 되는데 이러한 약 1주일에 걸친 착상 이전 기간 (preimplantation period)은 trophoectoderm으로의 분화를 허용하기 위한 배아의 초기 성장 기간이며, 이는 진화적인 적응 기간이 된다. 배아의 연속적인 난할을 거쳐서 포배 (blastocyst) 시기에는 inner cell mass (ICM)와 trophoectoderm을 충분히 형성할 수 있도록 많은 세포를 생성하여야만 하며, 불충분한 세포의 증식은 배아가 계속적인 분화와 나아가 생존을 유지하는데 있어서 위협을 줄 수 있다. 착상 이전의 분화는 배아 자체의 내재적인 시계에 맞추어져 있으므로 배아내 세포의 수에 관계없이 특정한 시기에 포배를 형성한다. 따라서 일부 배아는 내부의 세포가 적절한 난할을 하여 100개 이상의 세포를 가지기도 하지만 10-20개 세포만을 지닌 포배를 형성한 배아는 결국 정상적인 분화와 착상을 하지 못하는 운명이 된다 (Edwards, 1994).

이와 같이 발달된 배아는 수정 후 5일경에 ICM를 이루며, 7일경에 팽창하면서 투명대 밖으

로 배아가 탈출하는 부화 (hatching) 현상이 일어나게 된다. 인간에서 부화 효소 (hatching enzyme)의 성상은 아직 밝혀지지 않았고, 죽은 세포나 세포질 절편 (cytoplasmic fragments), 정자들이 부화 후 투명대에 남게된다. 수정 후 5-8일경에는 배아가 estrogen을 생성하는데 이는 hCG의 생성과 같이 시작되어 국소적으로 자궁내막 기질에 작용하며, 이외에도 성장인자, cytokine, adhesion molecules 등의 여러 국소적 인자가 생성되어 배아 스스로 착상을 조절하는 여러 신호를 모체에게 보낼 것으로 추측된다 (Edgar *et al.*, 1993; Edgar, 1995).

착상을 위한 자궁내막에서의 준비 과정은 먼저 자궁강 내액이 배출되면서 시작되는데 이는 황체호르몬 의존성 pinopode에 의한 기능이며, 배아와 자궁내막이 서로 근접하여 접촉하기 쉽도록 하여 준다. Pinopode는 월경주기 제 19일에서 제 21일 사이 약 2-3일 동안만 자궁내막 상피 세포에서 생겨나는 것으로서 estrogen에 의하여 억제된다 (Nikas *et al.*, 1995). 이러한 자궁강 내액의 흡수와 pinopode의 작용은 일정한 착상 기간 (implantation window)을 형성하는데 중요한 역할을 할 것으로 추론되고 있지만 아직 확실하지는 않은 상태이다.

포배로 발달된 배아는 주기적인 수축 및 팽창 과정을 겪게 되며 (Cole, 1967), 팽창 과정 중 투명대가 얇아지고, 내인성 (embryonic) 및 외인성 (uterine) lysins의 작용에 의하여 부화된다 (McLaren, 1970). 체외수정시술시 수정된 배아는 체외 배양시 25-30% 미만에서만 부화 과정을 거친다고 알려져 있으며 (Fehilly *et al.*, 1985; Dokras *et al.*, 1991), 따라서 자궁내로 이식된 배아가 체내에서도 유사한 정도로 부화된다면 체외수정시술시 배아의 자궁내막 착상율은 매우 낮아지게 된다. 체외수정시술시 이와 같은 배아의 낮은 착상율에 대한 가능한 원인으로서는 배아 자체의 유전학적, 형태학적 결함, 배아의 자궁내이식 과정에서의 물리적 손상 등을 모두 고려하여 볼 수 있지만 궁극적으로는 체외수정된 배아의 부화 실패가 배아의 자궁내막 착상 실패의 주요한 원인으로 작용할 수 있다.

한편 체외수정 이후 배아 소실의 원인 중 상당수는 유전학적 원인으로서는 가장 흔하게 유전자 이상이 발견되는 X, Y, 13번, 16번, 18번, 21번 염색체에서 multi-probe를 이용한 FISH (fluores-

cence in situ hybridization) 방법으로 배아이식 이전에 배아의 유전자 이상을 연구한 보고가 있다. 이때 배아의 mitotic error, 혹은 meiotic error의 빈도를 비교하면 성장이 정지된 배아의 경우 70%에서, 발달이 순조로운 배아의 경우 40%에서 유전자 이상을 나타내었다. 따라서 40세 미만의 여성에서 정상적으로 발달하는 배아의 50-55%만이 정상 염색체를 지니고 있을 가능성이 있으며 (Cohen *et al.*, 1996), 이러한 배아들에서 착상을 도우려는 보조부화술은 여러 측면에서 장점과 단점이 혼재되므로 시술 적응증이 되는 대상 배아의 선택이 매우 중요하다.

일반적으로 배아에서의 부화 실패는 여러 요인에 의하여 영향을 받게 되는데 노화된 난자의 투명대 경화 (zona hardening)와 부적절한 체외배양 조건이 그 원인으로 인지되고 있다 (DeFelice *et al.*, 1982; Cohen *et al.*, 1989a). Dokras 등 (1991)은 부화에 실패한 포배가 투명대내에서 14일까지 계속 발달하면서 상당한 양의 hCG를 분비하였다고 보고하였으며, 이러한 연구 결과 등에 따라 체외수정시술시 투명대에 인위적으로 절개를 가하여 배아의 부화를 도와주는 보조부화술 (assisted hatching, AH)의 임상적 유용성이 대두되었다. Cohen 등 (1988)은 남성인자 불임환자에서 투명대 부분 절개술 (partial zona dissection, PZD)을 이용하여 난자의 수정율을 높였는데 대조군과 비교하여 PZD와 같은 미세조작을 시행받은 배아에서 포배의 팽창기에 투명대의 thinning 현상이 없이 상대적으로 조기에 부화 현상이 일어남을 관찰하였다. 조기에 부화가 되면 배아가 자궁내막 환경에 접촉되면서 적절한 배아 발달을 유도할 수 있게 되어 배아와 자궁내막 간의 조화 (synchronization)를 조기부터 이룬다는 보고도 있으며 (Liu *et al.*, 1993), 이는 황체기에 여러 호르몬의 측정으로 밝혀졌다.

미세조작을 실시하지 않은 고식적인 체외수정시술시에도 투명대가 얇은 배아에서 두꺼운 투명대를 지닌 배아에 비하여 상대적으로 착상율이 높다는 것이 밝혀짐에 따라 (Wright *et al.*, 1990) 체외수정시술시 배아의 자궁내막 착상율을 높이기 위한 보조부화술이 임상에 도입되기 시작하였으며 (Cohen *et al.*, 1990; Tucker *et al.*, 1991a & 1991b), 이후 보조부화술 분야에서 많은 발전이 있어 왔다.

보조부화술은 1989년 Cohen 등이 최초로 고안

한 방법으로 부분적으로 투명대를 절개 (PZD)하여 배아의 부화를 도와주려는 목적으로 시도되었으며, 이때 환자들은 면역세포의 침입이나 세포독 (cytotoxin)의 분비를 막기 위하여 항생제와 corticosteroid를 동시에 투여하였다 (Cohen *et al.*, 1989b). 보조부화술의 기술로는 현재까지 3가지 방법이 대표적으로 이용되고 있다. 첫번째 방법은 날카로운 피펫으로 투명대를 부분적으로 절개하여 주는 PZD 방법이다 (Cohen *et al.*, 1989b). 이 방법은 상기한 바와 같이 남성인자 불임환자에 있어 난자의 수정율을 증가시켜 주는 방법으로 고안되었다. 동물 실험을 통하여 투명대의 절개 부분이 작을 경우 부화 과정의 완료에 있어 부적절함이 밝혀짐으로써 절개 부위의 크기에 따른 문제점을 지니고 있다. 두번째 방법은 acid Tyrode's solution을 이용하여 투명대에 직접 구멍을 뚫어 주는 방법 (zona drilling)이다 (Gordon & Talansky, 1986). 이 방법 역시 초기에는 남성인자 불임환자에 있어 난자의 수정을 증진을 위하여 개발되었다. 그러나 난자의 수정을 위한 방법으로는 초기 미수정란의 산성 용액에 의한 손상으로 인하여 배아 발달의 저해 현상이 나타나 유용한 방법이 아니었으나 (Gordon *et al.*, 1988; Maltzer & Cohen, 1989) 수정 후 발달이 진행된 배아에 있어서는 여러 할구의 존재로 인하여 산성 용액의 효과에 대한 저항력이 높아지므로 8-세포기 이상의 배아에 있어서는 유용한 방법으로 알려져 있다. 세번째 방법은 acid Tyrode's solution을 이용하여 투명대를 얇게하여 주는 방법 (zona thinning)이다 (Khalifa *et al.*, 1992; Gordon & Dapunt, 1993). 생쥐 실험을 통하여 유용성이 보고되었으며, 인간에 있어서는 적용 단계의 방법으로 투명대를 완전히 뚫어주지 않고 x자형으로 얇게함으로써 (cruciate thinning) 직접적인 산성 용액에 대한 노출이 방지되는 장점을 지니고 있다. 이 방법은 할구간 구조적으로 단단한 결합이 이루어지는 8-세포기 이후에 유용한 방법이라고 사료된다. 최근 laser가 의학 분야에 응용되기 시작하면서 Welch 등 (1991)이 laser를 이용한 미세 보조 수정술을 시도한 이후 많은 연구가 진행되어 laser를 이용한 보조부화술로서 착상율 및 임신율의 증진이 보고된 바 있다 (Strohmer & Feichtinger, 1992a & 1992b; Obruca *et al.*, 1994).

한편 보조부화술시 배아에서 할구의 분할이 지속적으로 이루어지는 시기에 투명대에 절개를

가하는 것이 배아 발달에 악영향을 미칠 수도 있다는 이론이 제시된 바 있다. 배아에서 투명대의 발달은 미생물이나 면역세포의 침입으로부터 배아를 보호하는 효과를 지니고 있는데 생쥐 실험에서 이러한 투명대의 절개가 배아이식 후 배아의 발달에 악영향을 미쳤다는 보고가 있다 (Nicholas & Gardner, 1989). 또한 포배가 팽창됨과 더불어 투명대가 얇아지는 현상이 관찰되지 않았으며 (Malter & Cohen, 1989), 따라서 투명대가 전체적으로 계속 두꺼운 상태로 유지되어 오히려 착상 실패의 확률이 높아질 수 있었고 (Garrisi *et al.*, 1990), 배아이식시 할구, 혹은 배아 전체가 이러한 투명대의 절개 사이로 빠져나와 (Nicholas & Gardner, 1989; Cohen *et al.*, 1990) blighted ovum의 형성을 유발할 수 있었다고 보고된 바 있다 (Malter & Cohen, 1989). 최근 일관성 쌍태아의 발생 빈도가 미세보조수정술, 보조부화술 등과 같이 투명대를 미세조작한 경우 높게 나타난다는 보고도 있다 (Nijs *et al.*, 1993; Alikani *et al.*, 1994). Acid Tyrode's solution을 이용할 경우에도 배아가 산성 용액에 노출됨으로써 악영향을 받을 수도 있다 (Gordon *et al.*, 1988; Malter & Cohen, 1989). 반면에 Dokras 등 (1994)은 PZD와 유사한 방법으로 보조부화술을 실시하여 배아의 손상이나 포배의 발달에 좋지 않은 영향이 없었다고 보고하였으며, Khalifa 등 (1992)은 생쥐의 배아를 이용하여 투명대에 cruciate thinning을 시도하여 좋은 결과를 얻었다고 보고하였다. 이와 같이 투명대에 미세조작을 가하는 보조부화술의 다양한 시술 방법과 이에 따른 효과가 활발하게 연구되어 왔다.

체외수정시술시 대상 환자에서 다수의 실패 기왕력을 지니고 있는 경우, 환자의 연령이 많은 경우, 월경주기 제 3일에 측정된 기초 혈중 FSH의 농도가 높은 경우 등에서는 시술 후 임신 예후가 불량할 것으로 예측할 수 있다. 이와 같은 예에서 가능한 기전을 고려할 때 결국 노화된 난소에서 생성 발달된 난자의 투명대 형성에 있어서 이상이 발생할 수 있기 때문일 것으로 인지되고 있다 (Drobris *et al.*, 1988). 이러한 환자군에서는 부적절한 체외배양 조건에 더 민감한 난자를 생성함으로써 투명대의 경화를 더 유발할 수 있고 (Dokras *et al.*, 1991), 자연적인 부화 과정에 필요한 에너지가 노화된 난자에서 더 부족할 수 있으므로 이러한 경우 보조부화술은 투명대 경화

등과 같은 물리적인 장애를 제거할 수 있을 뿐만 아니라 자연적인 부화 과정에 필요한 에너지를 감소시켜 줄 수 있다는 것 (Schoolcraft *et al.*, 1994) 등이 배아를 대상으로 보조부화술을 시행하면 배아의 착상과 임신 성립에 도움이 될 수 있다는 이론적 근거가 될 수 있다.

Cohen 등 (1990)은 체외수정시술시 보조부화술로서 PZD 시술을 비교한 결과 난자 채취 후 3일째 배아에서 PZD를 실시한 군에서 착상율이 22%로서 대조군의 13%에 비하여 상대적으로 높게 나타났으며, PZD군에서 임신된 예의 50%에서 쌍태아 및 삼태아 이었다고 보고하였다. 그러나 추후의 연구 보고에서는 PZD군에서 7%의 착상율을 나타내어 대조군에 비하여 낮은 성적을 보였으며, zona drilling 시술을 이용한 연구 보고에서도 시술군에서 28%, 대조군에서 22%의 착상율을 보고하기도 하였다. 또한 이들은 보조부화술을 시술하지 않았을 때 두꺼운 투명대를 지니며 할구 분할이 늦은 배아 (poor prognosis embryo)에서는 배아의 착상이 거의 유도되지 않았으나 얇은 투명대를 지니며 할구 분할이 빠르게 일어나는 배아 (good prognosis embryo)에서는 높은 착상율을 나타내는 현상에 착안한 연구에서 poor prognosis embryo에서 zona drilling 시술을 시행한 군에서는 31%의 착상율, 비시술군에서는 14%의 착상율을 나타내어 보조부화술의 유용성을 증명한 반면에 good prognosis embryo에서는 미세조작에 의하여 조기 부화 현상이 일어나 배아 손상에 의하여 착상율이 낮게 나타나므로 모든 배아가 미세조작을 이용한 보조부화술의 시술 대상이 되는 것은 아니라고 보고한 바 있다. 또한 Cohen 등 (1993)에 의하여 투명대의 두께를 기준으로 17  $\mu\text{m}$  이상인 경우에는 높은 착상율을 기대하기 어려우므로 보조부화술을 시행하고, 12  $\mu\text{m}$  이하인 경우에는 시술 자체에 따른 배아에 대한 악영향을 배제할 수 없으므로 시행하지 않는 것이 좋다는 보고도 제시된 바 있다.

최근 부분적으로 퇴화 현상이 일어난 배아는 착상율이 낮으므로 이에 대한 구제 방법으로 세포질의 퇴화로 형성된 절편을 미세조작으로 제거하면서 보조부화술을 시행한 배아에서 비시행군에 비하여 높은 부화율 (72% vs 34%)을 나타내는 생쥐 model이 제시되었다 (Alikani *et al.*, 1993). 이러한 배아의 구제 효과에 대한 보조부화술 연구는 인간에서도 현재 진행 중으로 Cohen

등 (1996)은 세포질내 절편의 제거로 4%의 착상을 상승이 있었으며, 절편이 배아내에서 20% 이상 차지한 경우에 더욱 구제 효과가 크다고 보고하였다.

본 연구에서 연속적인 체외수정시술 실패 환자와 배아 발달은 잘 되었으나 착상에 실패하였던 환자 모두에서 만족할만한 임상적 임신율의 상승이 관찰되었다. 특히 기초 혈중 FSH 농도와 배아의 질을 반영하는 누적배아지수 (CES) 간에는 유의한 역상관계가 존재하여 기초 혈중 FSH 농도가 낮을수록 누적배아지수가 높았으며, 누적배아지수가 20 미만인 경우에는 임상적 임신 예가 1예도 없었다. II군에서 I군에 비하여 기초 혈중 FSH 농도가 유의하게 낮았고, 누적배아지수는 유의하게 높았으며, 임상적 임신율도 유의하게 높았다. 이와 같은 연구 결과는 2가지의 가능성을 제시할 수 있는데 보조부화술 자체로 배아의 착상을 및 임신율이 유의하게 상승되었거나, 혹은 양질의 배아인 경우 배아 자체가 지니고 있는 양호한 착상 능력이 함께 포함되어 자궁내이식 후 인지되지 않는 배아의 손실을 줄일 수 있기 때문에 결과적으로 임신율의 상승을 유발하였을 가능성이 있다. 한편 III군 22명 (30주기)의 경우에는 특이한 임상 적응증이 없이 환자의 동의하에 보조부화술을 시행하였는데 기존에 연구 보고된 선택적 보조부화술의 적응증이 있었던 경우, 즉 I군에 비하여 환자의 평균 연령이 낮았음에도 불구하고 임상적 임신율이 낮은 것으로 미루어 보아 적절한 임상 적응증을 가지고 체외수정시술시 보조부화술을 시술하여야 할 것으로 사료되었다.

본 연구 결과는 체외수정시술 프로그램에서 배아의 보조부화술 (AH) 시행시 합리적인 대상 환자의 선정, 적절한 시술 방법 및 시술 시기의 결정 등에 관한 제반 문제점에 대한 해결책을 제시할 수 있을 것으로 사료되며, 더불어 배아 착상 과정의 생식생리학적 연구에 있어서 좋은 임상 자료를 제공할 수 있을 것으로 기대된다. 특히 체외수정시술시 기존의 선택적인 보조부화술의 적응증 환자들은 물론 과거의 체외수정시술 시행 주기에서 체외수정 후 정상 발달을 보인 배아의 자궁내이식 후에도 임신에 실패하였거나 투명대 이상의 원인 등으로 착상 및 임신의 실패가 예상되는 불임환자의 체외수정시술시 배아의 착상을 및 임신율을 향상시킬 수 있을 것으로 사

료된다. 결론적으로 배아의 보조부화술은 불임 환자의 체외수정시술시 야기를 갖게 할 수 있는 기회를 증진시킬 수 있는 결정적인 계기를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

1995년 1월부터 1996년 2월까지 서울대학교병원 산부인과 불임클리닉에서 체외수정시술 시행시 미세조작을 이용한 보조부화술 (AH)을 시술 받은 환자 89명 (116주기)을 연구 대상으로 하여 과거의 체외수정시술 시행 주기에서 3회 이상 임신 성립에 실패한 I군 54명 (71주기), 과거의 체외수정시술시 정상적인 배아 발달을 보였으나 임신 성립에 실패한 II군 13명 (15주기), 대조군으로서 특별한 적응증이 없이 보조부화술을 시행받은 III군 22명 (30주기)으로 대별하여 보조부화술 시술 결과를 상호 비교 분석한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 전체 대상 환자에서 체외수정시술의 적응증은 난관인자 불임증이 67명, 원인불명 불임증이 9명, 자궁내막증이 8명, 골반내 유착증이 3명, 만성 무배란에 의한 불임증이 2명 이었으며, 남성인자 불임증은 없었다.

2. 보조부화술 시술 환자의 평균 연령은 I군에서  $35.1 \pm 3.3$ 세, II군에서  $33.1 \pm 1.6$ 세, III군에서  $34.4 \pm 2.9$ 세로서 3군 간에 유의한 차이가 있었다.

3. 월경주기 제 3일에 측정된 기초 혈중 FSH 농도는 3군에서 각각  $15.0 \pm 7.4$  mIU/ml,  $10.7 \pm 3.4$  mIU/ml,  $16.0 \pm 10.3$  mIU/ml로서 유의한 차이가 없었다.

4. 과배란유도 후 채취된 난자의 수는 3군에서 각각  $9.9 \pm 7.1$ 개,  $11.5 \pm 4.5$ 개,  $7.9 \pm 6.4$ 개로서 유의한 차이가 있었다.

5. 자궁내이식을 실시한 배아의 수는 3군에서 각각  $4.7 \pm 1.8$ 개,  $5.3 \pm 1.3$ 개,  $3.5 \pm 2.4$ 개로서 유의한 차이가 있었다.

6. 자궁내이식된 배아들의 누적배아지수 (CES)는 3군에서 각각  $56.8 \pm 30.0$ ,  $76.1 \pm 35.9$ ,  $38.5 \pm 29.9$ 로서 유의한 차이가 있었다.

7. 배아이식 후 임상적 임신으로 판정된 경우는 I군에서 9명, II군에서 5명, III군에서 2명으로서 시술주기당 임상적 임신율은 각각 12.7% (9/71), 33.3% (5/15), 6.7% (2/30), 시술환자당 임상적

임신율은 각각 16.7% (9/54), 38.5% (5/13), 9.1% (2/22) 이었다. 시술주기당 임상적 임신율은 3군 간에 유의한 차이가 있었지만, 시술환자당 임상적 임신율은 유의한 차이가 없었다.

8. 전체 대상 환자에서 기초 혈중 FSH 농도와 누적배아지수 (CES) 간에 회귀분석을 실시한 결과 역상관관계를 나타내어 기초 혈중 FSH 농도가 높을수록 누적배아지수 (CES)는 유의하게 감소하였다.

9. 누적배아지수 (CES)에 따른 임상적 임신율을 분석한 결과 누적배아지수(CES)가 20 이하인 27명에서는 임신이 성립되지 않았고, 40 - 80에서 많은 예외 임신이 성립되었으며, 100 이상인 경우에는 임상적 임신율이 감소하였다.

본 연구 결과 미세조작, 즉 투명대 부분 절개술 (PZD)을 이용한 합리적인 배아의 보조부화술 (AH)이 개발 확립되었으며, 과거 체외수정시술 주기에서 배아이식 후 반복하여 임신에 실패하였거나 투명대 이상의 원인 등으로 인하여 체외수정시술시 고식적인 배아이식 방법으로는 착상 및 임신의 실패가 예상되는 불임환자에서 보조부화술의 체외수정시술에 있어서의 임상적 유용성을 확인할 수 있었다.

## 인 용 문 헌

김 석현, 이 재훈, 서 창석, 최 영민, 신 창재, 김정구, 문 신용, 장 윤석, 이 진용: 난관인자 불임환자에서의 체외수정시술: 난관수종의 영향. 대한산부회지 1996, 39(6), 1067-1077, 1996.

김 석현, 지 병철, 정 경남, 김 희선, 류 범용, 오 선경, 문 신용, 이 진용, 장 윤석: 체외수정시술시 다태임신의 예방에 관한 연구: 배아 등급과 누적배아지수의 의의. 대한산부회지 1995, 38(12), 2333-2346.

문 신용, 김 정훈, 김 석현, 최 영민, 신 창재, 김정구, 이 진용, 장 윤석: 인간 배아의 동결보존에 관한 연구. 대한불임학회지 1994, 21(2), 137-147.

Alikani M, Olivennes F, Cohen J: Microsurgical correction of partially degenerate mouse embryos promotes hatching and restores their viability. *Hum Reprod* 1993, 8, 1723-1728.

Alikani M, Noyes N, Cohen J, Rozenwks Z:

Monozygotic twinning in the human is associated with the zona pellucida architecture. *Hum Reprod* 1994, 9, 1328-1321.

Austin CR. The mammalian egg. Oxford: Blackwell Scientific Publication. 1961, 89-90.

Bleil JD, Greve JM, Wassarman PM: Identification of secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding acrosome-reacted sperm. *Dev Biol* 1988, 128, 376-385.

Bleil JD, Wassarman PM: Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* 1980a, 76, 185-202.

Bleil JD, Wassarman PM: Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 1980b, 20, 873-882.

Bleil JD, Wassarman PM: Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J Cell Biol* 1986, 102, 1363-1371.

Bongso A, Ng SC, Fong CY, Ratnam S: Co-culture: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil Steril* 1991, 56, 179-191.

Bongso A, Ng SC, Ratnam S: Co-culture: their relevance to assisted reproduction. *Hum Reprod* 1990, 5, 893-900.

Chang YS, Kim CH, Kim SH, Shin CJ, Kim JG, Moon SY, Lee JY: Use of GnRH Agonist in IVF Program. In: Mori T, Tominaga T, Aono T, Hiroi M, eds. *Frontiers in Endocrinology: Perspectives on Assisted Reproduction*(Vol. 4). Ares-Serono Symposia Publications, 1994, 285-291.

Chang YS, Kim SH, Shin CJ, Kim JG, Moon SY, Lee JY: The Efficacy of a Combination Administration of Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist and Gonadotropins for Controlled Ovarian Hyperstimulation in IVF Program. *Asia-Oceania J Obstet Gynecol* 1990, 16(3), 337-345.

Cohen J: A review of clinical microsurgical fertilization. In: Cohen J, Malter HE, Talansky BE, Glifo J, eds. *Micromanipulation of human*

- gametes and embryos. New York: Raven Press, 1992a, 163-190.
- Cohen J: Assisted hatching. *J Assist Reprod Genet* 1993, 10, 52.
- Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z: Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* 1992b, 7, 685-691.
- Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter HJ, Massey J, Mayer MP, et al: Impairment of the hatching process following IVF in human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum Reprod* 1990, 5, 7-13.
- Cohen J, Inge KL, Suzman M, Wiker SR, Wright G: Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989a, 51, 820-827.
- Cohen J, Malter HE, Fehilly C, Wright G, Elsner CW, Kort HI, Massey JB: Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. *Lancet* 1988, 2, 162.
- Cohen J, Malter HE, Wright G, Kort HI, Massey JB, Mitchell D: Partial zona dissection of human oocytes when failure of zona pellucida penetration is anticipated. *Hum Reprod* 1989b, 4, 435-442.
- Cohen J, Munne S, Palermo GD: Microsurgery in preimplantation embryology In: Adashi EY, John AR, Rosenwaks Z, eds. Reproductive endocrinology, surgery, and technology. New York: Lippincott-Raven Publishers, 1996, 2367-2383.
- Cole RJ: Cinemicrographic observation on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *J Embryol Exp Morphol* 1967, 17, 481-490.
- DeFelice M, Salustri 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.
- Dokras A, Sargent IL, Ross C, Barlow DH, Gosden B: Micromanipulation of human embryos to assist hatching. *Fertil Steril* 1994, 61, 514-520.
- Dokras A, Sargent IL, Ross C, Gardner RL, Barlow DH: The human blastocyst: morphology and human chorionic gonadotropin secretion in vitro. *Hum Reprod* 1991, 6, 1143-1151.
- Drobris EZ, Andrews JB, Kotz DF: Biophysical properties of the zona pellucida measured by capillary suction: is zona hardening a mechanical phenomenon? *J Exp Zool* 1988, 245, 206-219.
- Edgar DH: Oestrogen and human implantation. *Hum Reprod* 1995, 10, 2-3.
- Edgar DH, James GB, Mills JA: Steroid secretion by early human embryos in culture. *Hum Reprod* 1993, 8, 277-278.
- Edwards RG: Cleavage of one- and two-celled rabbit eggs in vitro after removal of zona pellucida. *J Reprod Fertil* 1964, 7, 413-415.
- Edwards RG: Implantation, contraception and interception. *Hum Reprod* 1994, 9, 985-989.
- Fehilly CB, Cohen J, Simons RF, Fishel SB, Edwards RG: Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human: a comparative study. *Fertil Steril* 1985, 44, 638-644.
- Garrisi G, Talansky BE, Grunfeld L, Sapira V, Navot D, Gordon JW: Clinical evaluation of three approaches to micromanipulation assisted fertilization. *Fertil Steril* 1990, S4, 671-677.
- Gordon JW, Dapunt U: Restoration of normal implantation rates in mouse embryos with a hatching impairment by use of a new method of assisted hatching. *Fertil Steril* 1993, 59, 1302-1307.
- Gordon JW, Grunfeld L, Garrisi GJ, Talansky BE, Richards C, Laufer N: Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. *Fertil Steril* 1988, 50, 68-70.
- Gordon JW, Talansky BE: Assisted fertilization by zona drilling: a mouse model for correction of oligospermia. *J Exp Zool* 1986, 239, 347-354.
- Gwatkin RBL: Fertilization mechanisms in man and mammals. New York: Plenum Press, 1977, 91-108.

- Jones HW Jr, Acosta AA, Garcia JE, Sandow BA, Veeck L: On the transfer of conceptus from oocytes fertilized in vitro. *Fertil Steril* 1983, 39, 241.
- Jones HW Jr, Jones GS, Andrews MC, Acosta A, Bundren C, Garcia J, Sandow B, Veeck L, Wikes C, Witmyer J, Wortham JE, Wright GL: The program for in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 1982, 38, 14.
- Khalifa E, Tucker M, Hunt P: Cruciate thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse. *Hum Reprod* 1992, 7, 532-536.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, Van der Merwe JP, Van Zyl JA, Smith K: Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986, 46, 1118-1123.
- Liu HC, Cohen J, Alikani M, Noyes N, Rosenwaks Z: Assisted hatching facilitates earlier implantation. *Fertil Steril* 1993, 60, 871-875.
- Malter HE, Cohen J: Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 1989, 51, 139-148.
- McLaren A: The fate of the zona pellucida in mice. *J Embryol Exp Morphol* 1970, 23, 1-19.
- Nicholas J, Gardner RL: Effect of damage to the zona pellucida on development of preimplantation embryos in the mouse. *Hum Reprod* 1989, 4, 180-187.
- Nijs M, Vanderzwalmen P, Segal Bertin G, Gerts L, Van Roosendaal E, Segal L, Schoysman-Deboeckk A, Schoysman R: A monozygotic twin pregnancy after application of zona rubbing on a frozen-thawed blastocyst. *Hum Reprod* 1993, 8, 127-129.
- Nikas G, Dakakis P, Loutdis D, Mara-Skoufari C, Koumantakis E, Michalakis S, Psychoyos A: Uterine pinopodes as markers of the nidation window in cyclic women receiving exogenous oestradiol and progesterone. *Hum Reprod* 1995, 10, 1208-1213.
- Obruca A, Strohmer H, Sakkas D, Menezo Y, Kosowski A, et al: Use of lasers in assisted fertilization and hatching. *Hum Reprod* 1994, 9, 1723-1726.
- Schoolcraft WB, Jones GS, Schlenker T, Jones HW, Gee M: Assisted hatching in the treatment of poor prognosis in vitro fertilization candidates. *Fertil Steril* 1994, 62, 551-554.
- Strohmer H, Feichtinger W: Application of laser for micromanipulation: relevance of biophysical criteria. *Fertil Steril* 1992a, 48, 540.
- Strohmer H, Feichtinger W: Successful clinical application of laser for micromanipulation in in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1992b, 58, 212-214.
- Tucker MJ, Bishop FM, Cohen J, Wiker SR, Wright G: Routine application of partial zona dissection for male factor infertility. *Hum Reprod* 1991a, 6, 676-681.
- Tucker MJ, Cohen J, Massey JB, Mayer MP, Shron R, Wiker BS, Wright G: Partial dissection of the zona pellucida of frozen-thawed human embryo may enhance blastocyst hatching, implantation, and pregnancy rates. *Am J Obstet Gynecol* 1991b, 165, 341-345.
- Veeck LL, Wortham JWE Jr, Witmyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JE, Jones GS, Jones HW Jr: Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983, 39, 594.
- Wassarman PM: Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* 1988, 57, 415-442.
- Welch AJ, Motamedi M, Rastegar S, Le Carpentier, GL, Jansen D: Laser thermal ablation. *Photochem Photobiol* 1991, 53, 815-823.
- Wright G, Wiker S, Elsner C, Kort H, Massey J, Mitchell D, et al: Observation on the morphology of human zygotes and implications for cryopreservation. *Hum Reprod* 1990, 5, 109-115.
- World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.