

## 난자채취 2일과 5일에 연속으로 실시한 배아이식의 안전성과 효과\*

경북대학교병원 산부인과학교실<sup>1</sup> · 대구대학교 축산학과<sup>2</sup>

박기상<sup>1,2</sup> · 송해범<sup>2</sup> · 이택후<sup>1</sup> · 전상식<sup>1</sup>

### Subsequent Embryo Transfers (SET) on Day 2 and Day 5: It's Safety and Effectiveness\*

Kee Sang Park<sup>1,2</sup>, Hai Bum Song<sup>2</sup>, Taek Hoo Lee<sup>1</sup>, Sang Sik Chun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Kyungpook National University Hospital, Taegu,

<sup>2</sup>Department of Animal Science, Teagu University, Kyungbuk, Korea

**Objective:** *In vitro* fertilization (IVF) and a prolonging the time of culture may be helpful in establishing a viable pregnancy through a selection effect. Some embryos do not develop beyond the 4-cell stage and some may not develop to the blastocyst stage. We have evaluated the safety of SET and the outcomes of pregnancy.

**Methods:** Sperms were treated with Ham's F-10 supplemented with 10% human follicular fluid (hFF). Oocytes or fertilized oocytes were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10% or 20% hFF respectively. Up to five oocytes were inseminated with approximately 200,000 sperm cells/2 ml in each well. Fertilization was examined in the following morning and fertilized oocytes were co-cultured until embryo transfer. Vero cells for co-culture were prepared in Tissue Culture Medium - 199 (TCM-199) with 10% fetal bovine serum. At the two to four cell and blastocyst on day 2 and day 5, embryo and blastocyst grading were evaluated. Pregnancy rate was determined after transfer of human embryos at the two to four cell stage on day 2 (Group I) or subsequent transfer of embryos on day 2 and at the blastocyst stage on day 5 (Group II). For statistical analysis, Student's *t*-test and Chi-square ( $\chi^2$ -test) were used. Results were considered statistically significant when *p* value was less than 0.05.

**Results:** No differences was found in the fertilization between Group I (81.0%, 98/121) and Group II (81.8%, 180/220). In case of cleavage rate, no difference was found in Group I (95.9%, 94/98) and Group II (97.8%, 174/178). However, the rate of clinical pregnancy was significantly higher (*p*=0.014) in Group II (66.7%, 12/18) than in Group I (26.3%, 5/19).

**Conclusion:** The results of this study showed that SET is safe and effective, and significantly increases the pregnancy rate.

**Key Words:** *In vitro* fertilization (IVF), Subsequent embryo transfer (SET), Clinical pregnancy

연락처: 박기상, 700-721 대구시 중구 삼덕동 2가 50번지, 경북대학교병원 산부인과학교실

전화: (053) 420-5727, 팩스: (053) 423-7905, E-mail: keespark@yahoo.com

\*본 논문의 요지는 1999. 9. 25-30. Canada, Toronto에서 개최된 ASRM/CFAS'99에서 발표되었음.

인간의 자궁은 배란 후 6~7일 경에 착상을 위한 최상의 생리적 상태로 되고 포배강이 형성된 (cavitated) 배반포기 배아 (blastocyst)가 fallopian tube를 지나 자궁 내로 들어간 다음 착상이 성공적으로 이루어지게 되므로 배반포기 배아를 자궁에 이식해 주어야 배아와 자궁의 발달 단계가 일치하여 임신율을 높일 수 있다.<sup>1</sup> 그러나 체외수정술 (IVF cycle)에서는 자궁에 수정란을 이식하는 시기는 일반적으로 난자채취 후 2 또는 3일에 실시하고 있다.<sup>2,3</sup> 그 이유는 배양기간이 길어지면 수정란의 발달이 중지되거나 degeneration이 증가되어 이식할 수 있는 배아의 수가 줄어들거나 이식 자체를 포기해야 되는 경우도 있기 때문이다.<sup>2,4</sup> 최근에는 다태임신의 위험성을 낮추고 착상율을 증가시키기 위하여 난자채취 후 5일째에 배반포기 배아를 이식하기 위한 시도가 많이 이루어지고 있는 추세이다.<sup>5</sup> 이러한 배반포기 배아의 이식은 배양조건의 개선 등으로 가속화되고 있다.<sup>6-8</sup> 이식하는 날짜를 달리하는 방법도 많이 보고되고 있고,<sup>4,9</sup> 같은 주기에서 이식을 2회 실시하는 방법도 제시되고 있으나 그 효용성에 대해서는 연구자나 연구기관에 따라 견해 차이가 크다.<sup>5-11</sup>

따라서 일반적으로 많이 실시하고 있는 이식 방법인 난자채취 후 2일째에 배아이식을 실시한 경우 (Day 2 ET)와 2일과 5일째에 연속으로 배아이식을 실시한 경우 (SET)로 나누어 임상 결과를 비교·분석하여 체외수정술에서 임신율을 향상시킬 수 있는 방법을 모색하고자 본 연구를 실시하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

본 연구에는 37주기의 체외수정술을 시행한 환자를 대상으로 day 2에 이식한 것과 day 2와 day 5에 연속으로 이식한 군으로 나누었다. 첫 번째는 난자채취 후 2일 (Day 2)에 2-4세포기의 배아를 이식한 19주기를 대상으로 하였다. 두 번째는 난자채취 후 2일 (Day 2)에 2-4세포기의 배아를 이식하고 남은 여분의 배아를 5일 (Day 5)까지 배양하여 배반포기 단계에서 한번 더 배아를 이식한 18주기를 대상으로 하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) 배양액의 준비

정자의 처리에 사용한 F-10 Nutrient Mixture Medium (Ham's F-10, 11550-043, Gibco, USA)은 1.2 g/l의 NaHCO<sub>3</sub> (S-5761, Sigma, USA)를 첨가하여 제조하였다. 난자의 수정과 배양에는 DMEM (11966-025, Gibco, USA)을 사용하였고, vero cell의 준비에는 TCM-199 (11150-059, Gibco, USA)을 이용하였다. 모든 배양액은 0.5% antibiotics (Streptomycin sulfate, S-9137, Sigma, USA; Penicillin-G, P-3032, Sigma, USA)를 첨가한 다음 삼투압 측정기 (Osmomat 030, Gonotec, Germany)를 이용하여 삼투압을 280 mOsmol/kg으로 보정하고 나서 0.2 μm의 여과기 (SLGV R25 LS, Millipore, France)로 제균하면서 14 ml tube (2001, Falcon, USA)에 분주한 다음 4℃에서 보관하였다. 배양액은 95% 이상의 습도, 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub>를 유지하고 있는 배양기 (3154, Forma, USA)에서 6시간 이상 평형시킨 다음 이용하였다.

#### 2) 난자의 준비

과배란은 gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH-a)를 이용한 장기요법을 실시하여 유도하였다. Mid-luteal phase에서 Buserelin (900 μg; Suprecur, Hoechst, Germany)를 투여하기 시작하여, 혈청 estradiol로서 pituitary shutdown을 확인한 후 human menophosal gonadotropin (hMG, Pergonal, Serono, Italy 또는 IVF-M, LG, Korea)을 투여했다. Estradiol의 농도와 난포 수 및 난포의 크기를 기초로 한 난소 반응에 따라 hMG의 투여량을 조절하였다. 난포의 직경이 17 mm 이상인 것이 2개 이상이고 estradiol의 농도가 900 pg/ml 이상일 때 10,000 IU의 human chorionic gonadotropin (hCG, IVF-C, LG, Korea)을 투여하여 배란을 유도하였다. hCG를 주사한 후 34시간에 질식초음파 (ultrasound Scanner, 1846; Probe, 8538, Brtuel & Kjaer Medical, Denmark)를 보면서 난자채취바늘 (Double Lumen Follicle Flushing Ovum Pick-Up Needle Set, K-OPSD-1735-LL, COOK, Australia)로 난포에서 난자를 채취하였다.

채취한 난자는 37℃와 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 조작기 (IVF chamber, Hoffman, USA)내에서 해부현미경 (SMZ-10, Nikon, Japan)을 이용하여 세포질 내 핵의 유·무와 난구세포의 특징을 기준으로 난자의 성숙도를 확인하였다.<sup>12</sup> 성숙 정도에 따라

DMEM (+10% hFF)이 들어 있는 배양접시 (3037, Falcon, USA)로 각기 다르게 옮긴 다음 수정시기 까지 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 수정에 이용하는 난자는 배양접시 당 5개 이하가 되도록 조절하였다.

### 3) 난포액 (hFF, human follicular fluid)의 준비

hFF는 체외수정시술을 하고 있는 환자 중에서 성숙난자를 갖고 있는 난포에서 회수한 난포액에 혈액이 거의 섞이지 않은 것을 이용하였다. 회수한 hFF는 원심분리 (3,500 rpm)를 30분간 실시하여 상층액만을 회수한 후 0.2 μm의 여과기로 제균하고 56℃로 조절된 항온수조에서 35분간 불활성화 (heat inactivation)시키고 나서 -20℃에 보존하다가 용해하여 사용하였다. 용해 후 2일이 경과한 것은 실험에서 제외하였다.

### 4) 체외수정

난자를 채취하고 나서 수음 (masturbation)으로 specimen container (Baxter, USA)에 정액을 받았다. 정액을 실온에서 10~20분간 방치하여 액상화를 유도한 다음 정자의 농도와 운동성을 WHO의 기준에 따라 측정하였다.<sup>13</sup> 액상화된 정액은 15 ml conical tube (2099, Falcon, USA)로 옮겨 Ham's F-10 (10% hFF)으로 1,500 rpm에서 2회 (5분, 3분) 원심분리하여 세척하였다. 원심분리 후 pellet을 제외한 상층액은 제거하고 pellet이 흩어지지 않게 1 ml의 Ham's F-10을 조심스럽게 첨가하여 1시간 동안 배양기 내에서 정자를 부유하였다. 부유된 정자는 5 ml tube (2003, Falcon, USA)에 보관하면서 수정에 이용하였다. 수정에 이용하는 정자는 200,000마리 (2 ml 배양액)가 되게 수정시기의 난자가 들어 있는 배양접시 내로 주입하였다.

다음날 아침, 37℃와 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 조작기 내에 있는 해부현미경 하에서 syringe needle (320310, BD, USA)로 난구세포를 제거하고 나서 수정여부를 조사하였다. 자성전핵과 융성전핵이 형성되어 있고 두 개의 극체가 있는 것을 수정이 된 것으로 확인하였다.

### 5) Vero cell의 준비

Vero cell은 Ouhibi 등<sup>14</sup>의 방법에 따라 동결되어 있는 cell을 용해하여 2~3×10<sup>6</sup> cell을 채취한 후 culture flask (3013, Falcon, USA)에서 4일 동안 (6~8×10<sup>6</sup> cell) 배양하고, 3 ml의 trypsin-EDTA (25300-054, Gibco, USA)를 10~20초간 처리하여 cell suspension을 유도하고, FBS를 주입하여 trypsin을 중화시킨 다음, cell scraper (3010, Costar,

USA)로 cell을 dish 바닥에서 분리하였다. 분리된 cell은 10 ml의 배양액으로 세척하고 (900 rpm, 30분) 나서 3개 정도로 나누었다. 이 중에서 한 개는 새로운 flask에서 배양을 하고, 하나는 freezing medium (Cell Culture Freezing Medium, 11101, Gibco, USA)으로 동결하고, 나머지 한 개는 배양 접시에 monolayer를 형성하도록 2 ml의 배양액에 200,000 cell의 농도로 조절하여 약 3일간 배양하였다. 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS, 26140-079, Gibco, USA)이 첨가된 TCM-199을 이용하였다. Vero cell의 동결과 용해도 Ouhibi 등<sup>14</sup>의 방법을 이용하였다.

### 6) Vero cell monolayer 상에서 수정란의 공배양

수정이 확인된 난자는 vero cell과 공배양을 실시하였다. 공배양 접시의 준비는 공배양을 실시하기 하루 전날 20% hFF가 첨가된 DMEM으로 교체하였으며, 2~3일 후에 이와 같은 방법으로 공배양접시를 교체하면서 이식 직전까지 배양하였다.

### 7) 수정란의 등급 판정

2-4세포기에서 배아의 등급은 Veck<sup>12</sup>의 방법에 따라 형태학적 등급을 Grade 1 (G1), G2, G3, G4, G5로 나누어 판정하였다. G1은 할구의 크기가 균일하고 세포질 내에 fragmentation이 없는 것을, G2는 할구의 크기는 균일하지만 세포질 내에 약간의 fragmentation이 있는 것을, G3는 할구의 크기가 비 균일하면서 약간의 fragmentation이 있는 것을, G4는 할구의 크기가 비 균일하면서 fragmentation이 전체의 약 50% 정도를 차지하는 것을, G5는 정상적인 할구가 거의 보이지 않으면서 전체적으로 fragmentation이 된 것으로 하였다.

### 8) 배반포기 배아의 등급 판정

배반포기 배아의 등급은 Dokras 등<sup>2</sup>의 방법에 따라, BG1은 early cavitation 되고 나서 expanded cavity (ICM과 trophectoderm layer로 구분되는)가 있는 것으로 하였다. BG2는 initial cavitation 후 1~2일 후에 BG1의 모양이 되는 것 ("late" 또는 "slow" developer)으로 하였다. 그리고 BG3는 처음에 vacuole이 보이고 나서 degerative foci가 보이는 것으로 하였는데, vacuolated morula는 vacuole에 의해서 cavity로 보일 수 있고, BG3는 ICM과 trophectoderm이 잘 보이지 않아 초기 배반포기 배아와 구별하기 어려울 수도 있다.

### 9) 배아이식

배아를 이식할 때에는 Tomcat catheter (8890-

793021, Sherwood, USA)를 이용하였으나, Tomcat catheter로 이식이 되지 않는 경우에는 Jansen-Anderson catheter (Jansen-Anderson Bulb Tip Embryo Transfer Catheter Set, K-JET-3200, Cook, Australia)를 이용하였다. 실험 1에서는 Day 2에서만 배아 (2-4세포기 배아, G1-G3)를 이식하였고, 실험 2에서는 Day 2에서 배아 (2-4세포기 배아, G1-G3)를 이식하고 나서 여분의 배아는 Day 5까지 배양한 다음 배반포가 확인된 배아 중에서 BG1만을 이식하여 한 주기에서 이식을 2회 실시하였다. 배아이식 후에는 최소한 6시간 이상 환자를 안정시킨 후 귀가시켰다.

#### 10) 황체호르몬의 투여 및 임신의 확인

배아이식 후 매일 50 mg의 황체호르몬 (progesterone in oil, Progest, Samil, Korea)을 근육 주사하였다. 배아이식 후 10~12일째 혈중  $\beta$ -hCG의 농도가 10 mIU/ml 이상일때 임신의 성공으로 확인하였다. 배아이식 3주 후에 질식초음파 검사에서 태낭 (gestational sac)이 관찰되는 경우를 임상적 임신으로 정의하고 임신 6~7주에 태아의 심장박동을 관찰하였다.

#### 11) 통계분석

각각의 실험 설계에 따라 수정율, 배아 발달 및 임신율을 비교·조사하였다. 결과에 대한 분

석은 통계프로그램인 Microsoft Excel-97을 이용하였다. 평균에 대한 유의성은 Student's *t*-test와 Chi-square ( $\chi^2$ -test)를 병용으로 실시하여 5% 유의수준에서 검정하였다. 표준 오차율은  $\pm$ SEM으로 나타내었다.

## 결 과

난자채취 후 2일째 (day 2)에 배아이식을 실시한 군 (Day 2 ET)과 day 2와 day 5에 연속으로 배아이식을 실시한 군 (SET)에서 환자의 나이는 각각  $32.7 \pm 1.10$ 과  $31.4 \pm 0.71$ 로 양군간에 차이가 없었다. 사용한 난자의 수는 양군에서 각각 121개와 220개로써, 평균  $6.4 \pm 0.69$ 개와  $12.2 \pm 0.98$ 개로 SET에서 현저하게 ( $p < 0.01$ ) 많았다 (Table 1).

수정율 (2-PN)은 Day 2 ET와 SET에서 81.0% (98/121)와 81.8% (180/220)로 차이가 없었다 (Figure 1). 수정이 확인된 난자 중에서 배양에 사용한 수정란의 수는 각각 98개와 178개였으며 이 중에서 2-세포기 이상의 배아 발달을 보인 것은 양군에서 95.9% (94/98)와 97.8% (174/178)로 차이가 없었고 (Figure 2), 배아의 질 (embryo quality)도 양군간에 차이가 없었다 (자료는 제시하지 않았음).

Day 2 ET에서는 19주기에서 78개의 배아를 이

**Table 1.** No. of cycles, used oocytes, cultured embryos, ET cycles and transferred embryos in day 2 ET and subsequent ET (SET)

	Day 2	SET
No. of cycles	19	18
Age		
Range	25-44	28-40
Mean $\pm$ SEM	$32.7 \pm 1.10$	$31.4 \pm 0.71^*$
No. of used oocytes	121	220
Range	3-19	6-21
Mean $\pm$ SEM	$6.4 \pm 0.69$	$12.2 \pm 0.98^\dagger$
No. of cultured embryos	98	178
No. of ET cycles	19	18
No. of transferred embryos	78	108
Range	3-7	4-7
Mean $\pm$ SEM	$4.1 \pm 0.20$	$6.0 \pm 0.20^\dagger$

\*Not significant,  $^\dagger p < 0.01$

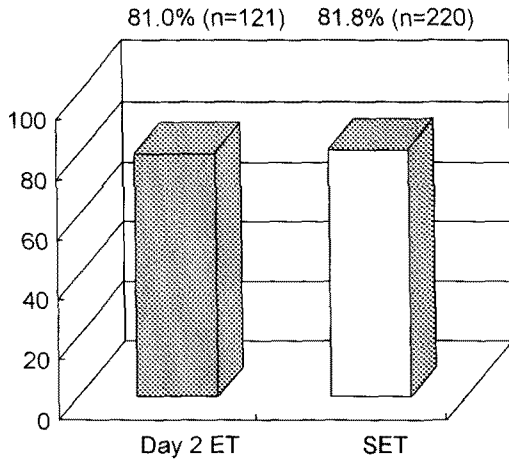


Figure 1. Fertilization rate (2-PN, NS) in Day 2 ET and subsequent embryo transfer (SET).

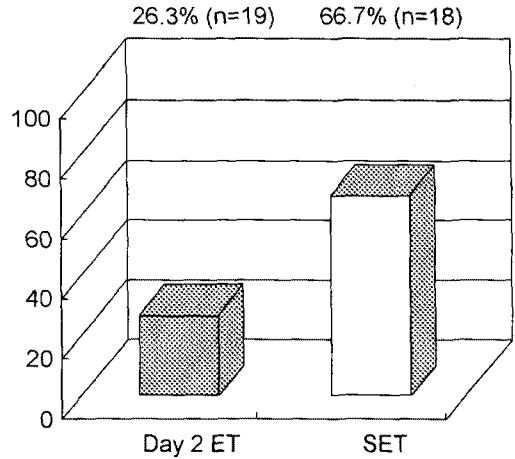


Figure 3. Pregnancy rate ( $p=0.014$ ) in Day 2 ET and subsequent embryo transfer (SET).

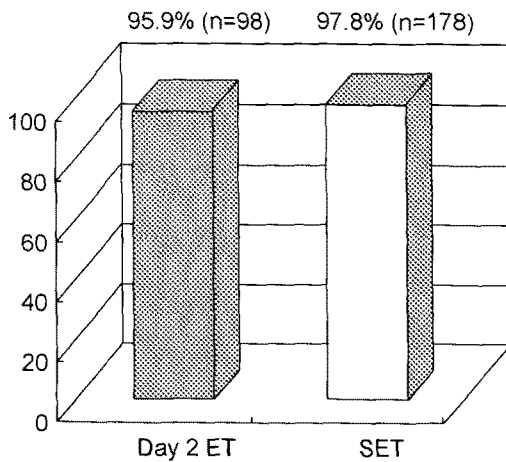


Figure 2. Cleavage rate ( $\geq 2$ -Cell, NS) in Day 2 ET and subsequent embryo transfer (SET).

우수한 것 만 (G1-G3)을 선별하여 3~7개 사이에서 이식을 하였다. SET에서는 day 2에 G1-G3 상태의 2-4세포기의 배아 만을 이식하고 나서 남아 있는 여분의 배아는 day 5까지 배양한 다음 배반포기에 도달한 배아 중에서 BG1 만을 선별하여 1~3개 더 이식해 주었다.

임상적 임신율은 Day 2 ET에서는 26.3% (5/19)인 반면에 SET에서는 66.7% (12/18)로 현저하게 ( $p=0.014$ ) 높았다 (Figure 3). 다태임신율은 SET에서 높게 나타나는 경향이 있었으나 통계적인 유의차는 없었고 유산이 되는 경우도 양군에서 거의 차이가 없었다. 그러나 임신 결과를 확인한 다음의 자세한 기록이 남아 있지 않거나 차후의 자료가 추적되지 않는 환자가 다수 있어서 자료를 제시하지는 못하였다.

## 고 찰

식하였는데, 한 주기 당 3~7개의 배아를 이식하여 평균  $4.1 \pm 0.20$ 개의 배아를 이식에 이용하였다. SET에서는 18주기에서 108개의 배아를 이식하였는데, 한 주기 당 4~7개의 배아를 이식하여 평균  $6.0 \pm 0.20$ 개의 배아를 이식에 이용하였다 (Table 1). 이식한 배아의 숫자는 Day 2 ET보다 SET에서 유의하게 ( $p < 0.01$ ) 많았는데, 이는 SET에서 day 2에 이식을 하고 나서 day 5에 배반포기 배아를 1~3개 더 이식해 주었기 때문에 이식한 배아의 숫자가 늘어난 것이다. Day 2 ET에서는 2-4세포기에 도달한 배아 중에서 형태적으로 가장

Table 1과 Figure 1, 2, 3에서 보는 바와 같이 Day 2 ET와 SET에서 수정율 (81.0% vs. 81.8%)과 2세포기 이상의 배아 발달율 (95.9% vs. 97.8%)에서는 양군간에 차이가 없었다. 그러나 임상적 임신율은 Day 2 ET (26.3%) 보다 SET (66.7%)에서 현저하게 ( $p=0.014$ ) 높았는데, 이식한 배아의 수가 Day 2 ET ( $4.1 \pm 0.20$ ) 보다 SET ( $6.0 \pm 0.20$ )에서 많았기 때문일 가능성이 있으나 SET에 의해서 배반포기 배아 (특히 BG1)와 같은 발생능력이 우수한 배아가 한번 더 이식되었기 때문에 임신율이 증

가된 것으로 생각된다. Goto 등<sup>9</sup>도 배아를 이식할 때 질적으로 좋은 배아 (good-quality embryos)가 이식된 숫자가 임신율과 밀접한 관계가 있다고 하였는데, good-quality embryo를 0, 1, 2, 3으로 나누어 보았을 때 임신율은 2.7%, 11.1%, 32.6%, 27.1였고, 출생율 (live birth)은 0.0%, 7.9%, 21.1%, 16.1%로 나타나 이식된 배아의 숫자보다는 이식된 배아의 질이 우수해야 임신율과 차후의 발생율을 높일 수 있다고 하였다. Mantzavinos 등<sup>15</sup>은 day 2-3에 배아이식을 실시하여 임신율은 donor에서 1~2번 이식을 실시한 군과 세 번 이상 이식을 실시한 군에서 29.8%와 34.8%로 차이가 없었으나, 같은 주기의 recipient에서의 임신율은 31.5%와 15.1%로 세 번 이상 난자 공여로 이식을 실시하면 임신율이 현저히 ( $p < 0.005$ ) 낮아지는데, recipient에서 임신율을 높이기 위해서는 good oocyte quality를 확보해야 된다고 하여 난자의 질이 임신율과 밀접한 관계가 있다고 하였다.

Nabi 등<sup>16</sup>은 배아를 이식하는 과정에서 배아이식 후 catheter에 mucus (17.8%)나 blood (12%)가 묻어 있을 때에 catheter에 배아가 많이 남아 있을 가능성이 높고, 이식이 어려운 경우 (20.3%)가 쉬운 경우 (0.8%) 보다 catheter에 배아가 남아 있을 가능성이 높은데, 이런 경우에는 이식을 여러 번 다시 실시 (multiple attempt)하였으나 임신율에는 multiple attempt (23.2%)와 이식을 한번 실시한 군 (single attempt, 24.7%)에서 차이가 없다고 하여 배아를 이식할 때 catheter를 같은 주기에서 여러 번 자궁에 삽입하더라도 기존에 이식된 배아와 자궁 내막에 상해를 입히지 않음을 시사하였다. Beauchamp 등<sup>17</sup>은 배아이식을 두 번 실시한 군 (double ET, DET)이 한번 실시한 군 (single ET) 보다 임신율을 14% 이상 올릴 수 있고 다태임신율은 양군에서 비슷한 양상 (25%)을 보인다고 하였다. 또한 DET에서는 자궁에 주입된 배양액의 양이 증가하였으나 임신율에는 영향을 주지 않았고, 자발적 유산율과 자궁외 임신율을 증가시키지도 않는다고 하여 본 연구 결과와 유사하였다. 그러나 난자 채취 후 3일째에 이식을 실시한 군과 3일과 5일째에 연속으로 배아이식을 실시한 군 (sequential ET)에서 임상적 임신율은 각각 28.6%와 28.8%로 차이가 없는 반면에 다태임신율은 각각 0.9%와 15.4%로 sequential ET에서 다태임신의 위험성이 증가하는 경향이 있다는 상반된 보고도 있다.<sup>11</sup>

Gardner 등<sup>5</sup>은 day 3 ET와 day 5 ET에서 임신율

은 66%와 71%로 차이가 없었으나 착상율은 30.1%와 55.4%로 day 5에서 높다고 ( $p < 0.01$ ) 하였다. Huisman 등<sup>4</sup>은 day 2, day 3, day 4 ET로 나누어 보았을 때 임신율은 이식시기와 상관 없이 (27.4%, 25.6%, 29.7%) 착상율은 18.2%, 19.2%, 41.1%로 day 4 ET에서 높게 ( $p < 0.01$ ) 나타난다고 하였다. 저자들이 이전에 실시한 연구 결과에서는 day 5에서 배아이식을 실시한 군에서 높은 (50%) 임신율을 얻어 배아를 장기간 배양하여 이식하는 것이 임신 성공률을 높일 수 있었다.<sup>6</sup> 그러나 Goto 등<sup>9</sup>은 이식시기를 day 2 (20.3%), day 3 (32.9%), day 4 (30.4)로 하였을 경우에는 임신율의 차이가 없다가 day 5 (10.7%)에서는 오히려 임신율이 낮게 ( $p < 0.05$ ) 나타난다고 하여 day 5 이전에 이식할 것을 제안하였다. Erzeid 등<sup>10</sup>은 day 2 ET와 day 3 ET에서 착상율은 각각 15.8%와 14.3%였고, 출생율은 각각 18.5%와 22.6%로 나타나므로 난자채취 후 2 또는 3일째에 배아를 이식하는 것은 임신 결과에 영향을 주지 않는다고 하여, 배아를 이식하는 날짜와 임신 결과는 연구자마다 상이하였다.

본 연구에서 난자의 수정과 배아 발달에 사용한 배양액인 DMEM과 배양액에 첨가한 난포액은 저자들이 이전에 실시한 실험 결과를 바탕으로 하였다. 인간 난자를 장기간 배양할 때 배양액으로 DMEM을 이용하여 배반포기 배아의 형성이 좋았는데 특히 BG1의 출현율이 높게 나타났다. 배양액에 첨가하는 hFF의 농도는, 수정이 확인되기 전까지의 난자에서는 10%로, 수정란에서는 20%로 조절한 다음 배양하여 배아의 발달율과 차후의 발생능력을 높일 수 있었다.<sup>6,7</sup>

수정이 이루어진 난자를 5~7일간 배양하면 부적절한 배양환경으로 인하여 배반포기 배아의 형성이 저조하게 나타나므로,<sup>1</sup> human ampullary cells,<sup>18</sup> bovine uterine fibroblasts<sup>19</sup> 또는 monkey vero cells<sup>1,3,20</sup>과 같은 feeder cell을 이용하여 공배양을 실시하고 있는데, 본 연구에서는 저자들이 인간 난자를 배반포기까지 배양할 때 효과적으로 이용한 결과를 바탕으로 vero cell을 공배양에 사용하였다.<sup>6,7</sup>

이상과 같은 연구 결과로 볼 때, 난자를 채취하고 나서 day 2에 배아이식을 한 후 여분의 배아를 배반포기까지 배양한 다음 day 5에 연속적으로 이식하여 임신율을 높일 수 있었다. 따라서 Day 5에 배반포기 배아 만들 이식 (blastocyst ET)하기에 적절하지 못할 것으로 예측되는 경우에 SET를 적용

하면 blastocyst ET에서 나타날 수 있는 이식 자체의 실패를 방지할 수 있으면서 임신율을 높일 수 있는 이식기법이 될 것이다. 그러나 2회 연속으로 실시하는 배아이식이 기 이식된 배아와 자궁내막에 미칠 수 있는 영향에 대해서는 보다 자세한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

#### 감사의 글

실험기간 결과의 비교·분석에서 통계 처리에 도움을 준 대구대학교 축산학과의 김 주환 군에게 감사의 뜻을 전합니다.

### 참 고 문 헌

- Gardner DK, Lane M. Culture of selection of viable blastocyst: a feasible proposition for human IVF? Hum Reprod 1997; 3: 367-82.
- Dokras A, Sargent IL, Barlow DH. Human blastocyst grading: an indicator of developmental? Hum Reprod 1993; 12: 2119-27.
- Turner K, Lenton EA. The influence of vero cell culture on human embryo development and chorionic gonadotrophin production *in vitro*. Hum Reprod 1996; 11: 1966-74.
- Huisman GJ, Verhoeff A, Alberda AT, Zeimaker GH, Leentveld RA. A comparison of *in vitro* fertilization results after embryo transfer after 2, 3, and 4 days of embryo culture. Fertil Steril 1994; 61: 970-1.
- Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. Hum Reprod 1998; 13: 3434-40.
- Park KS, Lee TH, Choi IK, Song HB, Chun SS. Comparison of blastulation and pregnancy rates of fertilized oocytes obtained after conventional *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection. J Mamm Ova Res 2000 (In press).
- 박기상, 최인경, 이진식, 송해범. 체세포의 공배양체계에서 단일 에너지원이 인간 배반포기 배의 형성에 미치는 영향. 대한불임학회지 1998; 25: 65-70.
- Jones GM, Trounson AO, Gardner DK. Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. Hum Reprod 1988; 13: 169-77.
- Goto Y, Kanzaki H, Nakayama T, Takabatake K, Himeno T, Mori T, et al. Relationship between the day of embryo transfer and the outcome in human *in vitro* fertilization and embryo transfer. J Assist Reprod Genet 1994; 11: 401-4.
- Erzeid G, Dale PO, Tanbo T, Storeng R, Kjekshus E, Åbyholm T. Clinical outcome of day 2 versus day 3 embryo transfer using serum free culture media: a prospective randomized study. J Assist Reprod Genet 1999; 16: 529-34.
- 정병준, 김종식, 송현진. 체외수정시술시 Sequential ET의 효용성에 관한 연구. 대한불임학회지 2000; 27: 75-81.
- Veck LL. Preembryo grading: In atlas of the human oocyte and early conceptus. Vol 2, Baltimore: Williams and Wilkins, 1991; 121-49.
- World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction. 3rd ed. 1992, Cambridge, Cambridge University Press.
- Ouhibi N, Menezes Y, Benet G, Nocollet B. Culture of epidermal cells derived from the oviduct of different species. Hum Reprod 1989; 4: 229-35.
- Mantzavinos T, Rizos D, Dimitriadou F, Arvaniti K, Kanakas N, Voutsina K. Pregnancy results after ovum donation following on to seven embryo transfers. Fertil Steril 1996; 66: 765-8.
- Nabi A, Awonuga A, Birch H, Barlow S, Stewart B. Multiple attempts at embryo transfer: does this affect *in-vitro* fertilization treatment outcome? Hum Reprod 1997; 12: 1188-90.
- Beauchamp P, Acevedo C, Alvarez C, Cortes M, Crespo M. Double embryo transfer (DET) improve accuracy of embryo replacement and pregnancy rates. Fertil Steril (Suppl 1) 1998; 70: S326-7.
- Bongso A, Ng SC, Satharathan H, Ng PL, Rauff M, Ratnam SS. Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cell. Hum Reprod 1989; 4: 706-13.
- Wiemer Ke, Cohen J, Wiker S, Malter H, Wright G, Godke RA. Coculture of human zygotes on

fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989; 52: 503-8.

20. Schillaci R, Ciriminna R, Cefalu E. Vero cell effect on *in vitro* human blastocyst development: preliminary results. *Hum Reprod* 1994; 9: 1131-5.

---