: 30 4 2003
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 30, No. 4, 2003, 12

불임 여성의 난소로부터 회수된 미성숙 난자의 체외 성숙과 배양에 관한 연구

마리아 병원[1], 충남대학교 동물자원학부, 형질전환 복제돼지 연구센터[2]

이석윤[1] · 손원영[1] · 윤산현[1] · 이원돈[1] · 박창식[2] · 임진호[1]

Study on *In Vitro* Maturation and Culture of Immature Oocytes Collected from Ovaries of Infertile Women

Seok Yoon Lee[1], Won Young Son[1], San Hyun Yoon[1], Won Don Lee[1], Chang Sik Park[2], Jin Ho Lim[1]

[1]Maria Hospital, Seoul, [2]Division of Animal Science & Resources, Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejeon, Korea

Objective: This study was performed to examine the maturation and the development to the blastocyst stage of immature oocytes collected from patients with high risk of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS).

Materials and Methods: Cumulus-oocyte complexes (COCs) were collected following only HCG-priming for non stimulated IVF-ET cycles of the patients. At the time of oocyte collection, COCs were classified into three groups in accordance with their appearance (Group I: oocytes with dispersed cumulus cells; Group II: oocytes with compacted cumulus cells; Group III: oocytes with sparse cumulus cells). The *in vitro* maturation and blastocyst development rates of the COCs were compared among these groups. From August 2001 to June 2002, 48 IVM/IVF-ET cycles from 42 patients (mean age: 32.4±3.8 years) were performed. To prevent the occurrence of OHSS, the patients were primed with 10,000 IU HCG alone 36 h before oocyte collection without gonadotropin stimulation. Oocytes were aspirated on cycle days from 7 to 13. The normal COCs were classified into three groups according to their appearance. The aspirated immature oocytes were cultured in YS maturation medium containing 30% (v/v) human follicular fluid (HFF), 1 IU/ml FSH, 10 IU/ml HCG and 10 ng/ml rhEGF. Fertilization was induced by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). All zygotes were co-cultured with cumulus cells in 10 μl YS medium containing 10% HFF until day 7 after oocyte collection. Blastocyst transfer was performed on day 5 after ICSI.

Results: Th e mean number of oocytes cultured in the IVM/IVF cycles was 24.7±10.6. Of 1185 COCs, those assigned to Group I, II and III were 470 (39.7%), 414 (35.0%) and 301 (25.4%), respectively. The maturation rate (94.5%, 444/470, $p<0.05$) in Group I was significantly higher than those of Group II (62.8%, 260/414) and Group III (73.1%, 220/301). Especially, 30.9% of COCs in Group I (145/470) was matured on the day of oocyte aspiration. There were no differences in the rates

주관책임자: 박창식, 우) 305-764 대전광역시 유성구 궁동 220, 충남대학교 동물자원학부
Tel: +82-42-821-5777, Fax: +82-42-825-9754, e-mail: parkcs@cnu.ac.kr
본 연구는 한국과학재단 우수연구센터 (R11-2002-100-00000-0) 지원으로 수행되었음.

of fertilization and cleavage among the three groups. The development rate to the blastocyst stage in Group I (54.6%, 206/377, $p<0.05$) was also significantly higher than those in Group II (33.0%, 68/206) and Group III (30.1%, 52/173). Twenty-four clinical pregnancies (50.0%) was obtained and 22 pregnancies (45.8%) are ongoing. Implantation rate in the present study was 24.6%.

Conclusion: These results suggest that there is a positive correlation between the appearance of COCs and the developmental competence of the immature oocytes in non stimulated IVM/IVF cycles.

Key Words: Immature oocyte, Blastocyst, HCG-priming

체외수정 (*In vitro* Fertilization, IVF)을 통한 최초의 시험관 아기 임신 성공[1] 이후 불임시술 프로그램에서 많이 사용되고 있는 과배란 유도 (controlled ovarian hyperstimulation, COH) 방법은 계획적으로 많은 난자를 얻는데 그 목적이 있다. 즉 외인성 생식선자극호르몬 (exogenous gonadotrophin)은 다수의 난포가 퇴행 (atresia)에 빠지지 않고 많은 성숙 난자를 만들도록 해준다. 이런 COH방법은 많은 난자에게 수정할 기회를 제공하여 이식할 배아의 수를 늘릴 수가 있다는 장점이 있다.

그러나, COH에는 난소 과자극 증후군 (ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)의 부작용이 나타날 수 있다. OHSS는 난소가 자극을 받아 부풀어 오르고 통증이 생기는 것으로, COH에 따른 합병증의 하나로 그 증상이나 징후의 정도에 따라 경증 OHSS (mild OHSS; 1급과 2급으로 분류), 중등도 OHSS (moderate OHSS; 3급과 4급으로 분류), 중증 OHSS (severe OHSS; 5급과 6급으로 분류)로 분류한다. OHSS 등의 부작용을 피하기 위해 COH를 하지 않고 IVF를 시행하는 한 방법으로 미성숙 난자 (immature oocyte)의 체외 성숙 (*In-vitro* maturation, IVM)에 의한 시험관 아기 프로그램이 시행되고 있다. COH와 IVM을 비교해 볼 때, IVM의 큰 장점은 환자로부터 OHSS의 발생을 피하게 하고, 시험관 아기 시술 비용을 절감시키며, 복잡한 절차를 간소화시킬 수 있다는 점을 들 수 있다.

여러 불임시술 병원에서 인간 미성숙 난자에 의한 성공적인 수정, 수정란의 발생, 임신의 성공을 보고하였고,[4~11] 최근 OHSS가 발생할 가능성이 높은 환자들을 대상으로 미성숙 난자에 대한 IVM의 임상적용이 늘어나고 있다. 그러나, 미성숙 난자로부터 체외에서 성숙된 난자들은 체내에서 성숙된 난자보다 발달 저하와 늦은 분할 속도를 나타나기 때문에 체외에서 성숙된 난자의 세포질 (cytoplasm)의 질 (quality)이 체내에서 성숙된 난자보다 떨어지는 것으로 여겨지며, 이로 인하여 임신 결과가 낮게 나오는 것으로 생각되고 있다.[9,12] 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 여러 연구자들은 성선자극호르몬 (gonadotrophin)을 투여하고 난소에서 미성숙 난자를 회수하여 IVM을 시도하게 되었다.

특히, Chian 등은 임부태반융모 성선자극호르몬 (human chorionic gonadotrophin, HCG)을 투여한 다낭성 난소증후군 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 환자들로부터 회수한 미성숙 난자를 이용하여 높은 성숙율과 임신율을 얻었다고 보고하였다.[13] 또한 그들은 HCG를 투여하여 회수된 미성숙 난자의 체외 성숙 시간을 단축시켰다고 하였다. 한편, Son 등은 HCG를 투여한 후 난자회수 시간에 따른 난구세포 (cumulus cell, CC) 모양이 다양하게 나타남을 보고하였다.[14] 그러나 다양한 난구세포의 모양을 가진 난자에 따른 난자의 성숙과 발달 능력을 분석한 것은 아니었다.

따라서 본 연구는 IVM 프로그램에서 HCG를 투여한 후 회수된 난자들의 체외 성숙과 포배기 배아 (blastocyst stage embryo)의 발달이 난구세포의 모양과 어떤 관계가 있는지를 조사하기 위해 시행되었다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 2001년 8월부터 2002년 6월까지 본 서울 마리아 병원 불임클리닉에서 불임치료 중 OHSS의 경험이 있거나, 발생 가능성이 있는 환자들을 대상으로 체외 성숙과 수정, 배아이식 (IVM/IVF-ET)을 시행하였고 이 중 42명의 환자 (32.4±3.8 years)

를 대상으로 시행된 48주기의 포배기 배아이식만을 본 연구에 공시하였다.

2. 난자의 회수

난자는 환자의 생리기간과 자궁내막의 두께에 근거하여 생리 7일에서 13일 사이에 회수하였다. 환자에게는 난자를 채취하기 약 36시간 전에 HCG 10,000 IU (IVF-C, LG chemical, Korea)를 투여하고, 질 초음파와 19 gauge 채취용 바늘 (Cook, Eight Mile Plains, Queensland, Australia)을 사용하여 난포 내 난자를 흡입하였다. 채취용 흡입 펌프의 음압은 80~100 mmHg이었다.

흡입물은 해파린 40 IU/ml (Choongwae Pharmacology, Hwasung, Korea)와 0.3% 우혈청 알부민 (bovine serum albumin, BSA)이 함유된 HEPES 완충액 (H-6147, Sigma)과 bicarbonate가 함유된 Ham's F-10 배양액 (N-6635, Sigma)에 모았다. 이 후 난포 흡입물은 70 μm mesh (Falcon 1060, Life Technologies)를 이용하여 걸러 내고 신선한 배양액으로 혈액 등을 세척하였다. 혈액 등을 걸러낸 mesh를 배양액에 넣고 10 ml pipette (Becton Dickinson & company, NJ, USA)을 사용하여 강하게 흡입과 배출을 반복함으로써 남아 있는 적혈구와 작은 세포조직의 파편을 제거해 주었다. 배양액 안에 떠 있는 세포와 큰 조직 등을 모으고, 신선한 동일 배양액으로 두 번 세척하여 실체현미경 하에서 난자들을 회수하였다.

3. 체외 성숙

실체현미경 하에서 회수된 난구-난자 복합체들 (cumulus-oocyte complexes, COCs)은 난구세포 모양에 따라 세 군으로 나누었다. 제 1군은 dispersed cumulus cell (CC), 제 2군은 compacted CC, 제 3군은 sparse CC의 난자로 나누었다. 난자를 회수하면서 그 성숙 정도를 평가하였고, 미성숙 난자는 성숙용 YS배양액을 이용하여 배양하였다.[15] 미성숙 난자의 성숙에 사용되는 YS배양액에는 30% HFF, 1 IU/ml FSH, 10 IU/ml HCG 및 10 ng/ml rhEGF (Recombinant human epidermal growth factor, Daewoong pharmaceutical Co., Korea)를 첨가하였다.[16] HFF는 Chi 등[17]이 보고한 방법으로 준비하였다. HFF는 환자의 나이, 불임의 원인, 난포의 크기, 회수 난자의 성숙도 등을 고려하여, 난포의 크기가 18 mm 이상, 나이가 40세 이하, 면역학적 이상이 없으며, 자궁내막염이 없는 불임원인이 명확한 환자에게서 회수하였다. 회수된 HFF는 3,000 rpm으로 30분간 원심분리 후, 상등액을 회수하여 56℃의 수조에서 30분간 불활성화 시켰다. 그 후 HFF를 0.22 μm filter (Millex-GV; Millipore, Bedford, MA)로 filtering한 후 15 ml tube에 4 ml씩 분주하여 사용 시까지 -70℃에서 보관하였다.

회수된 난자들은 5% CO_2, 5% O_2 및 90% N_2의 분압과 37℃ 조건으로 배양기 내에서 전 배양된 IVM 배양액 안에서 배양하였다. 배양 1일 후, 0.03% hyaluronidase (Sigma, St Louis, MO, USA)에서 pasteur pipette (Becton Dickinson & company, NJ, USA)을 이용하여 흡입과 배출을 반복함으로써 난구세포를 제거하였다. 난자 핵 성숙은 해부 현미경아래에서 제1극체 (first polar body)의 존재로 평가하였다. 난핵포 (germinal vesicle, GV) 또는 감수분열 일차중기 (metaphase I, MI)인 미성숙 난자들은 동일 조건의 신선한 배양액으로 옮겨 다시 배양을 하고, 배양 2일에서 3일째에 다시 성숙상태를 평가하였다.

4. 정자의 준비

성숙된 난자가 하나라도 채취되면 정액은 당일에 채취하며, 모두 미성숙 난자가 채취되면, 다음날 수음방법으로 50 ml specimen cup (Green cross, Korea)에 채취한다. 채취된 정액은 실온에서 30분간 액화시킨 후, 10% HFF를 첨가한 Ham's F-10 배양액 3 ml을 첨가하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하였고, 다시 희석한 정자용액을 1 ml의 등장 percoll용액 위에 올려 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 정자괴를 잘 풀고, 새 배양액으로 2회 세척한 후 swim up방법으로 고활력 정자를 회수하여 수정에 사용하였다.

5. 체외 수정과 배양

성숙 난자들은 세포질내 정자 직접 주입술 (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)의 방법으로 수정을 유도하였다. ICSI가 완료된 난자들은 10% HFF가 첨가된 YS배양액으로 옮겨 5% CO_2, 5% O_2 및 90% N_2의 분압과 37℃ 조건으로 배양하였다. 수정확인은

수정을 실시한 후 16~20시간에 난자의 손상 여부 및 전핵의 형성 여부 등을 자세히 관찰하여, 2개의 극체와 2개의 전핵 (pronucleus, PN)이 관찰되면 정상 수정 배아로 간주하였다. 수정란 (zygote)은 20% HFF가 첨가된 YS배양액으로 세척하고 단일층 (monolayer)으로 잘 부착된 난구세포 미세소적으로 옮겨서 공동배양 (co-culture)하였다. 배아는 수정 후 2일째에 수정된 난자가 7개 이상이고, 세 개 또는 그 이상의 건강한 배아가 있을 때 포배기까지 배양하여 이식하였다. 난구세포와 공동배양한 배아는 Dokras 등[19]의 기준을 참고하여 포배기 배아를 구분하였다.

6. 자궁내막의 준비

자궁내막 (endometrium)의 준비를 위하여, 난자를 회수하기 36시간 전에 환자들에게 HCG 10,000 IU를 주사하였다. Estradiol (E_2) valerate (Progynova; Schering, Berlin, Germany) 6 mg과 Progest 100 mg을 난자 회수 다음날부터 매일 투약하였다. 이 투약은 소변검사를 통한 임신 반응검사에서 임신이 확인되지 않았을 때까지 또는 임신 반응이 확인되면, 태아심박동 (fetal heartbeat)이 확인될 때까지 계속 투약하였다.

7. 통계처리

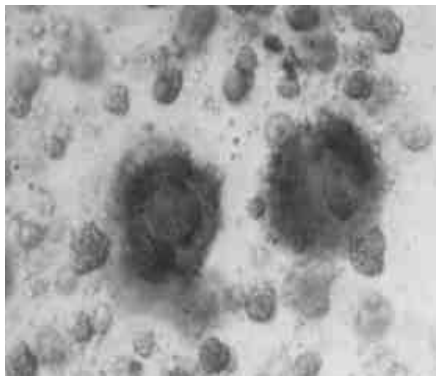
결과에 대한 분석은 통계프로그램인 statistical analysis system (SAS) package (SAS Institute, Cary, NC, USA)를 이용한 χ^2 test로 유의성 검증을 실시하였다.

결 과

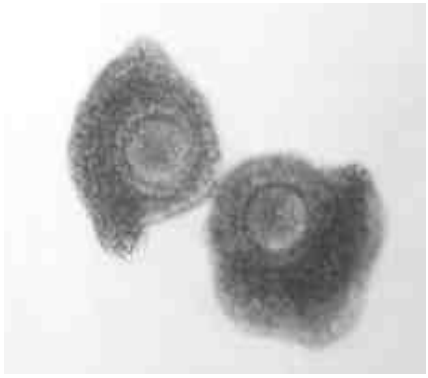
환자들은 다음과 같은 불임원인을 가지고 있다; 다낭성 난소증후군 (polycystic ovary syndrome, PCOS) (27명), 원인불명 (unexplained) (6명), 무배란 (anovulatory) (2명), 난관 요소 (tubal factor) (4명) 그리고 자궁요소 (uterus factor) (3명) 등의 원인이 있었다 (Table 1).

무배란 주기 환자들은 progesterone (Progest, Samil Pharmacology, Seoul, Korea)을 투약하였고, 마지막 투약 후 3일 안에 생리가 유발되었다.

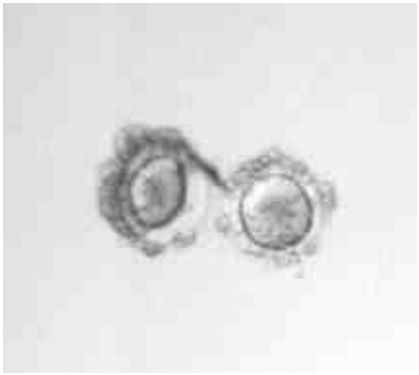
모두 1,185개의 난자 (24.7±10.6)를 회수하였고,



A



B



C

Figure 1. The morphology of human immature oocytes at the time of oocyte collection. **(A)** GV-stage oocytes with dispersed CC appearance (group I). **(B)** GV-stage oocytes with compacted CC appearance (group II). **(C)** GV-stage oocytes with sparse CC appearance (group III). (Original magnification 200X).

이들 난자들은 부착된 cumulus cell의 모양에 따라 dispersed (제 1군), compacted (제 2군), sparse (제 3

군)으로 나누었다 (Figure 1).

난구세포 모양에 따라 분류한 세 군 각각의 난자의 수, 성숙율, 수정율 및 분할율의 결과를 비교하였다 (Table 2).

제 1, 2, 3군의 난자의 수는 각각 470 (39.7%), 414 (35.0%), 301 (25.4%)의 분포를 보였다. 난자의 성숙율은 제 1군에서 94.5% (444/470), 제 2군에서 62.8% (260/414), 제 3군에서 73.1% (220/301)로, 제 1군에서 가장 높은 난자 성숙율을 나타내고 있다. 세 군간 정상 수정율과 수정란 분할 빈도에 대한 유의차는 없었다.

Table 3에서 난구세포의 모양에 따른 세 군에서의 배양기간에 대한 난자의 성숙율을 볼 수 있다.

제 1군에서는 난자를 회수할 때 회수된 난자의 30.9%에 해당되는 145개의 성숙 난자를 얻을 수 있었으나, 제 2, 3군에서는 난자를 회수할 때 하나의 성숙 난자도 발견되지 않았다. 배양 1일째에 제 1, 2, 3군에서의 성숙율은 각각 90.2% (424/470), 34.5% (143/414), 61.5% (185/301)였다. 배양 2일째에 제 1, 2, 3군에서의 성숙율은 각각 94.3% (443/470), 61.4% (254/414), 71.8% (216/301)를 나타냈다. 그 결과, 난자의 성숙은 제 1군이 제 2, 3군보다 빨랐던 것으로 나타났다. 또한, 배양 3일째의 성숙율도 제 1군이 94.5% (444/470)로 제 2, 3군의 62.8% (260/414), 73.1% (220/301)보다 유의하게 높았다 ($p<0.05$).

난구세포 모양에 따른 정상 수정란으로부터 포

Table 1. The distribution of patients according to their infertility factors

Parameter	No. of patients	Percentages
PCOS	27	64.3
Unexplained	6	14.3
Anovulatory	2	4.8
Tubal factor	4	9.5
Uterus factor	3	7.1
Total	42	100

PCOS = polycystic ovary syndrome

Table 2. The maturation, fertilization, and cleavage rates of the oocytes classified according to the appearance of their cumulus cells

Parameter	Group I	Group II	Group III
No. oocytes collected (mean±SD)		1308 (27.3±11.9)	
No. oocytes cultured (mean±SD)		1185 (24.7±10.6)	
No. of ocytes cultured	470	414	301
No. of MII oocytes (%)	444 (94.5)*	260 (62.8)	220 (73.1)
No. of 2PN oocytes (%)	377 (85.0)	206 (79.2)	173 (78.6)
No. of oocytes cleaved (%)	358 (95.0)	165 (80.1)	149 (86.1)

*$p<0.05$, when compared group I with group II or III
Group I: oocytes with dispersed CC; Group II: oocytes with compacted CC; Group III: oocytes with sparse CC

Table 3. Effect of culture period on oocyte maturation rates of the oocytes

Parameter	No. (%) of MII oocytes			
	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3
Group I	145 (30.9)*	424 (90.2)*	443 (94.3)*	444 (94.5)*
Group II	0 (0)	143 (34.5)	254 (61.4)	260 (62.8)
Group III	0 (0)	185 (61.5)	216 (71.8)	220 (73.1)

*$p<0.05$, when compared group I with group II or III
Group I: oocytes with dispersed CC; Group II: oocytes with compacted CC; Group III: oocytes with sparse CC

Table 4. The developmental rates of the 2PN-stage zygotes derived from the immature oocytes

	Group I	Group II	Group III
No. of 2PN oocytes	377	206	173
No. of blastocysts (%)	206 (54.6)*	68 (33.0)	52 (30.1)

*$p<0.05$, when compared group I with group II or III
Group I: oocytes with dispersed CC; Group II: oocytes with compacted CC; Group III: oocytes with sparse CC

Table 5. Pregnancy outcome of the transfer of the blastocyst derived from the oocytes in non stimulated IVM/IVF-ET program

	Blastocyst transfer
No. of cycles	48
No. of embryos transferred (mean±SD)	150 (3.12±0.44)
No. of embryos implanted (%)	37 (24.7)
No. of clinical pregnancies (%)	24 (50.0)
No. of ongoing pregnancies (%)	22 (45.8)

배기 배아로의 발달율을 세 군 사이에 비교하였다 (Table 4).

발달율은 제 1군의 54.6% (206/377), 제 2군의 33.0% (68/206), 제 2군의 30.1% (52/173)로 제 1군이 유의하게 높게 나타났다 ($p<0.05$).

HCG를 투여한 IVM프로그램 48주기에서 포배기 배아를 이식하였고, 그 중 24주기 (50%)에서 임상적 임신이 되어, 22주기 (45.8%)에서 임신이 유지되고 있다. 착상율은 24.7% (37/150)를 나타냈다 (Table 5).

고 찰

본 연구를 통하여 IVM프로그램에서 HCG를 투여한 후 회수된 난자들의 체외 성숙과 포배기 배아로의 발달이 회수된 난자들의 난구세포군의 모양과 관계가 있음을 보여주었다. 최근의 IVM기술이 성숙 난자를 획득하는데 있어서 최선의 방법은 아니지만, 현재로서는 효과적이라 할 수 있다.

자연주기에서 회수된 난자를 COH주기와 비교해 보면 난자의 발달이 늦고, 낮은 분할율을 보인다.[9,11] 특히, 사람의 IVM에서 회수되는 난자의 수는 지금까지도 임신 성공의 결정적인 요소로 여겨지고 있으며, 규칙적인 자연생리주기를 갖고 있는 여성의 IVM을 통한 임신 성공률은 전반적으로 낮음이 보고된 바 있다.[6,20] Yoon 등[15]은 규칙적인 자연생리주기를 지닌 여성의 IVM 63주기에서 74.3% (376/506)의 난자 성숙율, 72.6% (273/376)의 수정율, 89.0% (243/273)의 분할율을 얻었고, 17.6%의 낮은 임신율을 얻었다고 보고하였다. 그러나, COH에 의해서 많은 수의 난자가 회수된 환자의 경우에서 가장 심각한 부작용은 OHSS발생의 위험성이다. 이러한 부작용을 피하고 많은 난자를 얻어 성공적인 임신을 할 수 있는 방법으로 최근에 위와 같은 기준에 맞는 환자들에게 IVM을 적용하여 좋은 결과들을 보고하고 있다.[13,20,21] 따라서 본 연구자는 OHSS의 경험이 있거나 발생할 가능성이 높은 환자를 IVM시술 대상자로 선택하여 본 연구를 시행하였다.

Chian 등[13]은 불규칙한 생리주기를 가진 PCOS환자들에게 HCG를 투여하여 좋은 임신율을 얻었다고 보고하였다. 또한, Son 등[14]은 같은 방법을 이용한 IVM프로그램에서 OHSS발생 가능성이 높은 환자들에게 시도하여 비슷한 임상적 결과를 얻었고, PCOS인 여성에게 HCG를 투여하고 난자를 회수할 때 성숙 난자들을 얻을 수 있었으며, 그 성숙 난자들로부터 얻어진 포배기 배아를 이식하여 임상적 임신을 얻었다고 보고하였다. 그 결과, 미성숙 난자를 회수하기 전 HCG를 투여하면 난자의 발생능력을 개선시킬 수 있는 것으로 나타났다. 또한 IVM주기에서 HCG를 투여한 후 난자를 회수할 때 여러 가지 난구세포의 모양을 지닌 난자들이 관찰되었다고 보고하였다. IVM주기에서 HCG를 투여하지 않았거나 또는 낮은 폐경기성 성선자극호르몬 (human menopausal gonadotrophin, HMG)을 투여한 후 회수된 난자들을 HCG를 투여한 후 회수된 난자들과 비교할 때 dispersed 난구세포 모양의 난자들은 HCG를 투여한 후 회수된 난자들에서만 찾을 수 있었다. 그 결과 난자를 회수할 때 난구세포 모양이 차이를 나

타내는 것이 HCG를 투여할 때 난포들의 크기가 서로 다르기 때문일 것이라고 추측하였다.

Cha 그리고 Chian 등은 과배란을 유도한 IVF환자와 과배란을 유도하지 않은 IVF환자에게서 회수된 GV난자들의 난핵포 붕괴 (germinal vesicle breakdown, GVBD) 시간이 서로 다르다고 보고하였다.[22] 이 보고서에는, 과배란 IVF환자에게서 얻어진 GV난자의 80%는 배양 12시간 후 GVBD가 일어났지만, 비 처리 환자에게서 얻어진 난자는 모두 GV상태를 유지하였다고 보고하였다. 이것은 두 그룹간 핵 성숙에 도달하는 시간이 서로 일치하지 않기 때문이라고 보고하였고, 과배란 IVF환자와 과배란을 유도하지 않은 IVF환자에게서 회수된 GV상태 난자들의 난구세포 모양이 서로 다르기 때문이라고 보고하였다.

이러한 보고를 기초로 본 연구는 IVM주기에서 HCG를 투여한 후 회수된 여러 가지 난구세포 모양의 난자들간의 성숙을 비교하였으며, 그 결과 난자 성숙의 속도는 난구세포 모양에 따라 서로 다르게 나타남을 확인할 수 있었다. 제 1군의 경우 30.9% (145/470)가 성숙된 MII난자의 상태로 회수되었다. 제 2군과 제 3군에서는 난자를 채취할 때 성숙 난자가 나오지 않았다. 난자들의 성숙 속도와 성숙 수에서 제 1군이 제 2군과 제 3군보다 유의하게 높게 나타났다. 난자를 채취할 때 제 1군과 제 2군을 비교해 보면 제 2군의 성숙이 늦고 성숙율도 낮게 나타났다. 이러한 결과로 미루어 보아 제 1군은 COH 주기와 비슷하게 HCG자극에 반응한 난포들에서 회수된다고 추측할 수 있다. 이는 난포형성과정 (folliculogenesis)에서 황체형성호르몬 수용체 (luteinizing hormone receptor, LHR)가 나타나는 직접적인 증거는 아니더라도, HCG를 투여할 때 어떤 난포들은 LH수용체를 가지고 있을 것이고, 그것에 의해서 dispersed 난구세포 모양의 난자들이 회수된 것으로 사료된다. 비슷하게 HCG (10,000 IU)를 투여한 후 얻어진 제 2군은 체내에서 난구세포 반응을 유도하기에 불충분한 LH수용체를 가지고 있는 것으로 사료된다. 한편, 제 3군은 난자를 회수할 때 음압에 의해서 대부분의 난구세포들이 떨어져 생기는 것과 퇴화 과정에 들어서는 난자가 같이 나오는 것으로 사료된다.

Barnes 등은 처음으로 MII가 되는 난자들은 포배기 배아로의 발달 능력이 있는 것으로 보인다고 보고하였다.[9] 그 결과 dispersed 난구세포 난자들에서 성숙이 빠른 난자는 포배기 배아로의 발달 능력이 향상될 것으로 사료된다. 실제로 제 1군에서 포배기 배아로의 발달율은 제 2군과 제 3군의 발달율 보다 유의하게 높았다. 이러한 결과로 볼 때 IVM프로그램에서 HCG의 투여는 dispersed 난구세포의 존재와 난자들의 성숙과 포배기로의 발달 능력 사이에 정(正)의 상관 관계가 있다고 사료된다.

이상의 결과로, IVM주기에서 HCG자극 후 회수된 난자의 난구세포 모양이 난자들의 성숙과 발달을 예상할 수 있는 지표가 될 수 있을 것으로 사료되며, IVM주기에서 dispersed 난구세포 모양을 지닌 난자를 더 많이 회수하는 것이 난자의 성숙과 포배기 배아의 발달율을 높일 수 있는 요소로 작용할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Steptoe PC, Edwards RG. Successful birth after IVF. Lancet II 1978; 366.
2. Knox GE. Antihistamine blockade of the ovarian hyperstimulation syndrome. Am J Obstet Gynecol 1974; 118: 992-4.
3. Schenker JG, Weinstein D. Ovarian hyperstimulation syndrome: A Current survey. Fertil Steril 1978; 30: 255-68.
4. Veeck LL, Wortham JWE, Witmyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JJ, et al. Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of *in vitro* fertilization. Fertil Steril 1983; 39: 594-602.
5. Prins GS, Wagner C, Weidel L, Gianfortoni J, Marut EL, Scommegna A. Gonadotropins augment maturation and fertilization of human immature oocytes cultured *in vitro*. Fertil Steril 1987; 47: 1035-7.
6. Paulson RJ, Sauer MV, Francis MM, Macaso TM, Lobo RA. Factors affecting pregnancy success of human *in-vitro* fertilization in unstimulated cycles. Hum. Reprod 1994; 9: 1571-5.

7. Trounson A, Wood C, Kausche A. *In vitro* maturation and fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated policystic ovarian patients. Fertil Steril 1994; 62: 353-62.
8. Cha KY, Chung HM, Han SY, Yoon TK, Oum KB, Chung MK. Successful *in vitro* maturation, fertilization and pregnancy by using immature follicular oocytes collected from unstimulated polycystic ovarian syndrome patients. Proceeding of Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine, Abstr 1996; O-044.
9. Barnes FL, Kausche A, Tiglias J, Wood C, Wilton L, Trounson A. Production of embryos from *in-vitro* matured primary human oocytes. Fertil Steril 1996; 65: 1151-6.
10. Nagy ZP, Cecile J, Liu J, Loccufier A, Devroey P, Sterirteghem AV. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured germinal-vesicle stage oocytes: case report. Fertil Steril 1996; 65: 1047-50.
11. Russell JB, Knezevich KM, Fabian KF, Dickson JA. Unstimulated immature oocyte retrieval: early versus midfollicular endometrial priming. Fertil Steril 1997; 67: 616-20.
12. Trounson A, Anderies Z, Jones GM, Kausche A, Lolatgis N, Wood C. Oocyte maturation. Hum. Reprod 1998; 13: (Suppl. 3), 52-62.
13. Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. Hum Reprod 2000; 15: 165-70.
14. Son WY, Yoon SH, Hyun CS, Lee SW, Lee WD, Lim JH. Effect of *in-vitro* HMG or HCG stimulation on IVM/F-embryo transfer outcome of oocytes collected from women with OHSS experience (abstract). 17th Annual Meeting of the ESHRE, Lausanne. Hum Reprod 2001; 16: (Abstract Bk 1), O-185.
15. Yoon HG, Yoon SH, Son WY, Lee SW, Im KS, Lim JH, et al. Pregnancies resulting from *in vitro* matured oocytes collected from women with regular menstrual cycle. J Assist Reprod Genet 2001b; 18: 249-53.
16. Son WY, Yoon SH, Lee SW, Ko Y, Yoon HG, Lim JH. Blastocyst development and pregnancies after *in vitro* fertilization of mature oocytes retrieved from unstimulated patients with PCOS after *in vivo* HCG priming. Hum Reprod 2002; 17: 134-6.
17. Chi HJ, Kim DH, Koo JJ, Chang SS. The suitability and efficiency of human follicular fluid as a protein supplement in human *in vitro* fertilization programs. Fertil Steril 1998; 70: 871-7.
18. Yoon HG, Yoon SH, Son WY, Kim JG, Im KS, Lim JH. Alternative embryo transfer of day 3 or day 5 for reducing the risk of multiple gestations. J Assist Reprod Genet 2001a; 18: 188-93.
19. Dokras A, Sargent IL, Barlow DH. Human blastocyst grading; an indicator of developmental potential. Hum Reprod 1993; 8: 2119-27.
20. Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. *In vitro* maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2001; 76: 936-42.
21. Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, et al. Pregnancies and deliveries after *in vitro* maturation culture followed by *in vitro* fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2000; 73: 978-83.
22. Cha KY, Chian RC. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. Hum Reprod Update 1998; 4: 103-20.