

체외수정시술시 Sequential ET의 효용성에 관한 연구

인제대학교 의과대학 일산백병원 산부인과, 인천 서울산부인과 불임클리닉*

정병준 · 김종식* · 송현진*

Effect of Sequential Embryo Transfer in vitro Fertilization

Byeong Jun Jung, Jong Sik Kim*, Hyun Jin Song*

Department of Obstetrics & Gynecology, College of Medicine, University of Inje,
Ilsan Paik Hospital · Infertility Clinic, Seoul Obstetrics & Gynecology, Incheon*

Objective: The objective of this study is to influence of sequential embryo transfers in an in-vitro fertilization was examined.

Method: After in vitro fertilization, a maximum of 6 fertilized oocytes was enrolled in this study. At day 3 after an oocytes retrieval, embryos with good quality were transferred (mean 4.9), remaining embryos (mean 2.0/cycle) were cryopreserved at blastocyst stage (Group 1). At day 5 after oocytes collection, second a embryo transfer (mean 1.2/cycle) was performed, if one of these embryos had reached the blastocyst stage (Group 2) using P1 supplemented with 10 SSS and 30% Follicular fluid. No statistical difference in the pregnancy rate could be seen between the group without a second embryo transfer (n=21; 28.6%) and the group with a second transfer (n=52; 28.8%).

Results: The incidence of multiple pregnancy rate per embryo transfer was not statistically different between both group and no high-rank multiple pregnancy (greater than triplete) were observed (0.9%, 15.4%, respectively, $p=0.74$, χ^2). Out of 114 cycles (506 embryos) cultured embryos in group 2, 52 cycles (159 embryos, 29.8%) reached the blastocyst stage.

Conclusion: The second transfer did not have a significant effect on the pregnancy rate. The most important factor for the pregnancy seems to be the quality of the embryos transferred on day 3 following oocyte retrieval. We recommend embryo transfer is performed only one, day 2~3 or D5.

Key Words: Sequential embryo transfer, Blastocyst

전통적으로 체외수정시술시 배아이식은 수정 후 2~3일 (D2-D3 ET)에 시행하였으나 최근에는 다태임신의 위험성을 낮추고 착상율을 증가시키기 위하여 수정 후 5일째 (D5 ET)인 배반포이식을 시행하고 있다. 이러한 배반포이식은 공배양 및 sequential 배양액의 발달로 인하여 더욱 가속화되고 있다.¹⁻³ 배반포까지 배아발달을 위해서는 배의 발달과정 중 배아가 필요로 하는 영양분이 들어있는 적절한 배양액의 선택이 중요하기 때문에 이에 대한 각 연구실마다 다양한 배양액을 사

용하고 있으며 경이적인 배반포 발달율과 임신율 및 지속임신율을 보고하고 있으나,⁴ 아직은 모든 연구실의 성적이 좋다고 볼 수는 없다.

그러므로 많은 임상사들은 먼저 top grading의 배아를 선택하여 D3 ET를 시행하고 여분의 배아를 배양하여 배반포까지 도달한 1~2개의 배아를 동결보존하여 다음 주기에 이용한다. 그러나 경험이 풍부한 연구진이 아니면 동결보존하는데 따른 위험성과 또한 동시 배아이식이 임신율의 증가를 야기할 수 있다는 기대심리 및 환자가 다

태임신일지라도 임신에 대한 열의로 인하여 동시에 D5 ET도 시행하는 경우가 종종 있다.

형태학적으로 건강한 배아가 그렇지 못한 배아에 비하여 임신율이 높고 이식된 배아의 개수에 따라서도 임신율에 차이가 있다. 형태학적으로 건강한 배아를 최고 4개까지 D3때 이식하고 나머지 후발주자의 배아를 5일째까지 배양시켰을 때 얼마나 배반포까지 발달하는지의 문제와, 동시에 배아이식의 경우 D3때 시행한 배아의 착상을 방해할 위험성과 다태임신으로 인한 추후 위험성에 대하여도 임상 의사들은 심사숙고 한다.

이에 체외수정시술에서 3일째 배아이식을 시행한 경우와 건강한 배아를 3일째 이식하고 나머지를 5일째까지 배양시켜 연속하여 배아이식을 시행한 경우 임신율과 다태임신에 어떠한 영향을 미치는지를 보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 1998년 10월부터 1999년 9월까지 인천 서울산부인과 불임클리닉에서 시행되었던 체외수정시술중 3일째 top grading의 배아를 먼저 배아이식하고 여분의 배아를 5일째까지 배양하여 동결보존한 군 21주기와 (ICSI 6주기 포함) (Group 1), 3일째 top grading의 배아를 이식하고, 여분의 배아를 5일째까지 배양한 114주기중 배반포까지 도달하여 1~2개의 배반포를 이식한 52주기 (ICSI 48주기 포함) (Group 2)를 대상으로 하였다.

2. 연구 방법

1) 과배란유도

대상 환자에서 GnRH-a (Decapeptyl, D-trp-6-LH, ferring, Malmo, Sweden)을 사용한 황체기 장기투여법을 실시하여 과배란유도를 시행하였다. 과배란유도 주기전 월경주기 제 3일 오전 8시에 채혈하여 혈중황체화호르몬, 난포자극호르몬 및 E₂ 농도를 측정하며, 질식 초음파검사를 시행하여 골반내 이상 유무를 확인하였다. 월경주기가 일정한 환자에서는 월경주기 제 14일에 난포의 크기 및 배란 유무를 확인하여 월경주기 제 21일에 GnRH-a의 피하주사를 시행하였다.

GnRH-a의 피하주사 후 월경이 있으면 월경주기 제 3일에 뇌하수체의 기능 억제 유무를 확인하기 위하여 혈중 LH, E₂, P₄를 측정하여 LH < 5 mIU/

ml, E₂ 50 pg/ml, P₄ < 1 ng/ml인 경우 과배란유도를 시작하였다. 또한 월경주기 제 3일에 질식초음파를 시행하여 GnRH-a에 의한 난소낭종이 발생하였거나 난관 수종이 있는 경우를 확인하여 질식초음파 유도하에 질식천자를 실시하여 흡인 제거하였다. 월경주기 제 3일에 과배란유도를 시작하며, 과배란유도제는 FSH 단독 (Metrodin, Serono, Switzerland) 및 FSH와 hMG를 병합해서 사용하였다. 과배란을 시작하는 날을 과배란유도 제 1일로 하고, 제 3일에는 오후 6시에 FSH 150~300 IU를 근육주사하면서 환자의 난소반응상태 및 혈중 E₂ 농도에 따라 과배란유도제 용량의 증감을 조절하였다. 과배란유도 제 6일부터는 혈중 E₂ 농도와 질식초음파검사를 시행하여 난포 성장을 관찰하였다. 우성난포 크기의 평균 직경이 18 mm 이상이거나 16 mm 이상인 난포가 3개 이상 관찰되면서 혈중 E₂ 농도가 계속 상승하고, 직경 10 mm 이상인 난포당 혈중 E₂ 농도가 300 pg/ml 이상이면 hCG (Profasi, Serono, Switzerland) 10,000 IU를 근육주사하여 배란을 유도하였다.

2) 정액 준비

정액 채취는 난자 채취 당일 수음으로 sterile container (specimen cup, 녹십자)에 채취하며 Slide warmer (37°C)에서 약 30분간 액화시킨다. 액화된 정액은 markler counting chamber에서 정자의 농도 및 운동성을 세계보건기구의 기준에 의해 판정한다.⁵ 자세한 정액검사를 위해서 정자의 생사 여부와 정밀형태분석 (Kruger et al., 1986)⁶를 병행하기도 하였다. 수정 (Insemination)을 위한 정자 처리는 주로 Swim up 방법을 사용하였고 그 방법은 다음과 같다.

정액을 15 ml conical tube에 옮긴 다음 10% 난포액이 첨가된 Ham's F-10 solution 5 ml 정도를 첨가하여 천천히 혼합한 뒤, 200×g에서 약 5분간 원심분리를 실시하였다. 원심분리 후 정자피를 제외한 나머지 상층액을 제거하고 4 ml의 새로운 배양액을 첨가한 다음 천천히 잘 섞어준다. 200×g에서 다시 한번 원심분리를 실시한 다음 상층액을 제거하였다. 신선배양액 1 ml 정도를 sperm pellet 위에 아주 조심스럽게 분주한 다음 37°C, 5% CO₂가 공급되는 배양기내에서 15~30분간 배양하여 swim up을 유도한다. swim up된 상층액 부분 0.5 ml 정도를 회수하여 정자의 농도가 15~20×10⁶ sperm/ml 되게 조정된 다음 수정전까지 상온에서 보관하였다.

3) 난자 채취 및 배양

hCG 10,000 IU를 투여하고 약 36시간 후 질식 초음파 유도하에 난자 채취를 시행하였으며 난자 채취용 바늘의 세척을 위하여 10 ml의 P1 배양액을 사용하였다. 난포수집용 튜브에 난포액이 채워지면 배양접시 (#3002, Falcon Plastics, USA)로 옮겨 해부현미경 (dissecting microscope) 아래에서 OCC (Oocytes cumulus complex)의 존재 여부를 확인하였고 OCC가 발견되면 배율을 높여서 난자의 형태와 상태 및 성숙 정도를 판정하였다.

채취된 난자는 약 2 ml의 P1 배양액이 들어있는 배양접시 (#3001, Falcon plastics, USA)에서 세척한 후 과성숙 (postmature), 성숙 (mature), 미성숙 (intermediate, immature), 변성퇴화 (atretic, degenerative), 비정상 (abnormal) 등으로 구분하고 SSS (Synthetic Serum Substitutes)가 첨가된 P1 배양액이 들어있는 수정배양액 접시로 옮겼다. 보통 한 접시당 3~5개의 난자를 넣고 수정전까지 37℃, 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 배양하였다. 난자의 수정은 통상 난자흡입 후 성숙난포인 경우에는 3~4시간, Intermediate인 경우에는 8~10시간, 그리고 미성숙인 경우에는 28~48시간 배양 후 실시하였다.

수정은 난자 1개당 50,000마리의 운동성 정자의 수가 되도록 계산을 하여 수정접시에 직접 주입하였다. 수정이 끝나면 다음날 수정확인파 수정란의 성장을 위한 배양접시를 제조하여 전 배양시켰다.

4) 난자 세포질 내 정자 직접 주입술

난자 세포질 내 정자 직접 주입술 (ICSI)을 위한 집게피펫 (holding pipette) 및 주입피펫 (injection pipette)은 유리모세관 (#1-000-0500, Drummond, USA)를 사용하여 제조하였다. 유리모세관은 1% 7× 세척제가 첨가된 초음파 세척기에서 세척 후 다시 초음파 세척기에서 초순수 증류수를 사용하여 2회 더 세척하였다. 세척이 끝난 유리모세관은 99.9% 알콜에서 3~5시간 동안 멸균을 한 다음 130℃ dry oven에서 건조 멸균을 하였다. 집게피펫은 집게 puller를 이용하여 뽑은 후 microforge (Alcatel, france)를 이용하여 외경이 100~150 μm 정도일 때 자르고 불에 달구어서 끝부분의 내경이 20~30 μm가 되도록 하였다. 주입피펫 역시 피펫 puller를 이용하여 뽑은 다음 미세연마기 (microgrinder, Narishige, Japan)에서 1~2분 정도 갈아서 내경이 5 μm, 외경이 7 μm, 45도 정도의 각도

가 되도록 제작하였다.

ICSI를 시행하기 위해서 난자 채취 후 즉시, 또는 수시간 후에 0.1% Hyaluronidase를 사용하여 cumulus cells을 제거하였다. corona cells은 150 μm 내외의 피펫으로 제거하였다. cumulus cells과 corona cell이 제거된 난자는 새로운 배양접시에 옮겨서 ICSI 시행전까지 배양하였다.

준비된 집게피펫과 주입피펫을 3차원 유압식 미세조작기 (micromanipulator)에 고정시킨 다음 ICSI를 시행하였다. 미리 PVP drop과 medium drop을 만들어 3~5시간 정도 전 배양시킨다. 각 drop은 Falcon #3002 배양접시에 5~10 μl 정도 크기로 만들며 drop 위는 mineral oil (M8410, Sigma)로 덮었다. 극체가 있는 Mete phase II 상태의 난자만을 골라 5~6개씩 한 drop에 옮겼다. 한 마리씩 운동성이 없게 하기 위하여 정자를 PVP drop으로 옮긴 다음 꼬리부터 주입피펫에 흡입한 다음 난자가 들어있는 drop으로 이동하였다. 난자의 제 1 극체가 12시나 6시 방향이 되도록 집게피펫으로 고정시킨 다음 정자를 난자의 세포질 내로 주입시켰다. 이때 정자 외에 PVP 용액이 되도록 적게 들어가도록 주의하였다. 동일한 방법으로 나머지 난자에 각각 1개의 정자를 주입하였다. ICSI가 끝난 난자는 P1 배양액에서 여러 번 세척한 후 다음날 까지 배양하였다.

5) 난자의 수정확인 및 수정란의 등급

ICSI 후의 과정은 체외수정 후의 과정과 동일하였다. 체외수정 후의 난자의 수정확인을 위해 150 μm 정도의 피펫을 사용하여 물리적으로 cumulus cells과 corona cells을 제거 한 후 손상을 입은 난자가 존재하는지, 2PN이 형성되었는지 등을 자세히 관찰하였다. 깨끗하고 선명한 2개의 전핵이 관찰되고 내부에 핵소체를 함유하고 있는지에 따라서 정상적인 수정으로 간주하였으며, 만일 1PN이 관찰되면 4~5시간 후에 PN의 상태가 어떻게 변하는지를 관찰하였다. 수정이 되지 않은 난자는 가능한 한 신선정자를 이용하여 재수정을 실시하였다. 배아의 질적 등급은 Veek classification system (Veek, 1990 & 1991)⁷에 따라 5단계의 형태학적 등급을 이용하였다.

Grade 1: Pre-embryo with blastomere of equal size and no cytoplasmic fragments

Grade 2: Pre-embryo with blastomere of equal size and minor cytoplasmic fragments

Grade 3: Pre-embryo with blastomere of distinctly

unequal size and cytoplasmic fragmentation

Grade 4: Pre-embryo with blastomere of equal or unequal size and significant cytoplasmic fragmentation

Grade 5: Pre-embryo with few blastomere of any size and severe or complete fragmentation

6) 배아이식 및 임신확인

난할이 확인된 배아는 Tomcat 이식관 (8890-703021, Sovereign)를 사용하였으며 배아이식은 최대 4~5개까지만 하였고 여분의 배아는 5일째 까지 다시 배양하였다. 5일째 포배기 상태의 배아가 형성이 되면 1개만 선별해서 다시 이식해 주고 나머지 배아는 동결보존시켰다. 배아의 자궁내 이식 후에는 최소한 4시간 정도 안정을 취하였다.

임신의 확인은 배아이식 후 제 11일에 혈중 β -hCG의 상승을 보이며, 배아이식 5~6주 후에 질식초음과 검사에서 태낭 (gestational sac) 및 태아의 심장박동이 관찰되는 경우를 임상적 임신으로 판정하였다. 생화학적 임신 (biochemical pregnancy)은 혈중 β -hCG 농도의 상승 후 감소하는 경우로 정의하였으며, 이 경우 임상적 임신의 범주에서 제외하였다. 임상적 임신으로 진단된 환자는 임신 및 분만의 결과를 추적 관찰하여 확인하였다.

7) 수정란의 냉동보존

수정란의 동결보존은 세포냉동기 (Kryo10, Planer, England)를 사용하는 완만 동결법을 이용하였고 2PN, 분할상태의 수정란은 항동해제로 PROH를 사용하였다. 수정란을 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M의 항동해제가 들어있는 배양액에서 순차적으로 각각 5분씩 처리하여 세포 안으로 항동해제를 침투시키고 마지막 탈수분 (dehydration) 과정을 용이하게 하기 위해서 0.2 M의 sucrose를 사용하였다. 탈수분 과정이 끝난 수정란은 straw에 loading 시키고 동결을 시작한다. -7℃까지는 분당 2.0℃로 온도를 떨어뜨린 다음 미리 열려진 forcep을 이용하여 식빙 (seeding)을 하였다. 식빙 후 -39℃까지는 분당 -0.3℃의 속도로 온도를 떨어뜨린 다음 액체질소에 보관을 하였다. 포배기의 수정란은 항동해제로 glycerol을 사용하였고 나머지 freezing 과정은 PROH를 사용한 동결방법과 동일하였다.

냉동보존된 수정란을 융해할 때에는 급속 융해 방법을 사용하였다. 액체질소에서 straw를 꺼내어 상온에서 약 40초간 방치한 다음 32~33℃의 항온 수조에서 ice를 완전히 녹인 후 straw를 잘라 수정란을 회수하였다. 융해과정은 sucrose가 제외된 freezing solution을 역순으로 처리하여 세포내의

Table 1. Comparison of Etiology of Infertility on both groups

	Group 1	Group 2
Tube	9 (34.6)	42 (33.9)
Male	5 (19.2)	31 (25.0)
Endometriosis	3 (11.5)	22 (17.7)
Ovulatory	2 (0.8)	4 (0.3)
Uterine	0	2 (0.2)
Unexplained	6 (23.0)	20 (16.1)
Peritoneum	1 (0.4)	3 (0.3)
Total	26	128

NS

불임의 원인이 2개 이상은 각각의 요인에 포함

항동해제 성분을 제거하였다. 모든 융해과정이 끝난 수정란은 미리 준비된 성장배양액으로 옮긴 후 환자에게 이식을 하였다.

3. 통계처리

SPSS PC+ (for windows, version 7.0, SPSS Institute, USA)을 이용하였으며, $p < 0.05$ 을 통계학적 인 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

D3때 배아이식을 하고 여분의 배아를 동결보존한 군과 동결보존하지 않고 동시 배아이식을 시행한 군간에 불임의 원인을 보면 난관요인이 가장 많았으며 (34.6%, 33.9%) 그외에 남성요인 (19.0%, 25%), 자궁내막증 (11.5%, 17.7%), 원인불명 (23%, 16.1%) 등의 순으로 양군간에는 유의한 차이가 없었다 (Table 1).

양군간의 나이는 31.8세 32세로 차이가 없었다. Metaphase II의 개수도 11.5개, 11개로 유의한 차이가 없었으며, 수정율, 배안분할율, 및 배아이식수에 있어서도 양군간에 유의한 차이가 없었다. 또한 양군에서 배반포까지 배양했을 때 배반포 발달율은 각각 $53.8 \pm 29.5\%$, $30.9 \pm 31.3\%$ 로 Group 1에서 높은 양상을 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 114주기 중 52주기 (45.6%)에서 배반포에 도달하였으며 배아의 숫자로 보면 509개의 배아를 배양시켰을 때 152개 (29.8%)만이 배반포에 도달하였다.

Table 2. Comparison of results on two groups

	Group 1 (n=21)	Group 2 (n=114)	p value
Age	31.8±3.4	32.0±3.3	0.21
MII	11.5±4.7	11.0±4.9	0.68
Fertilization rate	83.3±9.6	78.1±15.4	0.29
Cleavage rate	97.0±4.7	97.8±6.4	0.17
No.of D3ET	4.9±0.9	4.7±0.8	0.07
Balstulation rate (/cycle)	53.8±29.5	30.9±31.3	0.21 (χ^2)
Clinical pregnancy rate (/ET)	6 (28.6%)	15 (28.8%)	0.79 (χ^2)
Multiple pregnancy rate (/ET)	2 (0.9%)	8 (15.4%)	0.74 (χ^2)
Triple pregnancy	0	1	

임상적 임신율의 경우 배아이식 주기당 각각 28.6%, 28.8%로 양군간에 차이가 없었으며, 다태 임신이 경우 배아이식 주기당 0.9% (2/21) 15.4% (8/52)으로 동시 배아이식군에서 높은 양상을 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다 (Table 2).

고 찰

본 연구는 연속적인 배아이식의 타당성을 알아보기 위한 것이다. D3때 top grading의 배아를 이식하고 여분의 배아를 배양시켰으므로 이들의 배반포 발달율은 낮다고 생각한다. 배반포까지 배양한 114주기 중 52주기 (45.6%)에서 배반포에 도달하였으며 배아의 숫자로 보면 509개의 배아를 배양시켰을 때 152개 (29.8%)만이 배반포에 도달하였다. Fisch 등 (1999)⁸의 125주기 중 60주기 (48%)에서 배반포까지 배양한 결과와 거의 비슷한 결과이다. 그러나 위 저자들의 연구에서는 D3때 먼저 배아를 이식하고 여분의 배아를 배양하여 모두 동결보존하여 배반포까지 자란 군에서 임신 성적이 좋게 나올 수 있는 것을 미리 예측하는 연구이기 때문에 본 연구와는 차이가 있다. Balabam 등 (1998)⁹의 연구에서도 배반포까지 자란 군에서 임신율과 다태임신이 증가함을 보고하였으나, 국내의 지 등 (1999)¹⁰은 여분의 배아가 배반포에 도달하였을지라도 이미 이식된 배아가 임신이 되는지는 예측할 수 없다고 하여 아직까지는 논란의 여지가 있다.

최근에 sequential 배양액의 발달로 인하여 배반포까지 배양시키는 노력들이 이루어지고 있다. 인

간의 배아는 발달단계마다 필요한 영양분을 필요로 하는데, 에너지원으로서 pyruvate와 lactate는 난관내 고농도로 존재하며, glucose는 자궁에서 고농도로 존재한다. 배반포 발달단계에는 glycolysis를 위하여 glucose를 사용한다. 이러한 이론적 근거하에 초기배아 발달단계와 후기배아 발달을 위하여 다른 에너지원의 배양액을 사용하여 50% 이상의 배반포 발달을 및 50% 정도의 착상율을 보고하고 있다.¹⁻³ 또한 Schoolcraft 등 (1999)⁴은 G1.2과 G2.2를 이용하여 배아이식당 48%의 착상율과 주기당 66.3%의 지속임신율을 보고하였다. 그러나 배양상 문제가 있는 연구실에서는 아직은 배반포 발달이 낮기 때문에 모든 환자에 적용하는 것은 무리가 있다. 실제로 국내의 마리아 연구진들에서는 2PN이 7개 이하이고 난자 채취 후 이틀째 관찰하여 좋은 질의 배아가 2개 이하인 경우에는 D3때 최고 4개까지 이식하고 2PN이 8개 이상이거나 좋은 질의 배아가 3개 이상이면 5일째까지 배양시켜 배반포 배아이식을 하고 남은 배아는 냉동시키며, 3일째에도 이식하고 남은 배아는 5일째까지 키워서 역시 동결보존 시킨다고 하였다.¹¹ 이러한 정책은 각 연구실의 배양 여건에 의하여 결정되어야 한다.

본 연구에서는 후발주자의 배아가 발달하여 배반포까지 발달하였을 때 이들의 착상능력이 과연 높을까?에 대한 부정적인 해답을 제시하였다. 즉 D3때 top grading의 배아를 이식한 군과 임신율에 있어는 차이가 없었다. 이러한 사실로 볼 때 top grading의 배아를 배반포까지 배양시켜 이식하는 선별적 배반포이식의 성적은 본 연구에서는 비교

하지 않았지만, 이 등 (1998)¹²은 선택적 배반포이식이 D3 이식보다 임신율이 높다고 보고하였으며 (53.6% : 38.3%) 다태임신 중 삼태아의 발생빈도가 낮았다 (13.2% : 27.5%). 본 연구의 임신율이 다른 연구의 결과에 비하여 낮은 원인은 최근에 배반포이식을 시작했기 때문에 아직은 경험부족에 기인한 것이라고 본다.

본 연구의 결과로는 임신의 성공 여부는 D3 배아의 질과 밀접한 연관성이 있다는 것을 증명하는 것이라고 생각된다. 이는 zygote가 배반포까지 발달할 수 있는 능력은 embryonic genome 또는 유전자 활성화에 의하여 영향을 받을 수 있다라는 Braude 등 (1988)¹³의 연구와 일치한다고 하겠다. 또한 Menezo 등 (1995)¹⁴은 배아발달이 정지된 배아는 염색체 이수체나 모자이시즘의 비율이 높다고 하였다.

Top grading을 먼저 배아이식하고 여분의 배아를 배양시켜 이식시키는 방법이 임신율의 증진을 보이지 않은 것으로 봐서 D3때 top grading을 한번만 이식하던가, 아니면 top grading을 모두 D5까지 배양시켜 1~2개의 배반포만 이식시키는 것이 다태임신의 합병증을 예방하는데 좋을 것으로 사료된다.

결 론

양군에서 수정율, 배아분활율 및 임상적 임신율은 통계학적인 차이가 없었다. 이상의 결과로 3일째와 5일째 두번 배아이식을 시행한다고 해서 임신율이 증가되지 않았으며, 오히려 다태임신의 위험성이 증가하는 경향을 보였으므로 동시 배아이식 보다는 한번의 배아이식을 시행하는 것이 좋을 것으로 사료된다. 이상의 결과로서 임신율은 3일째 배아의 상태와 밀접한 관계가 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Gardner DK, Phil D, Vella P, Lane M, Wagley L, Schenker T. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998; 69: 84-8.
2. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective random-

- ized trial of blastocyst culture and transfer in in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13: 3434-40.
3. Jones GM, Trounson AO, Gardner DK. Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod* 1998; 13: 169-77.
4. Schoolcraft WB, Gardner DK, Lane M, Schlenker T, Hamilton F, Meldrum DR. Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. *Hum Reprod* 1999; 72: 604-9.
5. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1992; 67.
6. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Rombarb CJ, Van der Merw JP, Van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986; 46: 1118-23.
7. Veeck L. Preembryo grading. Atlas of the human oocyte and early conceptus (vol 2): preembryo grading. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991; 121.
8. Fisch JD, Milki AA, Behr B. Sibling embryo blastocyst development correlates with the in vitro fertilization day 3 embryo transfer pregnancy rate in patients under age 40. *Fertil Steril* 1999; 71: 750-2.
9. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Nuhoglu A. Progression of excess embryos to the blastocyst stage predicts pregnancy and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 2564-7.
10. Jee BC, Suh CS, Kim SH, Choi YM, Kim JG, Moon SY, et al. The ability of the Non-transferred, surplus embryos to form blastocysts cannot predict pregnancy success of transferred embryo. 1999 Nov 26; 대한불임 제38차 학술대회 P-35.
11. 이원돈. 인공수정, 체외수정기술의 임상적 이용. 99 마리아 합춘 심포지움. 1999; 158-75.
12. 이원돈, 김규현, 이성구, 이해경, 조현진, 김은영 등. 체외수정기술시 포배기 배아이식에 관

한 연구. 대한산부회지 1998; 41: 392-8.

13. Braude F, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the 4- and 8-cell stages of preimplantation development. Nature 1988; 332: 459-61.

14. Menezo YJ, Ben-Khalifa M. Cytogenetic and cryobiology of human cocultured embryos: a 3-year experience. J Assist Reprod Genet 1995; 12: 35-40.