

In Vitro Fertilization and Embryo Transfer Program과 한국에서의 문제점

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과
정순오 산부인과 원장

배 인 하 · 정 순 오

최근 몇년전부터 한국에서도 In Vitro Fertilization - Embryo Transfer Program (IVF-ET)에 대한 논의가 있어왔다. 현재 몇몇 종합병원 및 개인 산부인과 의원에서 수십 명의 난관 유착환자를 위한 IVF가 시도되었으나 아직까지, 한건도 성공되었다는 보고는 없다. 몇 십명이 실험적 모델로 제공되었으나

한 건의 성공 사례도 없었다는 것은 문제점이 있는 것이 분명하며 이러한 한국에서의 문제점을 시설 문제와 전문가 또 IVF 과정에서의 technical problem등을 종합해서 다루어 보고져 하는 것이 본 논의의 주제임을 먼저 밝혀둔다.

서 론

IVF program이 가장 처음 시도된 것은 Edwards, Steptoe and Purdy(1970), 및 Edwards, Bavister and Steptoe(1969)가 human oocyte의 in vitro fertilization을 하기 시작한 이후, Edward and Steptoe (1978)가 IVF program을 성공시켜 Louise Brown 양이 탄생되기 9년 전으로 거슬러 올라간다. Australia에서는 1980년과 1981년 처음으로 live born 탄생되었고 (Trounson, 1982; Lopata, 1980; Trounson 1981) 미국에서는 Virginia 의과대학에서 처음으로 IVF-ET program으로 아기를 탄생케 했으며 (Jones et al, 1982) 1983 말까지 세계적으로 250 case가 성공해서 아기를 출생 시켰다 물론 이들이 human follicular oocytes를 재료로 IVF를 시작하기 전 Edwards (1962)는

biologist로서 많은 동물 실험에서 난자를 다루는데 필요한 Pipetting technique 과 culture technique 등을 능숙히 익혀 난자 성숙에 관한 연구를 직접 하였으나 인체를 다루는 의사는 아니었다. 단지 IVF를 시작하려니 human material을 다루는 임상의사인 Steptoe의 도움을 필요로 했고 임상의사의 협조가 요청되었던 점이 현재 우리나라에 서와는 그 반대의 입장이었다. 우리 나라는 산부인과 의사들의 동물 실험에 대한 기본지식이 부족하고 또 이러한 기초연구를 해왔던 사람은 거의 없었던 것으로 알고 있고 현재로는 몇몇 임상의사가 IVF-ET program과 연관시켜 기초 연구를 하고 있거나, 하려고 시도하고 있는 실정이기 때문이다. 처음의 두 논문에서 Edwards가 first author인 것만 보아도 Edwards가 의사인 Steptoe의 협조를 필요로 했음을 알수 있다. 현재 우리 나라에서도 이러한 IVF

를 위한 임상의학의 관심과 노력이 점점 고조되고 있음은 극히 좋은 현상이며 보다 많은 임상학자들이 기초 연구에 많이 참여해 노력한다면 좋은 결과를 가져올 수 있으리라 믿어지나 구미 선진국에서의 기초연구에 관여하고 있는 수나 비율 그리고 그 열성의 관점에서 본다면 아직도 우리의 비율은 매우 낮다고 사료된다. 구미의 의과대학에는 의사가 아닌 기초연구자(생물, 화학, 물리, 약리, 병리)가 연구에 얼마나 많이 참여하고 있으며 심지어 의과대학에서의 해부학 강의도 의사가 아닌 Ph.D.들이 많이 담당하고 있으며 실제 어떤 의과대학은 기초부문의 faculty member 들의 반수 이상이 Ph.D. 들이라는 점 또한 중요한 사실이라고 하겠다. 이렇게 함으로써 Ph.D.와 M.D.의 협조가 잘 이루어져 좋은 연구 결과를 기대할 수 있기 때문이다. 또 한편 구미에서는 의사들이 기초 연구에만 종사하는 사람들이 얼마나 많은가 하는 점이다. 이러한 문제는 현재 우리나라 의과 대학이나 임상학자들의 생각처럼 의술이 단독으로 가능하다는 생각을 고쳐야 할 점이라 생각된다. 즉 의학이란 생물, 화학, 물리 등의 기초연구 과정을 거친 응용 과학이란 점을 전혀 인식하지 않은 점에서 기인하는 것이 아닌가 여겨진다. 예를 들면 마취약을 개발할 때도 바로 임상실험에 들어가지 않는다. 동물 실험을 거쳐서 모든 생리적 효과에 대한 연구를 거친 후 인간에게도 적용할 수 있다고 판단될 때 비로소 임상에 들어 가며, 의학에로의 응용이 되기 시작한다. 이 이전의 기초에 대한 것은 기초 과학 연구자들의 연구결과 얻은 자료와 현상을 의사들이 단지 인간에게로 응용한다는 응용 과학이란 점을 인식하지 않은 데서 구미의 실정과 우리나라의 실정이 다른점이라 하겠다.

장 비 시 설

1) 배양실은 laparoscope 방과 인접해 있어야 한다. 배양실은 laparoscope 를 이용해 얻은 난자를 수정 및 배양시키는 곳으로 이것은 laparoscope 를 하는 방과 창을 사이로 두고 있는 위치이면 더욱 좋다. 이것은 우선 사

용하는 기구, 난자, 또 배양기기가 계절에 따라 온도의 영향을 받지 않아야 한다는 점에서도이다. 즉 여포로부터 회수한 난자를 멀리 떨어져 있는 배양실로 옮기는 도중 소요되는 시간등이 짧으면 짧을수록 좋다는 점이다. 이것은 Sato et al(1980) 이 포유류인 소, 돼지 등의 난자배양에서 밝혔듯이 회수된 난자를 체온보다 낮은 온도에 노출시킬 때 난자의 정상성숙이 일어나지 않으며, cold shock 를 주면 어떤 종류의 난자라도 fragmentation 및 parthenogenesis (처녀생식)이 일어나기 때문이다. 그래서 배양실은 바로 laparoscope 방에서 창을 사이에 두고 온도 영향을 받지않고 쉽게 옮길 수 있는 가까운 방이면 더욱 좋은 조건이 된다.

2) 배양은 멸균된 방이 좋다. 배양실은 멸균된 공기가 유통되는 방이면 contamination 될 확률이 적어진다. 그러나 반드시 laminar flow hood 를 통한 여과된 공기가 유통되는 방이라야만 하는 것은 아니다. 여과된 공기가 순환되지 않는 방이라 하더라도 사용치 않을 때는 U.V light 로 멸균시키고 또 방내의 모든 기구는 사용전·후 70% alcohol 로 닦아내면 아무리 여름철이라 하더라도 contamination 이 일어나지 않았던 것이 20여년간의 경험이다. 또 한달에 한번씩 배양실내 모든 기구 및 방벽등을 알코올로 닦아 청소를 해주는 것도 contamination 을 방지할 수 있다.

이 배양실은 항상 온도를 37°C 정도로 조절할 수 있는 방이면 가장 이상적인 배양실이라 하겠다. 이것은 난자 또는 수정난을 incubator 밖에서 몇 시간씩 다루게 되는 관계로 가급적 온도 영향을 받지 않기 위한 방법이기 때문이다.

이러한 배양실 준비가 되지 않으면 25°C 정도 유지되는 방으로 stereomicroscope 및 Phase contrast microscope 등에 heating block 를 부착시켜 oocyte 를 관찰할 때 현미경의 stage 에서 cold shock 를 받지 않도록 하는 방법도 있다. cold shock 는 될 수 있는 한 영향을 받지 않도록 하는 것이 최선의 방법이고 가급적 방의 습도 또한 60% 이상 유지되는 방이면 좋다.

3) 기구(해부 현미경, inverted phase microscope, video equipment)

a) 해부 현미경 : IVF 및 ET(embryo transfer)시 난자 및 embryo를 현미경 하에서 handling 및 관찰을 하기 때문에 $\times 120 - \times 150$ 정도의 배율을 가진 현미경이면 좋으나 배율이 높을수록 좋다. Wild, Olympus, Nikon 등에서 나오는 것이면 족하고, 사진을 찍기 위해서 triocular type 이라야겠다. 그래서 사진촬영도 가능한 것이면 좋겠다. 필수조건 중의 하나이다.

b) inverted phase microscope 혹은 differential interference contrast microscope : 해부 현미경으로는 상세히 관찰할 수 없는 상태의 난자나 embryo를 이들 현미경을 사용해서 배양접시를 바로 올려 놓고 관찰할 수 있으므로 난자 및 embryo를 아주 상세히 관찰할 수가 있다. 또 정자의 motility 등의 관찰에도 사용된다. 이 현미경도 필수 조건중의 하나이며 아주 편리한 기구이다. 특히 embryo 관찰시 cleavage 상태를 관찰하기 위해서는 꼭 필요한 현미경이다.

c) video equipment : 실제 난자나 embryo를 handling 하는 당사자와 다른 사람들도 관찰하고 연구하기 위해서는 필요하다.

d) 배양기 : 온도 조절이 가능해야 하며 gas flow meter가 부착된 model 이라야 하고 가능하면 CO₂ jerk equipment가 되어있는 것이면 좋겠다. 습도는 100%로 유지되어야 하기 때문에 이들 gas mixture를 멸균된 증류수 속을 두어번 정도 통과시킨 후 incubator 내에 확산하도록 하면 된다. 그러면 습도도 100% 유지된다.

e) gas mixture : 대체로 두 가지를 사용한다. 첫째는 5% CO₂, 95% air, 둘째 5% CO₂, 95% N₂, 이들 두 가지 gas mixture 중 어느 것을 사용해도 무방한 것으로 되어 있고 조금의 변화는 큰 문제가 되지 않으나 5% CO₂는 배양액의 pH를 유지하는데

꼭 필요하기 때문에 꼭 지키는 것이 좋겠다. 현재 여러 IVF-ET center에서 이들 중 어느 한가지를 사용하고 있으며 이들 사이에 pregnancy rate나 fertilization rate에 아무런 차이가 없는 것으로 나타나고 있다.

f) osmometer : 배양액의 osmolality를 맞추어 주기 위한 필수품 중의 하나이다.

IVF-ET program에서 사람 혈액의 osmolality는 294 mOsm/kg으로 되어 있다. 여기서 배양액으로 사용하는 것은 대체로 합성 배양액이다. 7.5% 혹은 15% serum을 넣어서 사용하는 것으로 100% serum은 사용하지 않는다.

포유동물의 난자나 embryo 배양에는 280 mOsm/kg이 적당한 것으로 나와 있다.

(Base and Foote, 1980 ; Brinster 1964) osmolality를 감소시키기 위해서는

$$\frac{\text{volume}}{\text{desired osm}} - \text{volume} = \frac{\text{volume}}{\text{actual osm}}$$

to be added by distilled water. Osmolality를 증가시키는 방법으로 5% NaCl 용액(1710.68 mOsm)을 사용해서 $\text{volume} \times \text{actual Osm} + \text{standard mOsm} \times \text{volume} = \text{desired mOsm}(280) \times \text{volume}$. 식으로 계산한다. 계산 상으로 각 배양액의 osmolality를 맞추어서 만들 수 있으나 실제 osmometer를 사용해서 측정해 보면 계산상의 osmolality보다 항상 40~50 mOsm/kg 적게 나타나고 있다. 이 이유는 아직 정확히 모르고 있으나 시약의 순수성에도 원인이 있지 않을까 추정되고 있다(Bae and Foote 1980). 또 한가지 이유로는 mouse embryo(Whitten, 1971) 배양에는 250~280 mOsm가 적당한 것으로 나와 있고 Brinster(1965)는 276 mOsm이라고 주장하고 있다. 난자 배양에는 햄스터(Gwatkin & Haidri, 1973) 285~295 mOsm 돼지(McGaughey, 1977) 285 mOsm 토끼(Bae, 1980)는 280 mOsm(250 mOsm~310 mOsm)이라고 주장하고 있다. 약간씩의 차이

는 있으나 대체로 포유류인 경우 280 mOsm 근 처라고 판정된다. 실제 이러한 optimum osmolality는 serum의 osmolality보다 낮은 값을 나타내고 있다. 대개의 commercial media로 290 mOsm/kg으로 조정된 것이라고 명시하고 있으나 규정대로 H₂O를 가해 만들어 보면 어떤 경우는 350 mOsm/kg에서 260 mOsm/kg으로 나타나는 것을 필자는 여러 번 경험했기 때문에 꼭 osmometer로 배양액을 만든 후 check해야 한다고 생각한다.

배양액의 pH; mouse oocyte의 fertilization시 배양액의 pH는 7.3 ~ 8.0 사이가 적당한 것으로 알려져 있고 (Miyamoto et al, 1974) hamster oocyte의 경우 7.4라고 보고하고 있다 (Bavister, 1981). pH의 경우도 어떤 strict point가 요구되지 않고 있다. 지방 혹은 국가에 따라서 증류수도 몇 차까지 증류한 것이 요구되는 나라가 있으나 우리나라의 경우 수질이 좋으므로 3차 증류수 정도면 괜찮을 것 같다.

g) centrifuge; 원심 분리는 high power는 필요치 않고 table-top centrifuge로도 충분하다. 실제로 정자를 준비하기 위해서는 600 g에서 6분 정도 원심 분리하면 되기 때문에 즉 1,000 rpm 정도가 나오면 충분하다. 이것은 정자를 준비할 때 사용된다.

h) CO₂ analyzer: 배양기로 들어오는 gas mixture의 CO₂를 분석하기 위한 것으로 전술한 바와 같이 5% CO₂를 유지시키는 것은 gas regulator나 flow meter 만으로는 충분치 않기 때문에 CO₂ analyzer가 있어 check 하면 충분한 조건을 갖출 수 있겠다. 이것도 필수품 중의 하나이지만 quality control에서 아무 이상이 없으면 괜찮다.

i) 기타 다른 기구: pH meter나 chemical balance 등은 실험실의 가장 기본 요건이므로 갖추어야겠다. hemocytometer는 정자 수집후 정자 농도를 정해야 하기 때문에 필요하다. 정류기로 합성 배양액을 만들기 위해서는 2 X 정도까지 뽑을 수 있는 정류기로도 충분하다.

배양액 (난자, embryo 및 정자의 washing 및 insemination에 사용하는 배양액): Ham's F-10 medium 1 l에다 75 mg penicilline 50 mg streptomycin을 넣고 Ca-lactate 242 mg Na-bicarbonate 2.106 gm을 넣어서 280 mOsm/kg으로 조정한다. 배양액에 glutamine이 들어 있지 않은 medium에는 2 mM 첨가하는 것이 좋다 (Bae and Foote, 1975) 배양액으로 사용하는 것은 시중에서 구입할 수 있는 Ham's F-10, TC 199, Earle's balanced medium 등의 구성 성분이 많아서 복잡한 medium도 좋고 실험실에서 쉽게 만들어서 사용할 수 있는 simple chemically defined medium 등으로도 충분한 것으로 나타나고 있으나 Quinnet, al (1984)은 Tyrode sol, modified Krebs - Ringer bicarbonate sol과 좀더 복잡한 Ham F-10, Earle's balanced salt solution 사이에 아무런 차이가 없다고 주장하고 있다. IVF-ET program에서는 Ham's F-10이나 TC 199를 사용하는 경향이 있다. 그래서 이런 media에다 환자의 혈청을 얻어 oocyte washing이나 oocyte culture, embryo culture 등의 용도에 따라 serum을 7.5% ~ 15%로 배양액에다 섞어 준 다음 millipore filter로 꼭 pressure filtration을 하고 사용한다. vacuum filtration 방법은 filtration 전 pH를 맞추어 놓아도 filtration 후 vacuum 정도에 따라 pH가 많이 변하기 때문에 좋지 않고 pH 조정을 다시 해주어야 하는 번거로움이 있다.

Serum 만들기: 환자의 혈액을 채취하여 clotting시켜 serum만을 채취한 다음 이 serum을 55 °C ~ 56 °C에서 30분간 water bath에서 가열해서 inactivation을 시켜야 한다. 이것은 serum내의 complement 성분을 inactivation시키기 위한 것이므로 꼭 거쳐야 하는 단계이다. 이렇게 serum을 inactivation시킨 후 autoclave시킨 millipore filter (0.45 μm)로 멸균한 다음 4 °C에서 보관하고 사용시 마다 적당량을 채취해서 사용하면 된다. millipore filter 0.22 μm은

pressure filtration 으로는 아주 힘이 들기 때문에 0.45 μ m를 사용하는 것이 좋다. IVF 에서 사용되는 serum으로는 fetal cord serum이 maternal serum보다는 pregnancy rate 를 증가시켜 준다고 Leung et al.(1984) 은 추정하고 있다. 그러나 실제로 fertilization rate 및 embryo development rate 에는 아무런 차이가 없고 fetal cord serum을 사용했을 경우 embryo 가 보다 건강한 상태를 유지한 것이 pregnancy rate 를 증가시킨 원인이 라고 보고 있다.

한편 Menezo et al.(1984)은 fetal cord serum과 human serum albumin(HSA)을 비교한 바가 있다. fetal cord serum은 in vitro fertilization medium에는 8% 그리고 growth 및 E-T에서는 16% 사용하였고 HSA는 1%를 공히 사용한 결과 fertilization, cleavage 및 pregnancy에 아무런 차이가 없다고 보고하고 있다. 그러나 culture medium에 nitrogen source는 분명히 있어야 하기 때문에 (Brinster, 1965) purified HSA나 fetal cord serum 중 어느 하나는 필히 들어 있어야 한다. 이것은 비단 생쥐에서 만이 아니라 포유류 embryo에서 공통되는 점으로 nitrogen source 대신 polyvinylpyrrolidone, acacia, dextra 및 ficoll 등의 polymer를 넣었을 때 보다는 훨씬 좋은 결과를 가져오기 때문에 nitrogen source로 fetal cord serum이나 purified HSA은 반드시 넣어야 한다. 이들의 IVF-ET program에서 배란 유도로 clomiphene citrate(C.C)를 주사하였는데, 상당량의 C.C가 아직 serum속에 남아 있을 가능성이 있고 또 이 C.C는 서서히 배설된다는 Achreiber et al.(1966)의 보고도 있고 Thomson(1968)은 생쥐 배에 C.C가 해로운 효과를 주고 있다는 보고 등으로 보아 maternal serum속에 남아 있는 C.C 때문이 아닌가 추정하고 있다. 또 한가지 이유로는 이런 두 serum 사이의 growth factor, steroid hormone 및 알지 못하는 단백질 성분들의 차이등이 또 하나의 원인이 아닌가 추정하지만

이 중에서 어느 것이 factor가 되는지는 모르고 있다. 이러한 결과로 미루어 보면 아직은 충분한 data가 없어 결론을 내리기에는 이르지만 maternal serum 특히 배란 유도를 위해 clomiphene citrate를 사용한 부인에게서 채취된 serum 보다는 fetal cord serum이 더 좋을 것으로 추정되고 있다.

Sperm washing media and insemination : Ham's F-10 media 92.5ml에 환자의 serum(fetal cord serum이 없을 경우) 7.5 ml을 섞은 다음 전술한 것처럼 0.45 μ m millipore filter로 pressure filtration한다.

oocyte washing and collection medium : 이 medium은 많은 양은 만들 필요가 없고 15 ml 정도 만들면 된다. Ham's F-10 medium 12.75ml과 환자의 serum 2.25 ml을 섞어준 다음 pH를 맞추고 pressure filtration시킨다. 앞서 언급했듯이 Ham's F-10 medium과 TC 199은 그 구성성분이 다양한 반면 tyrode sol 및 modified krebs - Ringer sol은 단순하지만 이들 medium 사이에 아무런 차이가 없다는 Quinn et al. (1984)의 결과로 어떤 medium이나 커다란 차이가 있다고 생각되지 않으므로 꼭 Ham's F-10을 사용할 필요는 없다고 본다. 그러나 여기서 편이상 Ham's F-10으로 대체하겠다.

transfer medium : 난자를 수집해서 washing medium에서 washing한 다음 수집된 정자와 배양액에 함께 넣어 수정시킨 다음 자궁에 넣어 줄 때 사용하는 medium으로 이 때는 Ham's F-10 3ml과 환자(여자)의 serum 3ml을 섞어 50% serum이 되는데 이것은 높은 농도의 serum을 넣어서 ET medium의 viscosity를 증가시켜 주므로써 transfer시 egg loss를 방지하기 위한 것이다. pH를 조정된 다음 pressure filtration시킨다. 배양액에서 회수된 embryo를 몇번 Transfer medium에서 washing한 다음 ET catheter에다 air pocket buffer space를 만든 다음 사용한다. 그림 1, 그림 2에서 처럼 M과 A 사

이에 air pocket 을 각 $10\ \mu\ell$ 정도씩 Hamilton syringe 로 조정하는 것이 좋다. 이러한 air pocket 을 만들어 주는 것은 transfer 시 압력을 방지하는 효과와 또 uterine fluid 가 catheter 안으로 들어오지 않도록 하는 효과를 얻기 위한 것이다. 상기의 모든 medium 을 만들어 incubator 내에서 cap 을 느슨하게 닫고 $37\ ^\circ\text{C}$ 에서 적어도 사용전 1~2 시간 정도 equilibrium 상태를 만들어 사용해야 하고 pH 는 $7.3\sim 7.5$ 정도 유지하면 된다. pH 조정을 쉽게 하기 위해 phenol red 를 Ham's F-10 에 넣어서 ($1\text{ml}/1\ell$) pink color 가 유지되면 이런 pH range 에 들어가므로 쉽게 육안으로도 구분할 수 있다.

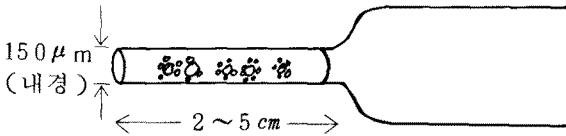


그림 1. Pasteur pipette 의 끝 부분속에 몇 개의 난자가 배양액과 함께 들어 있고 끝 부분은 90° 로 깨끗이 cutting 되어 있다.



그림 2. Embryo transfer catheter 의 앞쪽 부분을 옆으로 본 그림으로 제일 앞쪽 M은 $10\ \mu\ell$ 정도의 transferring medium 다음 A는 $10\ \mu\ell$ 정도의 air 층이며 가운데 $10\ \mu\ell$ 의 medium 에는 수정된 배 (2-cell stage 이상) 가 들어 있으며 air 층 다음에 다시 medium 층을 나타내고 있다.

tissue culture plastic ware(culture dishes for the in vitro oocyte culture, in vitro fertilization and embryo culture) : 배양시 난자를 위한 용기로는 plastic culture dish 를 이용하고 있는데 제품으로는 수입품 Falcon 사의 제품으로 여러가지 size 가 나온다. test tube type 보다는 dish type 이 fertilization rate 를 높혀 준다는 Marrs et al (1984) 의 결과로 미루어 dish type 을 사용하는 것이 좋겠다.

dish type 이 incubator 안에서 표면적이 넓어 gas equilibrium 이 더 잘 일어나서 그런 것이 아닌가 추정하고 있다. 그리고 sperm preparation 으로는 centrifuge tube 를 사용해서 sterile culture medium 하에서 준비한다. 정자를 바로 collection 한 후 insemination 용으로도 사용할 수 있어 특수한 용기는 필요없고 oocyte 및 embryo culture dish 에다 sperm counting 만 맞추어 난자 하나에다 일정량의 sperm 을 넣으면 된다.

이 때 human sperm capacitation 은 culture media 에서도 5~6 시간 동안에 충분히 일어나기 때문에 capacitation 을 위해서 거추장스럽게 자궁이나 난관에 넣지 않아도 바로 culture dish 에서 fertilization 이 충분히 잘 일어나고 있다. sperm 을 남편에게서 받은 후 $37\ ^\circ\text{C}$ 에서 liquify 시킨 다음 10ml 정도의 sperm washing media 에 섞어 600g 에서 6분 정도 원심 분리하여 상등액을 버리고 다시 sperm washing medium 을 10ml 정도 가해서 한번 더 원심분리한다. 역시 상등액을 버리고 insemination medium 을 넣어 sperm counting 을 적당 수 $50,000/50\ \mu\ell$ (정상적인 normal sperm 인 경우)로 하고 $500,000/50\ \mu\ell$ (oligo spermia 인 경우)로 dilution 해서 $37\ ^\circ\text{C}$ 에서 보관했다가 사용한다. 정자를 일단 냉동 보관하기 위해서는 냉동용 medium 을 따로 사용해야 하기 때문에 번거로움이 있다. 실제로 냉동 보관한 정자를 사용할 경우 Behrman & Sawda(1966) Sherman(1973) 및 Beek(1978) 등은 fertility 는 떨어진다고 하며 이

러한 냉동 보관한 정자를 전자현미경으로 보았던 Mahadevan & Trounson(1984)은 냉동 보관 후 정자의 sheath membrane이 심하게 변형되어 있었고 또 이러한 membrane이 심하게 변형된 정자의 경우 fertility도 아주 떨어진다고 결론 지우고 있어 가끔씩 냉동 보관한 정자를 사용하기 보다는 freshly ejaculated sperm을 사용하는 것이 보다 확률을 높이는 결과가 되겠다.

ovulation induction and oocyte preparation : ovulation은 natural ovulation (cyclic ovulation) 및 hormone treatment를 사용한 induction ovulation 두 가지로 나눌 수 있다. IVF-ET program으로는 natural ovulation은 이미 ovulation day를 정하기전 몇 cycle을 계속 추적한 다음 정할 수 있기 때문에 조금 난점이 있고 시간이 많이 필요하다.

둘째, hormone treatment로 ovulation induction해서 사용하는 방법이 IVF-ET program에서 많이 사용되고 있어 이에 대해서는 산부인과 의사들이 할 수 있으나 정확한 ovulation을 정하는 것은 endocrinologist가 하여야 됨을 지적하고 싶다. multiple follicle stimulation 방법은 natural ovulation에 비해 하나의 장점이 있다. 즉, HMG 및 HCG 처리는 early luteal phase에서 progesterone의 농도가 높은 관계로 uterine endometrium의 발달이 빠르며 implantation을 더욱 용이하게 한다는 것이다 (Garcia et al. 1984). 또 이들은 spontaneous ovulation에서 embryo가 uterine에 도달하는 시간은 72-96시간 이후이나 IVF-ET에서는 대체로 laparoscopy 후 대체로 52시간 범위내에 들어가기 때문에 이러한 endometrium의 early preparation 때문에 embryo implantation이 용이하게 된다고 설명하고 있다. 즉 superovulation에 있어서 hormone treatment 전후 환자의 혈청을 뽑아 혈청내 estrogen의 양, progesterone FSH 및 LH 양을 미리 측정한 후 정할 수 있다. ovulation

이 일어나는 것은 clomiphencitrate 혹은 human menopausal gonadotropin(HMG) 처리후 혹은 동시에 human chorionic gonadotropin (HMG) 처리후 36~38 hr 후에서 배란이 일어나기 때문에 배란 바로 전 난자를 laparoscope를 이용해 난자를 채취하는 것이 적당한 시간으로 밝혀져 있으나 (Lopa et al. 1978) Steptoe 및 Edwards는 MII 시기의 난자를 채취하는 시간을 29~38.5 hr로 발표하고 있다. 이러한 clomiphencitrate, human menopausal gonadotropin을 주사하는 것은 많은 수의 여포를 성장시켜 될 수 있으면 많은 수의 난자를 채취하기 위한 방법으로 주로 사용되고 있다. Quigley et al. (1984)은 clomiphene 단독으로 보다는 clomiphene plus human menopausal gonadotropin의 combination treatment로 보다 많은 수의 난자를 얻을 수 있으나 pregnancy rate에는 하등의 유의한 차이를 볼 수 없었다고 주장하고 있다. 그러나 이러한 super ovulation 방법으로 하나 이상의 fertilized egg를 uterine에 transfer하는 결과가 되어 pregnancy rate가 높아지는 것은 사실이나 이렇게 많은 수의 embryo를 transfer하므로써 pregnancy rate가 높아지는 것인지 아니면 이런 super-ovulation으로 인한 implantation에 advantage가 있는지 여부는 아직 밝혀지지 않고 있다. 또 한편 HMG 및 HCG 주사의 interval이 길수록 그만큼 많은 degeneration oocyte를 얻기 때문에 마지막 HMG 주사와 동시에 HCG를 주사하는 것이 보다 난자를 퇴화 과정에서 구제하고 있다고 설명하고 있다. 여기서 하나 주의할 것은 환자의 개인 차이가 많아 많은 case를 통한 시간별로 본 것 평균치가 29~38.5 hr인 점은 주의해야 한다. 대체로 HCG 처리후 36 hr 후 난자 채취를 할 때 이때가 바로 배란전 시간이기 때문에 난자가 성숙에 도달해 있고 배란 바로 직전이기 때문에 in vitro fertilization이 가장 적절한 시기란 점이다. 즉 난자가 chromosomal phase로 분명히 MII 시기에 도달해 있지만 시간차이에 따

른 cumulus cells, follicular fluids factor 등으로 in vitro fertilization 에서 정자의 penetration 은 일어나나 이 이후의 cleavage 및 blastocyst formation 시 난자의 chromosomal phase 외에 cytoplasmic factor, steroid hormone 등으로 인해 cleavage 및 blastocyst formation 이 일어나는 율이 아주 떨어지고 있어 이러한 현상은 사람의 난자 뿐 아니라 모든 포유동물의 공통된 현상으로 이 점에 대해서는 Staigmiller and Moor(1984) 의 논문을 참조하기 바란다. Fishel et al. (1984) 에 의하면 자연배란의 경우 Oocyte 채취는 oocyte ripeness 에 의하기 때문에 시간 차이가 많이 나타나는 것도 설명하고 있다. 여기서 한가지 더 언급해야 할 것은 배란전 여포에서 성숙된 난자를 채취후 검경하고 정자와 섞어 in vitro fertilization 시킬 때 난자 주위의 cumulus cell 및 granulosa cell 의 steroid production 이 있기 때문에 cytoplasmic maturation 및 normal fertilization 이 일어난다는 점도 간과해서는 안된다. 그래서 난자 채취 technique 또한 무시할 수 없는 factor 중의 하나라고 생각된다. 여하간 상기의 몇가지 논문에서 지적되었듯이 IVF-ET program 을 위해 난자 채취시기는 배란에 가까운 시간일수록 좋고 이 배란을 정하는 것은 estrogen, progesterone 및 LH assay 를 통해서 정확히 알 수 있어 endocrinologist 들이 해야 한다는 점과 난자의 완전한 성숙- chromosomal pattern 으로 본- MII 시기에 이에 수반된 cytoplasmic maturation 이 일어난 난자일수록 좋다. 실제 난자 채취후 1st polar body 확인과 chromosomal pattern 은 differential interference contrast microscope 을 통해 확인할 수 있으나 cytoplasmic maturation 은 확인 방법이 없고 또 그런 방법이 고안되어 있지 않고 있어 cytoplasmic maturation 이 일어나야 하는 것은 필수적이기 때문에 될수록 배란 바로 직전에 난자채취를 할 경우 cytoplasmic maturation 은 일어난 것으로 간주되고 있다.

배란전에 난자를 follicle 에서 채취해야지 배란이 일어난 후에 배란된 난자를 찾는 곳은 난관 입구나 복강이기 때문에 (쥐나 생쥐에서 처럼 ovarian sac 이 사람과 토끼에서는 없기 때문에) 극히 어렵다. HCG 처리후 ovulation detection 방법으로 endocrinologist 의 산부인과 임상사가 할 수 있는 sonography (ultrasound monitoring) 의 방법도 함께 사용할 수 있다. 즉 follicle maturation 이 가장 잘 일어난 여포 (지름 $2.7 \pm 0.3 \text{ cm}$) 에서 일어났을 확률이 가장 많기 때문이다. 그래서 난자 채취시 산부인과 의사, biologist, endocrinologist 및 비뇨기과 의사의 합동작전이 가장 잘 이루어져야 하고 다음 단계에서 biologist 와 비뇨기과 의사의 협동이 이루어져야 한다. IVF-ET program 에서 laparoscopy 후 난자의 성숙을 cytoplasmic maturation 와 cumulus cell dispersal 및 cumulus cells 사이의 mucification 등으로 난자의 성숙을 판별하는 방법도 있으나, HMG 처리후 이러한 cumulus cells dispersal 은 oocyte maturation 과는 반드시 일치하지 않는다는 Laufer et al.(1984) 의 보고가 있다. 이러한 현상은 포유류에서는 종에 따른 차이가 있다고 여겨진다. Hillensjo et al.(1976) 및 Dekel and Kraicer(1978) 은 rat 에서 cumulus cells mucification 과 oocyte maturation 은 대체로 일치한다고 보고하고 있는 것과는 다르다. Laufer et al (1984) 은 cumulus cells dispersal 이 잘 일어나 oocyte maturation 일어났을 것으로 예상된 oocyte - cumulus complex 에서 보면 20% 는 여전히 germinal vesicle (GV) 상태에 있다고 보고하고 있다. 이런 점에서 이러한 cumulus cell dispersal 은 oocyte maturation 을 판단하는 기준이 되어서는 안되겠고 반드시 phase contrast microscope 나 interference contrast phase microscope 등으로 난자의 성숙을 빨리 판단하는 것이 절대 필요하다 하겠다.

oocyte preparation : 이 이하의 과정은

biologist 가 해야 하며 biologist 의 영역이라고 생각한다. oocyte preparation 시 유의해야 할 사항이라 다음과 같이 몇가지로 나누어 논하고자 한다.

온도 : a) laparoscope 를 이용해서 여포로부터 성숙된 난자를 채취후 stereomicroscope 로 난자를 검경할 때 난자를 채취한 방에서 검경할 방으로 이동할 거리가 짧아야 하고 낮은 온도에서 장시간 노출되는 것은 금물이기 때문에 난자 채취후 검경할 방은 모든 사용기구가 37 °C 로 유지해야 하는 점이 특히 유의할 사항이다. 이 점은 현재 우리나라에서 IVF-T program 을 하고 있는 대학이나 병원에서 철저히 되어야 한다고 생각한다. 물론 난자를 채취한 후 사용하는 washing medium 도 incubator 속에서는 물론 외부 온도에서도 변해서는 안되는 요건 중의 하나이고 stereomicroscope 위에 놓고 검경할 때도 현미경의 stage 의 온도를 37 °C 로 유지하는 것도 필요하다.

이러한 조건을 제대로 하는 것은 필수적이라 하겠다. 우리나라에서 여러번의 시도가 실패한 원인중의 하나가 이것이었을 가능성도 배제할 수 없다. 그렇지 않으면 방의 온도를 37 °C 로 유지하지 못할 경우 적어도 heating block 을 stereo microscope 나 phase contrast microscope 등에 부착시켜 적어도 현미경 stage 의 온도를 37 °C 정도로 맞추어 주는 device 는 꼭 있어야 한다.

b) Pasteur pipette 준비 : Pasteur pipette 는 반드시 autoclave 로 멸균된 것을 사용해야 하며 채취한 난자를 우선 dish 속에서 재빨리 찾아야 하고 난자를 찾았을 때 이를 빨리 pick - up 해서 washing media 에 옮겨놓고 detail examination 해야 하는데 난자를 pick - up 하고 handling 할 때는 현미경 하에서 pasteur pipette 을 아주 가늘게 뽑아서 cumulus - enclosed oocyte 의 직경보다 약간 크게 뽑아야 (120 μ m ~ 150 μ m) cumulus cells 들이 pipetting 시 제거되지 않는다.

물론 난자 채취때 cumulus cells 의 과다에 따라 다를 수 있다. 이때 사용되는 pasteur

pipette 를 고온 멸균하면 난자주위의 mucous material 이 pasteur pipette 유리관 벽에 쉽게 부착하는 경우가 있어 어렵게 채집된 난자를 바로 그 순간에 잃어버리고 마는 결과를 초래한다. 그래서 autoclave 로 멸균된 pipette 를 사용해야 하고 이 pipette 끝부분을 alcohol lamp 등으로 cumulus - enclosed oocyte 의 직경보다 약간 큰 직경으로 뽑아서 만들어야 하는데 이러한 technique 은 하루이틀에 연습되지 않는다는 점에 유의해야 하고 또 한가지는 일단 Pasteur pipette 를 가는 관으로 뽑은 다음은 그 각도를 90 °로 가깝게 cutting 하는 것도 극히 중요한 사항 중의 하나이다. 난자를 이 가는 Pasteur pipette 내로 빨아들이기 전 반드시 medium 으로 pipette 내부를 washing 해야 한다.

이것은 biologist 가 해야 하기 때문에 이들의 technique 의 숙달에 달린 문제이며 수없이 많은 연습을 해야 익힐 수 있다. Pasteur pipette 의 끝부분을 2 ~ 5 cm 로 한 것은 이 끝이 길면 길수록 그 만큼 적은 양의 medium 과 난자만을 pick - up 할 수 있기 때문이기도 하다. follicular fluid 속에는 cell debris 와 granulosa cells 및 cumulus cells 이 많기 때문에 난자만을 pick - up 해야 하며 극히 적은 양의 cell debris 를 pick - up 함으로써 쉽게 난자를 handling 할 수 있고 washing 도 쉬우며 insemination 시에도 영향을 적게 받는다.

c) 난자의 handling : 난자의 handling 은 비뇨기과에서 뇨도로 넣는 catheter 의 끝에 가는 유리관을 끼우고 다시 고무 튜브로 연결해서 pasteur pipette 를 꽂을 수 있게 하여 catheter 의 끝을 입술로 물고 pasteur pipette 의 가는 끝으로 난자를 pick - up 하게 되는데 이때 강하게 sucking 및 blowing-out 하면 washing medium 내에서나 Pasteur pipette 안에서 그만큼 강한 물리적인 자극을 받게 하므로서 난자에 손상을 주며 또 난자를 싸고 있는 cumulus cell 층을 떨어져 나가게 하므로서 난자의 cytoplasmic maturation 에

도 많은 영향을 준다. 그래서 이때의 난자 handling은 오랫동안의 연습과 경험이 필요하게 되는데 첫째 10m μ 의 medium과 함께 25개 정도의 난자를 sucking 할 수 있고 둘째 이런 25개 정도의 난자(생쥐나 쥐의 난자를 가지고 시험할 수 있음)로 (가) (나)

(다)의 글씨를 배양 dish에다 50 초 정도내에서 쓸 수 있는 technique를 가진 사람은 합격선으로 보아도 상관없겠다(난자를 pick-up해서 가나다의 글씨를 완성하기까지의 시간). 아무튼 이런 난자의 handling을 잘 하자면 많은 경험과 또 여러 가지 난자를 다루어본 사람이라야 가능하지 않을까 생각된다.

d) healthy and degenerating oocyte의 판별: 난자를 pick-up해서 washing medium에 옮긴 다음 난자의 상태를 판별하는 데는 오랜 동안의 경험과 여러 가지 종류의 포유 동물 난자를 다루어 본 경험이 있는 biologist가 필요하며 이때는 stereomicroscope와 phase contrast microscope 혹은 differential interference-contrast microscope를 병용해서 사용해야만 판별할 수 있다(1st polar body의 확인과 chromosomal pattern). 또 난자의 상태를 판별하는 기준으로는 ① 난자의 색깔 ② 난자 표면의 black pigment 유무 ③ 난자의 fragmentation 여부 ④ 난자를 싸고 있는 cumulus cell의 색깔 ⑤ cumulus cell중에 black pigmented cumulus cells의 과다 ⑥ follicular fluid의 색깔 및 점액성 등이 이러한 판별에 사용되는 기준인데 여러가지 종류의 포유 동물 난자를 다루어 본 경험과 또 small follicle, medium follicle 및 large follicle 등을 많이 다루어 본 경험이 필요함으로 역시 biologist의 소관이라고 생각된다. 우리나라에서 IVF-ET program이 아직 성공하지 못한 이유중의 하나가 상기의 oocyte preparation 중의 어느 한 가지를 잘못함으로써 그 원인이 있다고 필자는 생각하고 있다.

IVF-ET program을 성공적으로 이끌어 나가기 위해서는 반드시 기초적인 동물실험이

항상 진행되고 있는 실험실이 절대로 필요하며 이를 위한 team 구성이 절대적인 점이라 사료된다. 난관 유착으로 인해 혹은 oligospermia 때문에 혹은 idopathic infertility 때문에 아기를 가지지 못하는 가정에서의 불행이나 가족 관계가 악화되고 있는 것은 흔히 많이 볼 수 있는 일이며 이것은 그 개인으로 볼 때는 일생의 불행이라고 말할 수 있지 않을까? IVF-ET program은 이런 불행한 부부들을 위해서 꼭 성공시켜야 하는 것도 의사들의 인술이 아닐까 하는 점에서 IVF-ET program을 하는 이유로 알고 있다. 앞서 지적한 것처럼 의학은 생물, 화학, 물리등의 기초 과학을 통해서 얻은 이론과 실험을 응용하는 과정으로 이러한 IVF-ET program은 기초 과학의 한 분야인 생식생리학 분야에서 동물 실험을 통해서 얻은 결과를 IVF-ET program에 응용함으로써 훌륭한 임상적인 결과를 가져올 수 있다고 생각한다. Edwards and Steptoe가 1978년 Louis Brown 양을 탄생시킬 때 이미 생식생리학에서 난자 성숙과 embryo culture 등에서 Edwards는 의사가 아닌 자연 과학자로서 수십년간 포유동물을 가지고 연구해 왔고 산부인과 의사인 Steptoe의 협조를 빌어서 IVF-ET program을 성공시킨 개척자였다는 사실을 우리는 묵과할 수 없다.

in vitro fertilization: 앞서 준비한 sperm과 oocyte를 함께 섞어줌으로써 체외에서의 수정을 유도하는 과정으로, 성숙이 일어났다고 판단되는 난자(MII, metaphase of second meiosis)에다 washed sperm을 적당 수 넣어서 배양하면 fertilization이 쉽게 일어난다. 이때 sperm counting이 문제될 수 있다. 즉 oligospermia나 poor motility를 가진 sperm에 따라 다르다. motility가 활발한 sperm인 경우 50 μ l의 배양액에다 5,000 이상의 sperm을 넣어줄 경우 충분히 수정이 가능하다. 과량의 정자를 넣어 줄 경우 포유 동물에서 in vitro fertilization 비율이 떨어지고 있다는 점에도 유의해야겠다(Niwa & Chang 1973). 이것은 실제 포유 동물의 난관

속에서 체내 수정시 난자 주위에 모여 있는 정자의 수는 대개 1,000 개 정도가 모여 있는 것이 관찰되기 때문이다. *in vitro fertilization* 시에도 그런 기준이 적용될 수 있다고 보기 때문인데 IVF-ET program을 성공시키고 있는 여러 나라에서 정자의 수를 50,000/50 $\mu\ell$ (normal male sperm) 혹은 500,000/50 $\mu\ell$ (oligo spermia의 남자에서 얻은 정자)까지나 넣어주는, 즉 보다 많은 숫자의 정자를 넣어 주고 있는 경향은 있다. 일단 난자를 채취했을 경우 적어도 5~6시간 전에 준비된 sperm으로 insemination을 시도한다. 이때 5~6시간은 채취전 성숙 난자의 생존을 충분히 확인하는 시간이며 insemination 즉시 해도 상관없다. 5~6시간은 앞서 이야기 했듯이 *in vitro*, culture medium에서 capacitation이 충분히 일어남으로 이렇게 준비한 정자를 쓰면 바로 *in vitro fertilization*이 가능하기 때문이다. 단 배란 후 많은 시간 즉 12시간 이상 경과하면 난자가 퇴화 과정에 들어가기 시작한다고 알려져 있기 때문에 오랫동안 난자를 incubator 속에서 방치하는 것은 금물이다. 앞서 전술한 바와 같이 *in vitro fertilization*을 위한 난자의 상태는 아주 중요하다. MII (metaphase II)에 도달한 성숙한 난자라 하더라도 cytoplasmic maturation이 함께 수반된 성숙한 난자라야 하는데 *in vitro* matured oocyte는 MII에 도달하였다 하더라도 정자와의 수정이 잘 일어나지 않는다는 보고가 많기 때문이다 (Jacobson et al, 1970, Edwards, 1970 : Soupart, 1975). 이러한 이유로는 최근 Staigmiller and Moor(1984)에서도 지적되었듯이 cumulus cell, granulosa cell과 난자의 상호 작용과 steroids (estradiol and 17 α - hydroxyprogesterone)의 부족이나 혹은 follicular fluid를 넣어 주지 않은 탓으로 penetration은 일어나지만 sperm head swelling이 일어나지 않는다는가 해서 *in vitro*에서 성숙된 난자는 정상적인 수정이 일어나지 않는 원인이 아닌가 보고 있으며 이러한 점은 이미 Jacobson et

al.(1970) Edwards(1971) 및 Soupart (1975) 등에 의해서도 오래전 부터 지적되어 왔다는 점이다. 그래서 여포에서 성숙한 난자를 채취후 insemination 전까지 난자를 배양할 때 50% 정도의 환자의 follicular fluid를 넣어 주든지 LH 및 FSH를 넣어 주어 배양하는 방법도 있긴 하다. 또 한 가지로는 난자 성숙시 난자 주위를 싸고 있는 zona pellucida (투명대)의 hardening 과정이 일어나 실제 성숙전과 다른 구조로 변형됨을 말하며 이러한 zona pellucida의 hardening 과정을 *in vitro*에서 성숙한 난자와 zona pellucida의 구성 성분 및 구조의 변형이 가능하다고 하겠으나 zona pellucida의 hardening 과정이 일어나고 있는 것으로 알려지고 있다 (De Felici and Siracusa, 1982) *in vitro fertilization* 시 난자의 배양 dish에다 sperm suspension을 넣어 주는 것이 technique 상으로 보아 보다 타당한 방법이라 생각된다. culture dish에다 equilibrated mineral oil (paraffin oil)을 넣고 이 mineral oil 층 아래에 pipette나 syringe를 이용하여 ~100 $\mu\ell$ 의 insemination medium drop을 만든다. 이렇게 만든 insemination medium drop에다 난자를 먼저 넣고 다음 sperm suspension을 넣는 순서로 한다. 50 $\mu\ell$ 정도의 sperm suspension에다 난자를 pasteur pipette로 넣어 줄 때 sperm을 흩어지게 함으로서 난자와의 거리를 생기게 하기 때문에 난자 배양 dish에다 sperm suspension을 넣어 줄 때는 이런 문제가 야기되지 않는다. 또 한 가지 이유는 난자를 자주 pipetting하므로서 난자 주위의 cumulus cell들이 물리적인 pipetting으로 많이 떨어져 나가 난자에 좋지 않은 영향을 줄 우려도 있기 때문이기도 하다. 난자 handling 과정이 미숙한 사람이 pipetting을 할 때 또 pipette의 지름이 적절치 않을 경우 더욱 많은 cumulus cells들이 떨어져 나갈 확률은 다분히 있기 때문이다.

time 및 insemination : 이것은 laparoscope로 여포로부터 난자를 채취후 wash-

ing 및 identification 과정을 거쳐 배양액에다 성숙 난자를 옮긴 후 바로 insemination을 시도하는 것도 좋다.

그리고 가능하면 laparoscope로부터 insemination까지 시간이 단축될수록 좋다는 의미이기 때문에 꼭 insemination을 난자 채취 후 5~6시간 정도에서 시도할 필요는 없다. 단, 채취된 난자가 미성숙된 난자일 경우 난자에 따라서 몇시간 더 배양해서 성숙을 유도한 다음 insemination해야 한다는 점이며 앞서 기술한 것처럼 난자 성숙시 zona pellucida의 구조적 변화가 야기되기 때문에 미성숙 난자를 sperm과 수정을 시도하더라도 정상적인 penetration 및 sperm head swelling 과정이 일어나지 않으므로서 정상적인 수정이 실패하고 있다는 보고도 많기 때문이다. 이러한 점들 때문에 laparoscope를 시행할 시간을 정하는 데는 endocrinologist의 정확한 홀몬 분석이 요구되고 있으며 laparoscopist는 배란이 일어나기 바로 직전에 난자를 채취하면 더욱 확실한 난자 성숙의 확인 방법이 되기 때문에 난자는 가능한대로 여포 속에서 최대한으로 머물러 있으면(배란 직전까지) 그만큼 cytoplasmic maturation도 확실하기 때문이란 점을 유의해야 한다. insemination 후 female pronucleus 및 male pronucleus의 확인, in vitro fertilization을 위해 채취된 cumulus cells이 많이 붙어 있는 난자의 경우 chromosomal pattern은 differential interference contrast microscope를 사용한다 하더라도 극히 확인하기가 어려우며 단지 이때 perivitelline space내의 1st polar body는 stereo microscope나 phase contrast microscope로 가능하다. 즉 1st polar body를 확인할 수 있으면 이 난자는 이미 MII로 성숙된 난자라고 간주되기 때문에 in vitro insemination을 바로 해도 좋다. in vitro insemination을 할 sperm suspension은 liquified sperm suspension을 사용해야 하는 것은 당연하므로 난자 채취전에 이미 이러한 sperm suspension은 준비되어 있어야 하고

37°C incubator 내에서 보관된 상태에 있어야 한다. insemination 후 female pronucleus 및 male pronucleus의 확인은 14~24시간 정도내에서 할 수 있다. 이를 확인하기 위해서는 cumulus cells이 여전히 많이 붙어 있는 난자의 경우에는 cumulus cells을 제거해야 쉽게 pronucleus를 확인할 수 있다. 대체로 14~18시간 정도 배양하면 cumulus cell mass로 흩어져 있어 한두번의 pipetting으로 쉽게 cumulus cell mass가 떨어져 나간다. 이때의 pipetting으로 cumulus cells mass가 떨어져 나가도 이 이후의 수정된 배의 발생에는 지장이 없다. 일단 2nd polar body까지 관찰할 수 있다면 수정이 일어난 one-cell embryo(zygote)가 된 것이다. 이때 cumulus cell mass나 corona radiata를 제거기 위해서는 난자의 직경과 거의 같거나 약간 큰 pasteur pipette을 flame work로 뽑아서 그 끝을 90°로 깨끗하게 cutting된 pipette로 2~3회 sucking 및 blowing-out 하면 쉽게 corona radiata도 떨어져 나간다. 물론 이 때도 sucking 및 blowing-out은 아주 조심스럽게 해서 sucking이나 blowing-out 과정에서 난자가 squeezing 되지 않도록 극히 조심해야 한다. 사람의 경우 in vitro fertilization인 경우 배란 후 36시간 정도면 2-cell stage에 도달하게 된다. 어떤 경우 insemination 후 24시간 정도에서도 2-cell stage에 도달하는 경우도 있어 cleavage에는 차이가 있다(van Blerkon et al, 1984). 또 가끔 early cleavage 시기에도 cytoplasmic fragmentation 현상도 나타나고 있으나 이러한 anucleated fragments를 가진 cleaved embryo를 uterus에 transfer해도 정상적인 태아 발생이 가능하다는 결론도 있어 cytoplasmic fragmentation이 심하지 않은 embryo는 정상인 embryo로 보아도 상관없다.(Worthing et al, 1983).

embryo-transfer : ET apparatus로는 transfer catheter(William Kelly Inst-

rument Co, Baltimore MD)를 catheter guide를 통해 넣어서 external cervical os에서 uterine fundus 까지 거리를 측정해서 적당한 길이로 넣어야 되나 transfer catheter의 끝에 Hamilton microsyringe(50 μ l ~ 100 μ l)를 붙여서 사용한다. 그림에서 처럼(catheter의 끝 부분) embryo를 sucking하기 전 10 μ l의 medium, 10 μ l의 air space, 10 μ l의 medium과 embryo 층, 다시 10 μ l air space, 마지막으로 10 μ l의 medium 순으로 Hamilton syringe로 조절해서 sucking하며 catheter의 끝 부분을 inserter 속으로 넣어 uterine transfer 단계로 넘겨진다.

embryo transfer 시의 cleavage 상태는 어느 시기가 적당한 지는 아직 정확한 data가 없다. in vivo fertilization의 경우 5 day 정도면 embryo는 blastocyst 시기에 도달하게 되며 자궁에 도달하게 되나 IVF-ET program에서는 2-cell stage 이상 cleavage가 일어난 embryo이면 가능한 것으로 알려져 있다. 단, 여기서 early cleavage 일수록 착상이 잘 일어나지 않고 있어 세포분열이 왕성한 8-cell 이후 stage는 별 문제가 없을 것으로 동물 실험에서도 판별되고 있다. 다시 말하면 early stage의 embryo의 생존은 uterus에서는 그외, 적당한 환경이 되지 못하기 때문이라고 추정되고 있다. zona pellucida로부터 hatching 되는 late blastocyst 시기나 tropoblast 시기는 implantation에 하등의 문제가 없는 것으로 알려져 있다. 앞서 언급한 것처럼 Garcia et al(1984)은 IVF-ET program에서 superovulation 방법을 사용하면 uterine endometrium의 implantation preparation이 spontaneous ovulation보다 앞당겨져 있어 자궁은 implantation 준비가 갖추어져 있다. 그래서 spontaneous ovulation보다 20여시간 앞당겨진 cleavage embryo를 transfer해도 implantation 가능한 것으로 관찰되고 있다. embryo transfer에서 catheter에 embryo-

loading시 가능한 적은 량의 medium과 함께 넣어 주는 것이 embryo transfer 후 embryo가 붙어 나오지 않을 확률이 있기 때문이다. 일단 transfer 한후 catheter의 내부를 transfer medium으로 washing해서 embryo의 부착 여부를 확인할 필요가 있다. 그리고 환자는 자궁에 물리적 자극을 주는 운동은 적어도 몇시간 정도는 하지 말아야겠다.

Quality control :

IVF-ET program을 하기 전 동물(생쥐, 쥐, 토끼, 햄스터)의 early staged embryo를 이용해서 culture medium, incubator, laboratory environment 등을 check한 후 이들 embryo development가 정상적으로 진행될 때 IVF-ET program을 하는 것이 좋겠다. 동물 embryo의 발생이 제대로 되지 않을 때 모든 것을 다시 한번 check해야 한다.

IVF-ET program에 따른 몇가지 위험성:

IVF-ET program의 환자의 경우 ovulation 유도시 대개 multiple follicle growth를 유도키 위해 과량의 clomiphene citrate, human menopausal gonadotrophin 및 human chorionic gonadotrophin을 처리해야 하는 관계로 ovarian hyperstimulation syndrome을 유발할 가능성이 있다는 점이다. IVF-ET program 환자는 대개가 endometriosis, tubal occlusion, pelvic inflammation 등으로 불임성임을 laparoscopist는 극히 유의해야 하고 아주 능숙한 skill이있는 laparoscopist라야 하겠다. 끝으로 1983년말 까지 250case가 성공되어 아기가 출생했는데 congenital cardiac defect를 가진 경우가 두 case였지만 실제로 in vitro cultured oocyte에서 기인하는 것으로 판명되지 않았으나 두 case가 trisomic pregnancy 밝혀졌고(결국은 유산되었지만) 또 한 case는 tubal pregnancy였다. 이러한 이유로 IVF을 원하는 환자의 나이가 특히 35세 이상일 경우 amniocentesis를 꼭 해 보아야겠다.

REFERENCES

- Edwards, R.G., P.C. Steptoe and J.M. Purdy (1970) *Fertilization and cleavage in vitro of preovulatory human oocytes*. *Nature* 227: 1307.
- Edwards, R.G., B.D. Bavister and P.C. Steptoe (1969) *Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro*. *Nature* 221: 632.
- Trounson A.O. (1982) *Current perspectives of in vitro fertilization and embryo transfer*. *Clin. Reprod. Fertil.* 1:55.
- Lopata, A., I. W. H. Johnston, I. J. Hoult et al (1980) *Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by in vitro fertilization of preovulatory egg*. *Fertil Steril* 33:117.
- Trounson. A.O., J.F. Leeton, C. Wood et al (1981) *Pregnancies in human by fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle*. *Science* 212:681.
- Jones, H.W. Jr., G.S. Jones, M. C. Andrew et al (1982) *The program for in vitro fertilization in Norfolk*. *Fert. Steril* 38:14.
- Edwards, R. G. (1962) *Meiosis in ovarian oocytes of adult mammal S*. *Nature* 196:466.
- Bae, I.H. & R.H. Foote (1980) *Maturation of rabbit follicular oocytes in defined medium of varied osmolality*. *J. Reprod. Fert.* 59:11.
- Whitten, W.K. (1971) *Nutrient requirement for the culture of preimplantation embryo in vitro*. *Adv. Biosci.* 6:129.
- Brinster, R.L. (1965) *Studies on the development of mouse embryos in vitro III. The effect of fixed-nitrogen source*. *J. Exp. Zool.* 158:69-78.
- Gwatkin, R.B.L. & A.A. Haidri (1973) *Requirements for the maturation of hamster oocytes in vitro*. *Expl. Cell. Res.* 76:1-7.
- McGaughey, R.W. (1977) *The maturation of porcine oocytes in minimal defined culture media with varied macromolecular supplements and varied osmolality*. *Expl. Cell Res.* 109:25-30.
- Miyamoto, H.Y., Toyoda and M.C. Chang (1974) *Effect of hydrogen-ion concentration on in vitro fertilization of mouse, Golden hamster and rat eggs*. *Biol. Reprod.* 10:487.
- Bavister, B.D. (1981) *Analysis of culture media for in vitro fertilization and criteria for success*. In *Fertilization and embryonic development in vitro*, Edited by L. Mastroianni, J.D. Briggers, New York, Plenum Press, p.41.
- Bae. I.H. & R.H. Foote (1975) *Carbohydrate and amino acid requirements and ammonia production of rabbit follicular oocytes matured in vitro*. *Exp. Cell Res.* 91:113.
- Garcia, J.E., A.A. Acosta, J.G. Hsiu & H.W. Jones (1984) *Advanced endometrial maturation after ovulation induction with human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin for in vitro fertilization*. *Fert. Steril* 41:31-35.
- Leung, C.S., M.J. Gronow, G.N. Kellow, A. Lopata, A.L. Speirs, J.C. McBain, Y.P. du plessis & I. Johnston (1984) *Serum supplement in human in vitro fertilization and embryo development*. *Fert. Steril.* 41:36-39.
- Menezo, Y., J. Testait & D. Perrone (1984) *Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo culture and transfer*. *Fert. Steril.* 42:750-755.
- Brinster, R.L. (1965) *Studies on the development of mouse embryos in vitro. I. The effect of osmolality and hydrogen ion concentration*. *J. Exp. Zool.* 158:49.

- Achreiber, E. J.E. Johnson, E.J. Plotz and M. Weiner (1966) *Studies with ¹⁴C labelled clomiphene citrate. Clin. Res. 14:287.*
- Thomson, J.L. (1968) *Effect of two non-steroidal antifertility agents on pregnancy in mice. I. comparison of in vitro and in vivo effects on zygotes J. Reprod. Fertil. 15:223.*
- Quinn, P., G.M. Warnes, J.F. Kerin and C. Kirby (1984) *Culture factors in relation to the success of human in vitro fertilization and embryo transfer. Fert. Steril. 41:202-209.*
- Marrs, R.P. H. Saito. B. Yee, F. Sato and J. Brown (1984) *Effect of variation of in vitro culture techniques upon oocyte fertilization and embryo developments in human in vitro fertilization procedures. Fert. Steril. 41:519-523.*
- Berhman J. & Y. Suwada (1966) *Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and steroid in a liquid-nitrogen refrigerator. Fert. Steril. 17:457,*
- Sherman, J.K. (1973) *Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: State of the art of human semen banking. Fert. Steril. 24:397.*
- Beck W.W., Jr. (1978) *Artificial insemination and preservation of semen. Urol. Clin. North Am. 5:593.*
- Makadevan M. & A. O. Trounson (1984) *Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. Fert. Steril. 41:287-293.*
- Lopata, A., R. McMaster, J.C. Bain and I.W.H. Johnston (1978) *In vitro fertilization of preovulatory human eggs. J. Reprod. Fert. 52:339.*
- Quigley, M.M., C.L. Schmidt, P.J. Beauchamp, S. Pace-Owens, A.S. Berkowitz and D.P. Wolf (1984) *Enhanced follicular menopausal gonadotropin treatment for in vitro fertilization. Fert. Steril. 42:366-372.*
- Staigmiller, R.B. and R.M. Moor (1984) *Effect of follicle cells on the maturation and development competence of ovine oocytes matured outside the follicle. Gamete Res. 9:221.*
- Fishel, S.B., R.G. Edwards and J.M. Pardy (1984) *Birth after a prolonged delay between Oocyte recovery and fertilization in vitro. Gamete Res. 9:175.*
- Laufer, N., B.C. Tarlatzes, A.H. Decherney, J.T. Masters, F.P. Haseltive, N. Machusky and F. Naftolin (1984) *Asynchrony between human cumulus-corona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for in vitro fertilization. Fert. Steril. 42:366-372.*
- Hillensjo, T., N. Dekel and K. Ahren. (1976) *Effect of gonadotropins on the cumulus oophorus of isolated rat graafian follicles. Acta physical. Scan. 96:558.*
- Dekel N. and P.F. Kraicer (1978) *Induction in vitro of mucification of rat cumulus oophorus by gonadotropins and adenosine 3', 5'-monophosphate. Endocrinal 102: 1797.*
- Niwa, K. and C. Chang (1973) *Fertilization in vitro of rat eggs as affected by the maturity of the females and sperm concentration. J. Reprod. Fert. 35:577.*
- Jacobson, C.B., J.G. Sites and L.F. Arias-Bernal (1970) *In vitro maturation and fertilization of human follicular oocytes, Int. J. Fert. 15:103.*