大韓不妊學會誌 : 第 32 卷 第 4 號 2005
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 32, No. 4, 2005, 12

체외수정시술 시 획득한 미성숙난자의 환자 연령에 따른 체외성숙률 및 수정률 비교

분당서울대학교병원 산부인과[1], 서울대학교 의과대학 산부인과학교실[2],
서울대학교 의학연구원 인구의학연구소[3]

한상훈[1] · 이정렬[2] · 김현준[1] · 문정희[1] · 지병철[1] · 구승엽[2]
서창석[1,2,3] · 김석현[2,3] · 최영민[2,3] · 김정구[2] · 문신용[2,3]

Effects of Age on in vitro Maturation and Fertilization of Immature Oocytes from Stimulated Cycles in Human IVF-ET Program

Sang Hoon Han[1], Jung Ryeol Lee[2], Hyun Jun Kim[1], Jung Hee Moon[1], Byung Chul Jee[1], Seung-Yup Ku[2], Chang Suk Suh[1,2,3], Seok Hyun Kim[2,3], Young Min Choi[2,3], Jung-Gu Kim[2], Shin Yong Moon[2,3]

[1]Department of Obstetrics and Gynecology, Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam, Gyeonggi-do, Korea, [2]Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea, [3]Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Korea

Objective: To investigate the effects of female age on in vitro maturation and fertilization of immature oocytes from controlled ovarian hyperstimulation (COH) in human IVF-ET program.

Method: A total of 96 immature oocytes (GV & metaphase I) obtained from 40 cycles of IVF-ET (29 patients). The mean age of female patients was 31.8±3.1 years. Ovulation was triggered by urinary or recombinant hCG. Immature oocytes were cultured with YS medium containing 30% of patients' human follicular fluids, LH (1 IU/mL), FSH (1 IU/mL) and EGF (10 ng/mL), and then matured oocytes were fertilized by ICSI. In vitro maturation and fertilization of immature oocytes were analyzed according to age of female (< 34 or ≥ 34 years).

Results: The maturation rate was similar between two groups (68% vs 64%). The fertilization rate of in?vitro-matured oocytes was higher in patients < 34 years old, but there was no statistical significance (64% vs 50%, p=0.347). The fertilization rate of in-vitro-matured oocytes was significantly lower compared with those of in-vivo-matured oocytes in both age groups (64% vs 79%, p=0.035, 50% vs 86%, p=0.007).

Conclusion: In older female group, fertilization rate of in-vitro-matured oocytes seems to be decreased. Further investigations should be warranted to increase fertilization potential of in-vitro-matured oocytes.

Key Words: Immature oocyte, Female age, In vitro maturation, Controlled ovarian hyperstimulation, Fertilization

주관책임자: 지병철, 우) 463-707, 경기도 성남시 분당구 구미동, 분당서울대학교병원 산부인과
Tel: (031) 787-7254, Fax: (031) 787-4054, e-mail: blasto@snubh.org

일반적인 체외수정 및 배아이식술에서 과배란유도 후 약 20~30%의 난자는 미성숙난자 상태로 얻어진다.[1,2] 이러한 미성숙난자를 체외배양하면 일부에서 성숙난자로 진행하는데 특히 전체 얻어진 난자수가 적은 저반응군 (poor responder) 환자의 경우 미성숙난자의 체외성숙 성공은 중요한 의미를 가진다. 현재까지 이러한 미성숙난자를 성숙시켜 임신에까지 이른 보고는 많지 않다.[2~4] 미성숙난자의 체외성숙률 (in vitro maturation rate)은 germinal vesicle (GV)의 경우 약 75%, 제1 감수분열중기 (metaphase I) 난자의 경우 약 74% 정도이며, 이들 중 51~68% 정도가 수정능이 있는 것으로 알려져 있다.[1~3] 체내성숙난자의 수정률 및 배아발달률에 비하여 차이가 없다는 보고도 있지만 대개는 미성숙난자를 체외성숙시켜 얻은 난자의 수정률 및 배아발달률은 약간 낮은 것으로 보고되고 있다.[2] 미성숙난자가 이렇게 낮은 수정률 및 배아발달률을 보이는 것은 난자 자체의 결함이나 배양조건 때문으로 여겨지고 있다. 즉 과배란유도를 하였는데도 미성숙난자 상태로 나오는 난자는 내재적인 결함이 있을 수 있고 또한, 현재 사용하는 배양조건이 불완전해서일 수도 있다. 최근 다낭성난소증후군 환자에서 과배란유도를 하지 않고 미성숙난자를 채취하여 체외성숙시키려는 시도가 이루어지고 있는데,[5] 이에 대한 연구들에서 미성숙난자의 체외성숙률을 높이는 가장 중요한 요소는 배양조건이라고 알려져 있다. 그러나 미성숙난자의 성숙률과 수정률에 있어 배양조건 이외의 다른 인자들의 영향에 대해서는 아직까지 잘 알려져 있지 않다. 이에 저자들은 환자의 연령이 채취된 미성숙난자의 성숙률과 수정률에 어떠한 영향을 주는지를 알아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

2003년 7월부터 2004년 12월까지 분당서울대학교 병원에서 성선자극호르몬 (gonadotropin)으로 과배란유도를 하고 체외수정시술을 받았던 환자 중 미성숙난자를 얻었던 40주기 (29명, ICSI 17주기 포함)를 대상으로 하였다. 무정자증으로 수술적 정자채취 (surgical sperm retrieval)를 하였던 경우는 제외하였다. 한 사람이 여러 번을 시행하였을 경우 각각 독립된 것으로 간주하였다. 얻어진 96개의 미성숙난자에서 성숙과 미성숙 여부에 따라서 연구 대상군에서 Receiver Operator Characteristic (ROC) 도표를 이용하여 34세를 기준으로 하여 연령에 따라 34세 미만과 34세 이상의 두 군으로 나누고 체외성숙률과 체외수정률을 비교하여 보았다. 미성숙난자에는 MI과 GV 단계의 난자가 모두 포함되며 이 둘을 따로 구분하지는 않았다.

2. 연구방법

1) 과배란유도 및 난자 채취

월경주기 제2~3일부터 성선자극호르몬을 투여하였는데 17주기에서는 HMG (Pergonal®, Serono, Switzerland), 8주기에서는 pure FSH (Metrodin®, Serono), 7주기에서는 recombinant FSH (Gonal-F®, Serono), 3주기에서는 recombinant FSH + hMG, 3주기에서는 HMG + pure FSH, 2주기에서는 letrozole (Femara®, Norvatis) + pure FSH가 이용되었다. 난포의 크기가 14 mm에 도달하면 조기 LH surge의 예방 목적으로 GnRH antagonist (Cetrotide®, Serono) 0.25 mg을 매일 투여하였으며 (flexible protocol), 우성난포의 크기가 19 mm에 도달하면 urinary hCG (Profasi®, Serono) 5,000~10,000 IU 또는 recombinant hCG (Ovidrel®, Serono) 250 μg을 투여하여 배란촉발을 유도한 후 35~36시간 뒤에 질식초음파 유도 하에 난자를 채취하였다.

2) 미성숙난자의 배양 및 수정

채취한 난자는 고식적인 (conventional) IVF의 경우 난구세포 (cumulus cell)의 분포를 보고 난자의 성숙 여부를 판단하였다. 세포질내 정자주입법 (ICSI)을 시행할 환자에서 얻어진 난자는 0.1% hyaluronidase 농도의 PBS 용액에서 피펫으로 난구세포를 제거한 후에 입체현미경 (stereomicroscope) 하에서 MII 단계에 나타나는 제1극체 (polar body)의 유무로 난자의 성숙 여부를 판단하였다. 성숙난자로 판명되면 4시간 후에 수정을 시행하였고, GV 또는 MI 단계의 미성숙난자는 체외성숙용 배양액이 준비될 때까지 G-Fert (Vitrolife, Sweden) 배양액에 보관하였다. 체외성숙용 배양액은 YS 배양액[6] 70%와 환자의 난포액 30%을 섞고 LH 1 IU/ml, FSH 1 IU/ml, EGF 10ng/ml를 첨가하여 사용하였다. 난자 채

취시 얻어진 환자의 난포액은 원심분리하여 상층액만 취해서 56℃ water bath에 30분 동안 두었다가 세포 파편 등을 제거하기 위하여 여과 (filtration)한 후 5% CO_2, 37℃ 하에서 1시간 정도 두었다. 이렇게 준비된 체외성숙용 배양액에 미성숙난자를 넣고 37℃, 5% CO_2 상태의 배양기에서 배양하였다. GV 상태였던 경우는 20시간 후에, 제1 감수분열 중기 (MI)의 경우는 4시간 내에 성숙상태를 확인하였다. 성숙이 확인되면 준비된 정자로 세포질내 정자주입법 (ICSI)을 시행하였으며, 18시간 후 도립현미경 (inverted microscope)으로 두 개의 전핵이 관찰되는 경우 수정된 것으로 간주하였다. 세포질내 정자주입법 (ICSI) 및 이후의 과정은 이미 본 교실에서 발표한 바와 같은 통상적인 방법으로 진행하였다.[7]

3. 통계처리

통계 프로그램으로 윈도우용 SPSS (ver 12.0)를 이용하였고 비율 비교시 Chi-square test를, 평균치 비교시에는 Student's t-test를 시행하여 p 값이 0.05 미만인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

전체적으로 34세 미만과 34세 이상의 두 군간에 남편의 연령, 불임의 기간, 세포질내 정자주입법 (ICSI)의 비율, 채취된 난자중 미성숙난자의 비율은 차이가 없었다. 34세 미만군에서 난관요인이 더 많은 경향이 있었다 (Table 1).

두 군에서 미성숙난자의 성숙률 및 수정률은 통계학적으로 유의한 차이는 없었으나, 34세 이상에서 수정률이 더 낮은 경향을 나타냈다 (Table 2). 미성숙난자로부터 얻어진 성숙난자의 전체적인 수정률 (61%)은 동시에 채취된 성숙난자의 수정률 (81%)에 비하여 유의하게 낮게 나타났으며 또한, 두 연령군

Table 1. Characteristics of subjects according to female age

Group of Age	< 34	≥ 34
No. of patients	18	11
No. of cycles	28	12
No. of immature oocytes	74	22
Immature oocytes/total aspirated oocytes	74/210 (35%)	22/72 (31%)
Husband's age (years)	34.0±1.9	40.7±5.5
Duration of Infertility (years)	4.8±2.1	5.5±2.3
No. of ICSI cycle	12 (43%)	5 (42%)
Diagnosis		
Tubal factor	15 (54%)	3 (25%)
Endometriosis	6 (21%)	2 (17%)
Unexplained	4 (14%)	2 (17%)
Male	3 (11%)	2 (17%)
Uterine factor	0	1 (8%)
Age factor	0	1 (8%)
High FSH	0	1 (8%)

Table 2. Maturation rate of immature oocytes and their fertilization rate according to female age

Group of age	< 34	≥ 34	Total
No. of patients	18	11	29
No. of cycles	28	12	40
No. of immature oocytes	74	22	96
No. of in-vitro-matured (IVM) oocytes	50 (68%)	14 (64%)	64 (67%)
No. of fertilized IVM oocytes	32 (64%)	7 (50%)	39 (61%)
No. of in-vivo-matured oocytes	136	50	186
No. of fertilized in-vivo-matured oocytes	108 (79%)†	43 (86%)†	151 (81%)†

†; $p<0.05$ when compared with fertilization rate of in-vitro-matured oocytes

모두에서 각각 유의하게 낮게 나타났다 ($p<0.05$). 체내성숙난자의 경우에서도 34세 미만과 34세 이상의 연령군의 수정률은 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Table 2).

고 찰

일반적으로 과배란유도를 통한 난자 채취시 미성숙난자는 약 20~30% 정도에서 얻어지며, 본 연구에서도 전체 회수 난자 중 34%가 미성숙난자였다. 미성숙난자의 체외성숙은 여분의 성숙난자를 부가적으로 얻을 수 있는 장점이 있어, 전체 난자의 수가 적은 저반응군 (poor responder)의 경우 매우 유용하다. 이러한 여분의 미성숙난자의 임상적 응용을 최적화하면 시술횟수와 소요되는 비용을 줄일 수 있다. 그러나, 일반적으로 고식적인 체외수정시술 (conventional IVF)시 체외성숙된 난자 (in-vitro-matured oocyte)의 수정률은 체내에서 성숙되는 난자 (in-vivo-matured oocyte), 즉 채취 당시부터 이미 성숙난자의 경우보다 낮다고 보고되고 있다[8]. 체외에서 성숙되는 제1 감수분열중기 (MI) 난자의 경우도 성숙난자의 수정률 보다 낮다 (52.7% vs 70.8%).[2] 본 연구 결과에서도 체외에서 성숙시킨 미성숙난자의 수정률과 성숙난자의 수정률을 비교하면 체외성숙난자의 수정률이 낮게 (61% vs 81%) 나타났다. 이처럼 체외성숙난자의 수정률이 감소하는 이유로는 미성숙난자가 성숙난자로 진행하기 위한 충분한 준비가 되지 않은 상태에서 채취된다는 점, 미성숙난자의 체외배양시 핵성숙에 비하여 세포질 성숙이 상대적으로 느리게 진행된다는 점, 체외성숙난자의 세포질 구성이 체내성숙난자에 비하여 안정되지 못한 점, 환자의 나이가 증가함에 따라서 난자의 발달능 (competency)이 감소하는 점, 체외의 배양환경이 체내의 배양환경보다 좋지 못한 점 등을 고려해 볼 수 있다. 그러나 아직까지도 과배란유도 후에 채취된 미성숙난자의 적합한 체외성숙법은 정립되지 못한 상태이며 체외성숙률에 영향을 주는 인자에 대해서도 명확하게 알려져 있지 않다.

Combelles 등은 채취된 성숙난자의 경우는 이미 어느 정도의 안정된 방추사 (spindle)가 있는 반면 체외에서 성숙된 인간의 미성숙난자는 MII의 방추사가 빨리 퇴화되고 불안정 하여, 체외성숙난자에서 핵의 질 (quality)이 더 저하될 것이라는 주장을 하였고,[9] 미성숙난자의 체외성숙은 장시간 체외배양조건에 노출되기 때문에 투명대 (zona pellucida) 경화를 유발하여 고식적인 체외수정법을 이용하면 수정률이 감소한다고 알려져 있다.[10] 또한 나이가 증가함에 따라서 난자의 발달능 (competency)이 저하되므로 체내성숙난자의 수정률 뿐만 아니라 체외성숙난자의 수정률 또한 나이가 증가함에 따라 감소하는 것으로 보고되고 있다.[11]

본 연구에서도 체외성숙난자의 수정률은 나이가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타냈다. 체외성숙된 난자의 발달능이 감소하는 기전은 아직 잘 알려져 있지 않지만 일단 난자가 체내에서 성숙이 되면 어느 정도 수정능이 획득되어 수정률이 나이의 증가에 영향을 받지 않지만, 미성숙난자는 채취 당시에 성숙 및 배란촉발을 위한 hCG의 자극에 둔화될 정도로 난포내의 환경이 혈관 공급 등의 내부적인 장애가 존재하거나 국소적으로 호르몬작용 (paracrine) 환경이 체내성숙난자에 비하여 좋지 않은 상태의 난포에서 채취하여 체외에서 성숙시키므로 수정능 및 발달잠재력이 체내에서 채취된 성숙난자보다 낮을 것으로 추측해 볼 수 있다. 또한 체외에서의 성숙환경이 체내에서보다 미성숙난자의 성숙에 상대적으로 빈약하다고 생각되기 때문에 나이의 증가에 따른 영향을 더 많이 받을 것으로 추측해 볼 수 있다.[12,13] 과배란유도에서 질 초음파를 이용한 난자를 채취하였을 경우 가장 작은 난포에서 채취되는 난자의 경우는 정상적인 착상전 (pre-implantation) 발달에 필요한 물질들을 다 생산하지 못하여서, 핵과 세포질의 발달이 동시에 이루어지지 못하고, 이로 인해 정상 배아발달을 위한 난자의 발달능이 감소한다는 보고가 있다. 이처럼 핵의 성숙에 비해 세포질의 성숙이 지연되면 세포내 소기관의 배열에 이상이 생겨서 수정에 장애를 받는다고 알려져 있다.[14]

본 연구의 제한점으로는, 대상수가 적고, 후향적 연구라는 점과 GV와 MI 미성숙난자는 그 특성과 능력면에서 다소 차이가 있는데 GV와 MI을 구분하지 않은점, ICSI 주기와 고식적 체외수정시술 주기를 모두를 포함하여서 ICSI 주기에서 난자의 난

구세포제거 (denudation) 에 의한 미성숙난자의 판별 및 체외성숙도의 영향이 변수로 작용할 수 있다는 점을 들 수 있다. 또한, 수정률 뿐만 아니라 배아발달에 따른 진행양상을 비교해 보면 난소의 발달 잠재능을 평가하는데 더 도움이 되었을 것이다. 실제로 난소의 발달능이 저하되면 수정률은 비슷하더라도, 임상적인 임신율은 낮다고 보고되었다.[15,16] 대상환자에서 40세 이상의 환자수가 너무 적은 것도 나이와 수정률의 관계를 나타내는데 문제점이 될 수 있다. 그러므로, 추후의 연구에서는 40세 이상을 포함하는 많은 수의 환자를 대상으로 GV와 MI을 구분한 연구가 필요하다고 할 수 있다.

결론적으로 본 연구 결과에 따르면 과배란유도시 채취된 미성숙난자의 성숙률은 환자의 연령에 영향을 받지 않지만 수정률은 연령이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 체내성숙된 난자의 수정률이 연령에 영향을 받지 않았지만, 체외성숙된 난자의 수정률은 연령에 다소 영향을 받는 것 같다. 이는 아마도 체외성숙된 난자의 경우 여성의 나이가 증가할수록 세포질성숙이 더욱 느려지는 것에 기인하는 것으로 사료된다. 그러므로 세포질성숙에 적절한 배양조건을 개발하고 체외성숙난자의 수정률을 증진시키기 위한 연구가 지속적으로 필요하다.

참 고 문 헌

1. Mandelbaum J, Junca AM, Belaisch-Allart J, Salat-Baroux J, Plachot M, Antoine JM, et al. Oocyte maturation and intracytoplasmic sperm injection. Contracept Fertil Sex 1996; 24: 534-8.
2. De Vos A, Van de Velde H, Joris H, Van Steirteghem A. In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1999; 14: 1859-63.
3. Coetzee K, Windt ML. Fertilization and pregnancy using metaphase I oocytes in an intracytoplasmic sperm injection program. J Assist Reprod Genet 1996; 13: 768-71.
4. Edirisinghe WR, Junk SM, Matson PL, Yovich JL. Birth from cryopreserved embryos following in-vitro maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1997; 12: 1056-8.
5. Child TJ, Phillips SJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. A comparison of in vitro maturation and in vitro fertilization for women with polycystic ovaries. Obstet Gynecol 2002; 100: 665-70.
6. Yoon HG, Yoon SH, Son WY, Kim JG, Im KS, Lim JH. Alternative embryo transfer on day 3 or day 5 for reducing the risk of multiple gestations. J Assist Reprod Genet 2001; 18: 262-7.
7. Jee BC, Ku SY, Suh CS, Choi YM, Kim JG, Moon SY, et al. Cumulative ongoing pregnancy rate in intracytoplasmic sperm injection cycles. J Obstet Gynaecol Res 2004; 30: 372-6.
8. De Vos A, Van de Velde H, Joris H, Van Steirteghem A. In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1999; 14: 1859-63.
9. Combelles CM, Cekleniak NA, Racowsky C, Albertini DF. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. Hum Reprod 2002; 17: 1006-16.
10. De Vos A, Van Steirteghem A. Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction. Cells Tissues Organs 2000; 166: 220-7.
11. Sauer MV. The impact of age on reproductive potential: lessons learned from oocyte donation. Maturitas 1998; 30: 221-5.
12. Armstrong DT. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. Theriogenology 2001; 55: 1303-22.
13. Sutton ML, Cetica PD, Beconi MT, Kind KL, Gilchrist RB, Thompson JG. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. Reproduction 2003; 126: 27-34.
14. Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influ-

ence on oocyte developmental capacity. Hum Reprod Update 2003; 9: 35-48.
15. Barnes FL, Crombie A, Gardner DK, Kausche A, Lacham-Kaplan O, Suikkari AM, et al. Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. Hum Reprod 1995; 10: 3243-7.
16. Trounson A, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. Fertil Steril 1994; 62: 353 -62.