

일반적인 체외수정 방법과 세포질내 정자주입술로 얻어진 배아의 동결-융해 후 이식의 결과

삼성제일병원 불임연구실, 산부인과 불임클리닉*

김정욱 · 한미현 · 변혜경 · 전진현 · 손일표¹ · 궁미경¹ · 백은찬¹
강인수¹ · 이호준

Results of Transfer of Cryopreserved Supernumerary Embryos Obtained after Conventional in vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)

Jeong Wook Kim, Mi Hyun Han, Hye Kyung Byun, Jin Hyun Jun, Il Pyo Son¹,
Mi Kyoung Koong¹, Eun Chan Paik¹, Inn Soo Kang¹ and Ho Joon Lee

*Infertility Research Laboratory, Department of Obstetrics and Gynecology¹,
Samsung Cheil Hospital & Women's Healthcare Center, Seoul 100-380, Korea*

= Abstract =

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) recently has been utilized widely as the most successful technique to overcome the unfertilization problem in cases of severe male infertility in couples who could not be treated by conventional IVF. Recently, indications of ICSI have been extended further and more fertilized oocytes become available. Thus, it is necessary to examine the efficiency of freezing the surplus embryos obtained from ICSI. We compared the survival rate and the future outcome of cryopreserved embryos obtained either after conventional IVF or ICSI during the same period. After ICSI or IVF, five best-quality embryos from each patient were transferred in the stimulation cycle and the surplus pronuclear (PN) stage oocytes or multicellular embryos were cryopreserved by slow freezing protocol with 1,2-propanediol (PROH) as a cryoprotectant. A total of 792 embryos from ICSI trial were thawed and 65.2% (516/792) survived. The survival rates of PN stage oocyte, multicellular embryo and PN + multicellular embryo were 63.5%, 68.2%, 64.0%, respectively. After 111 transfers, 34 pregnancies were achieved, corresponding to a clinical pregnancy rate of 30.6% per transfer. We thawed 1033 embryos from IVF trials and 57.5% (594/1033) survived. In IVF cycle, the survival rates of PN stage oocyte, multicellular embryo and PN + multicellular embryo were 58.2%, 65.2%, 40.2%, respectively. Thirty eight clinical pregnancies were established after 134 transfers, corresponding to a pregnancy rate of 28.4% per transfer. The cleavage rate of thawed PN stage oocytes from ICSI trial (61.3%) was significantly higher than those from conventional IVF (53.4%). The developmental rates of good embryo (\geq grade II) in thawed PN stage oocytes obtained from conventional IVF and ICSI were 63% and 65%, respectively. We concluded that PN stage oocytes, multicellular embryos resulting from ICSI procedure can be successfully frozen/thawed with reasonable clinical pregnancy rates comparable to those of IVF.

서 론

1978년 Steptoe와 Edwards에 의해 최초로 시험관 아기의 임신에 성공한 이래 불임 분야는 많은 발전을 거듭해 왔다. 또한 1980년대 초반부터 성선 자극호르몬에 의한 과배란 유도방법이 개발됨에 따라 다수의 난자를 획득 할 수 있게 되었고 그에 따라 잉여의 난자와 수정란을 동결보존하는 방법이 많이 연구되고 발전되어 왔다.

수정란의 동결보존 방법은 배아의 발생 시기에 따라 여러가지 방법이 이용되어 왔는데, 전핵 시기 및 초기 배아의 경우는 1,2-propanediol (PROH)이 많이 이용되고 있으며 8세포기 배아의 경우는 dimethyl sulfoxide (DMSO)가, 포배기의 배아는 glycerol이 널리 이용되고 있다. 사람의 전핵 시기의 배아를 동결-융해한 후 이식하였을 경우, 19% - 35% 까지의 임신율을 보고하고 있으며 (Cohen *et al.*, 1988; Fugger *et al.*, 1988), 2세포기 이후의 배아를 동결-융해한 경우는 8% - 43% 까지의 다양한 임신율을 보고하고 있다 (Quinn *et al.*, 1986; Demoulin *et al.*, 1991). 또한 포배기 배아의 경우는 glycerol을 이용하여 14% - 44%의 임신율을 보고하고 있다 (Cohen *et al.*, 1986; Hartshorne *et al.*, 1991).

1990년대 초반 세포질내 정자주입술 (ICSI)이 개발됨으로써 (Palermo *et al.*, 1992) 일반적인 체외수정 방법으로는 수정이 어려웠던 환자들에게서도 만족할 만한 수정률을 얻을 수 있게 되었으며 ICSI 방법으로 수정된 배아의 동결보존도 많이 시행되고 있다 (Van Steirteghem *et al.*, 1994; Van der Elst *et al.*, 1994). 이들의 연구결과에 따르면 기존의 체외수정 방법으로 얻어진 배아를 동결-융해한 후 이식한 결과와 배아의 생존율이나 임신율에서 큰 차이를 보이지 않는다고 보고하였다. 그리고 본 원에서도 1994년 5월에 ICSI 방법을 이용하여 첫 임신에 성공하였으며, 그 후 ICSI방법에 의해 얻어진 수정란의 동결보존도 많이 시행되었다. 한편 세계적으로 다태아의 임신방지를 위해 이식하는 배아의 수를 3-4개로 제한하고 있으며 우리나라도 이러한 추세를 따르고 있다. 그러므로 많은 수의 난자가 수정되었을 경우, 잉여 배아의 동결보존은 다태아 임신방지 뿐만 아니라 누적 임신율의 향상을 위해서도 필수적이라 하겠다.

따라서 본 연구는 기존의 체외수정방법과 세포질내 정자주입술에 의해 얻어진 전핵시기 및 2-8세포기의 배아를 동결 보존한 후 융해하여 배아의 생존율과 이식한 후의 결과를 비교하기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 1994년 5월 부터 1996년 8월까지 본원에서 체외수정을 시술받은 환자 중 잉여의 전핵시기 및 2-8세포기 수정란을 동결보존한 환자를 대상으로 하였으며, 1995년 1월 부터 1996년 10월 사이에 동결수정란 이식을 시행한 267례 중, 일반적인 체외수정을 시행한 149례, ICSI를 시행한 118례에서 배아 융해 후 이식의 결과를 비교 분석하였다.

2. 과배란 유도

난자를 획득하기 위한 과배란 유도는 clo-miphen citrate와 GnRH-agonist를 FSH/hMG와 병용하여 사용하였으며, 18 mm 이상의 난포가 2개 이상 존재하는 경우 10,000 IU의 hCG를 주사하였고 주사 후 34시간에 질식 초음파를 이용하여 난자를 채취하였다.

3. 난자 및 정자의 준비

채취한 난자-난구 복합체는 1차적으로 광학 현미경하에서 성숙도를 판정하였다. 일반적인 체외수정을 시행하는 경우는 난자 채취 후 6-8시간에 수정을 시켰으며, ICSI를 시행하는 경우는 난자 채취 후 3-4시간에 0.1% hyaluronidase를 처리하여 난구 세포를 제거하고 다시 3-4시간 후에 난자의 성숙도를 확인하여 제1극체가 방출된 제2감수분열중기 (metaphase II)의 성숙 난자만을 ICSI에 사용하였다.

정자의 준비는, 일반적인 체외수정을 시행하는 경우에 percoll gradient centrifugation방법으로 운동성이 좋은 정자를 회수하여 수정에 이용하였다. ICSI를 시행하는 경우, 사정 정자는 percoll gradient centrifugation방법을 이용하였고 부고환 정자는 swim-up 방법으로 운동성 정자를 회수하여 ICSI에 이용하였으며, TESE방법으로 채취한 고환정자는 0.4% BSA 배양액에서 ICSI시행 전까지 배양기에 보관하였다.

4. 동결보존 과정

전핵시기 배아의 경우, 수정을 시킨 후 16-18시간에 광학 현미경하에서 수정 여부를 관찰하여 두개의 전핵이 뚜렷하게 보이는 배아만을 동결보존에 이용하였으며, 동결보존 과정은 기존에 많이 이용되어지고 있는 방법을 이용하였다 (Veeck *et al.*, 1993 ; Yang *et al.*, 1994). 즉 20% 제대 혈청이 포함된 Dulbecos phosphate buffered saline (dPBS ; GIBCO Laboratory)을 기본배양액으로 하여 1.5 M의 propanediol과 0.2 M의 sucrose를 동해억제제로 사용하였다. 즉, 20% 제대 혈청이 포함된 dPBS에 전핵시기의 배아를 세척한 후 1.5 M PROH가 포함된 동결용액에서 10분간 방치하였다. 그 후 1.5 M PROH와 0.2 M sucrose가 포함된 동결용액으로 옮겨 10분간 방치한 다음 2개의 배아를 0.25 ml straw에 동결용액 50 μ l와 함께 넣고 양쪽 끝을 뜨거운 forceps로 봉합하여 동결을 시행하였다. 동결과정은 세포동결기(MR III, Planer, UK)를 이용하여 상온에서 -7°C 까지 $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 냉각하였고, -7°C 에서 미리 액체 질소에서 냉각시킨 forceps를 이용하여 식빙(seeding)을 시행한 후 10분간 정지시켰다. -7°C 부터 -40°C 까지 $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 냉각시킨 후 straw를 액체질소통에 직접 넣어 해빙시킬 때까지 -196°C 에서 보관하였다.

2-8 세포기의 배아는 20% 제대혈청이 포함된 dPBS를 기본배양액으로 하여 1.5 M DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma)를 동해억제제로 사용하였다. 배아를 20% 제대혈청이 포함된 dPBS에서 세척한 후 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M DMSO 동결용액에서 각각 7분씩 상온에서 방치하고 0.25 ml straw에 50 μ l의 1.5 M DMSO와 함께 넣는다. 뜨거운 forceps를 이용하여 양 끝을 봉합한 다음 세포동결기를 이용하여 전핵시기 배아의 동결방법과 동일한 방법으로 동결을 시행하였다.

5. 해빙 및 배아이식 과정

해빙은 급속해빙방법($500^{\circ}\text{C}/\text{min}$)을 이용하였다. 즉, 액체질소에서 꺼낸 straw를 상온에서 40초간 방치한 후 35°C 환온수조에서 완전히 녹을 때까지 시행하였다. 해빙된 전핵시기의 배아는 1.0 M PROH + 0.2 M sucrose, 0.5 M PROH + 0.1 M sucrose 에서 각각 5분씩 처리한 후 0.2 M sucrose와 dPBS에서 10분씩 처리하여 배양액

으로 옮겨 이식시 까지 배양하였다. 2-8세포기 배아의 경우, 해빙방법은 전핵시기 배아와 동일한 방법으로 시행하였으며 해빙된 배아는 1.25 M DMSO, 1.0 M DMSO, 0.75 M DMSO, 0.5 M DMSO, 0.25 M DMSO, dPBS에서 각각 7분씩 상온에서 처리한 후 배양액으로 옮겼다.

해빙된 전핵시기의 배아의 경우, 3-4 시간 배양하여 전핵이 보이고 세포질이 투명한 경우에 생존한 것으로 하였고 2일 간 배양하여 이식하는 날 오전에 2세포기 이상으로 발생한 배아만을 이식하였으며, 2-8세포기의 배아는 생존한 할구수에 따라 생존률을 나타냈다. 전핵시기 배아와 2-8세포기 배아 모두 이식하는 날 아침에 보조부화술 (assisted hatching)을 시행하였다. 보조부화술은 0.2% acid Tyrode's solution을 이용하여 투명대의 일부분을 녹여주었으며 제거 가능한 세편들도 제거해 주는 방법을 이용하였다.

임신에 대한 확인은 이식 후 10일째에 혈청내 β -hCG를 측정하여 5 mIU/ml 이상인 경우를 임신으로 판정하였으며 2일, 1주일 간격으로 계속 측정하여 증가양상을 보이고 7주째에 태아의 심장박동이 초음파상으로 확인된 경우를 임상적 임신으로 판정하였다.

6. 통계처리

결과에 대한 통계적 분석은 Chi-squared test와 Fisher's exact test를 이용하였고, p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1995년 1월부터 1996년 10월까지 배아의 동결-용해 후 이식을 시행한 환자는 245명에 267주기였으며, 그 중 149례는 일반적인 체외수정을 시행한 경우이고 118례는 ICSI를 시행한 후 배아를 동결보존 한 경우였다. 표 1은 배아의 동결-용해 후 생존율을 나타낸 것으로 일반적인 체외수정 방법으로 얻은 배아의 경우, 전핵시기가 58.2%, 2-8세포기 시기가 65.2%로 차이가 없었고 전핵시기와 2-8세포기를 함께 동결-용해한 경우가 40.2%로 다소 낮은 경향을 나타냈으나 통계적인 유의성은 없었다. 한편 ICSI방법으로 얻은 배아의 경우, 전핵시기가 63.5%, 2-8세포기가 68.2%, 전핵 및 2-8세포기가 64.0%로 비슷하였으며 세 군 모두에서 일반적인 체외수정방법으로 얻은

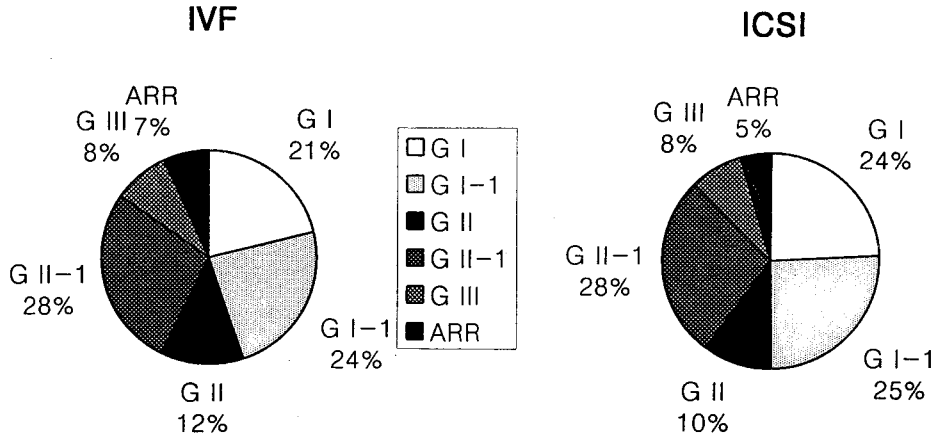


Fig. 1. Development of Embryos after Thawing of Cryopreserved PN Stage Embryos.

* G I : even blastomeres, no fragmentation ; G I-1 : even blastomeres, <25% fragmentation ; G II : uneven blastomeres, no fragmentation ; G II-1 : uneven blastomeres, 25 - 50% fragmentation ; G III : uneven blastomeres, > 50% fragmentation ; ARR : embryos arrested at PN stage.

Table 1. Survival Rate of Cryopreserved Embryos obtained from Conventional IVF and ICSI

	Cryo Stage	No. of Thawed Embryo	No. of Survived Embryo	Survival Rate (%)	Cleavage Rate (%) ^a
IVF	PN	696	405	58.2	377(53.4) ^a
	EM	230	150	65.2	
	PN+EM	97	39	40.2	
	Total	1033	594	57.5	
ICSI	PN	620	400	63.5	380(61.3) ^b
	EM	122	84	68.2	
	PN+EM	50	32	64.0	
	Total	792	516	65.2	

PN: Pronuclear stage oocyte, EM: 2-8 cell stage embryo

^aPercentage of thawed embryos cleaved more than 2-cell stage

a,b: p<0.05

배아의 경우보다 약간 높은 생존율을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 그러나 전핵 시기 배아의 동결-융해 후 이식할때 까지 2세포기 이상으로 발생한 발생률은 ICSI를 시행한 경우가 61.3%로 일반적인 체외수정을 시행한 경우 (53.4%)보다 통계적으로 유의하게 높았다 (p < 0.05).

전핵시기 배아의 동결-융해 후 이식할때까지의 발생양상을 보면 일반적인 체외수정으로 얻어진 배아의 경우, 융해한 후 2세포기 이상으로 발

Table 2. Pregnancy Rate of Cryopreserved Embryos obtained from Conventional IVF and ICSI

	Cryo Stage	Thawed Cycle	ET Cycle	Clinical Preg. [*]
IVF	PN	97	93	29(31.2%)
	EM	40	32	6(18.8%)
	PN+EM	12	9	3(33.3%)
	Total	149	134(89.9%)	38(28.4%)
ICSI	PN	91	87	26(29.9%)
	EM	22	19	6(31.6%)
	PN+EM	5	5	2(40.0%)
	Total	118	111(94.1%)	34(30.6%)

PN: Pronuclear stage oocyte, EM: 2-8 cell stage embryo

^{*} Pregnancy rate per embryo transfer

생한 207개의 배아 중 할구의 크기가 동일하고 발생양상이 가장 좋은 grade I 배아의 비율이 21.2%, 세편이 25% 이하인 grade I-1 배아가 23.7%, 세편은 없으나 할구의 크기가 불규칙한 grade II 배아의 비율이 12.3%, 할구의 크기도 불규칙하고 세편이 25 - 50%인 grade II-1 배아가 27.6%, 세편이 50% 이상인 가장 앞쪽은 배아의 비율은 8.4%였으며 전핵시기에서 발생하지 못한 배아는 6.9%였다. ICSI 방법으로 얻어진 배아의 경우, grade I이 24.3%, grade I-1이 25.5%, grade II가 10.3%, grade II-1이 27.5%, grade III가 7.8%, 전핵시기에서 발생하지 못한 배아가 4.8%로 일반적인 체외수정방법으로 얻어진 배아와 발생양상에

서 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 1).

일반적인 체외수정 방법으로 얻어진 배아를 동결-융해한 경우, 전핵시기는 97주기중 93주기에서 배아이식을 시행하여 29례에서 임신에 성공하였고 2-8세포시기는 40주기중 32주기에서 배아이식을 시행하여 6례에서 임신했으며 전핵시기 및 2-8세포시기의 배아를 모두 동결한 경우 12주기중 9주기에서 배아이식을 시행하여 3례에서 임신에 성공하였다. 따라서 전체적인 평균 임신율은 28.4%였다. ICSI방법으로 얻어진 전핵시기 배아만을 동결-융해한 경우는 91주기 중 87주기에서 배아이식을 시행하여 26례에서 임신이 되었고 2-8세포기 배아의 경우 22주기 중 19주기에서 이식을 시행하여 6례에서 임신되었다. 또한 ICSI를 시행하여 전핵시기 및 2-8세포기 배아를 모두 동결 한 경우, 5주기에서 이식을 시행하여 2례에서 임신에 성공하여 평균 임신율은 30.6%로 일반적인 체외수정방법으로 얻어진 배아의 임신율보다 다소 높은 경향을 나타냈으나 통계적인 유의성은 없었다. 따라서 일반적인 체외수정 방법이나 ICSI방법으로 얻어진 배아는 발생시기에 관계없이 동결-융해 후 비슷한 임신율을 나타낸다는 것을 알 수 있었다 (Table 2).

고 찰

Trounson 등(1983)이 사람의 8세포기 배아를 동결 융해 후 이식하여 최초의 임신에 성공한 이래 여러가지 방법을 이용하여 동결 배아의 이식에 의한 임신이 많이 보고되었고 현재 세계적으로 IVF를 시행하고 있는 대부분의 기관에서 동결보존은 필수적인 방법이 되고 있다. 또한 GnRH agonist의 사용으로 다수의 난자를 얻게되어 난자 및 수정란의 동결보존은 여러가지 방법으로 시행되고 있다. 그러나 난자의 동결보존은 많은 문제점이 있어 전핵시기나 2-8세포기 또는 포배기 배아의 동결보존이 많이 이용되고 있다. 즉 난자를 동결보존 할 경우 해빙 후에 투명대의 구조적, 생화학적 변화가 일어나 수정과정에서 어려움이 있을 수 있고 (Carroll *et al.*, 1990), 염색체 및 microtubule의 상태가 불안정하여 해빙 후에 상해를 많이 입는 것으로 알려져 있다 (Chen 1986). Kazem 등(1995)은 동결 융해 후 얻은 74개의 난자를 일반적인 체외수정방법과 ICSI방법으로 나누어 수정시킨 결과 ICSI방법의 수정률이

유의하게 높았다고 보고한 바 있으나 난자의 동결 융해 후 생존율과 그 후의 수정률이 너무 낮아 실용화 하기에는 어려운 것으로 생각된다.

1990년대 초반부터 ICSI방법이 개발되어 기존의 방법으로 수정이 어려웠던 환자들도 많은 수의 수정란을 얻을 수 있게 되었고 (Van Steirteghem *et al.* 1993 a,b) 따라서 이러한 환자들의 경우에도 동결보존이 많이 행해지게 되었다. Van Steirteghem 등(1994)은 ICSI를 시행한 환자들의 2-16세포기 수정란을 DMSO를 이용하여 동결보존한 후 이식하여 53%의 생존율과 13%의 임상적 임신율을 보고하여 기존의 체외수정 방법과 차이가 없음을 보고한 바 있다. 그러나 이 논문에서는 기존의 체외수정방법 (27.0%)에서 보다 높은 유산율 (40.9%)을 나타내어 더 많은 연구를 필요로 한다고 언급하였다. 본 연구에서도 ICSI방법으로 얻은 수정란의 동결-융해 후 생존율은 전핵시기에서 63.5%, 2-8세포기에서 68.2%로 다른 연구자들과 비슷한 결과를 얻었다 (Cohen *et al.*, 1986, 1988; Freeman *et al.*, 1986; Demoulin *et al.*, 1991; Van der Elst *et al.*, 1994). 이러한 결과는 일반적인 체외수정방법으로 얻은 수정란의 동결융해 후 결과와도 비슷하여 전핵시기 배아의 생존율이 58.2%, 2-8세포기 배아에서 65.2%였다. 그러나 전핵시기와 2-8세포기 배아를 동시에 동결-융해한 경우는 40.2%로 다소 낮은 경향을 나타내었는데, 이것은 전핵시기의 배아를 동결한 후, 남은 배아를 당 주기에 이식하는 과정에서 상태가 좋지 못한 잉여의 배아를 동결하였기 때문으로 사료된다. 그러나 전반적으로 체외수정방법이나 ICSI방법으로 얻은 배아들은 발생 단계별로 생존율에는 크게 차이가 없는 것으로 보아 ICSI를 시행한 환자들로 부터 얻은 배아도 발생시기에 관계없이 동결보존할 수 있을 것으로 생각된다.

전핵시기의 배아를 동결-융해한 후 생존율을 보면 체외수정 방법과 ICSI방법에서 차이가 없었으나 동결-융해 후 최소한 2세포기 이상의 배아로 발생한 배아의 비율은 ICSI 방법에서 통계적으로 유의하게 높았다. 이것은 난자와 정자를 수정시키는 시간이 ICSI 방법에서 보다 일정하게 유지됨으로써 비교적 동일한 시간에 전핵을 형성한 배아를 동결했기 때문이라고 판단된다.

전핵시기 배아를 동결-융해한 후 배아의 발생 양상을 살펴보면 ICSI방법으로 얻은 전핵시기의

배아가 용해 후에 발생 양상이 다소 양호한 것을 알 수 있었다. 즉 할구의 크기가 일정하고 세편이 거의 존재하지 않는 양질의 수정란 (grade I)의 비율을 보면 체외수정 방법이 21.2%, ICSI 방법이 24.3%로 약간 높은 비율을 차지하고 있으며 임신율 기대할 수 있는 grade II (세편이 없고 할구의 크기가 일정치 않은 배아) 이상인 배아의 비율도 ICSI 방법에서 다소 높은 경향을 나타내었다. 또한 상태가 가장 좋지 못한 grade III 배아와 전핵시기에서 발생이 정지된 배아의 비율이 ICSI 방법에서 훨씬 낮은 것으로 보아 역시 동일한 시기에 수정되어 동결보존되었던 수정란이 용해 후에도 좋은 발생양상을 나타내었다고 보여진다 (Fig. 1).

체외수정방법이나 ICSI방법에 의해 얻어진 수정란을 동결-용해 후 이식한 결과, 임상적 임신율에서도 각 배아의 동결시기에 관계없이 비슷한 임상적 임신율을 나타내었다 (Table 2). 이것은 Al-Hasani 등(1996)이 발표한 결과와 임신율은 차이가 없지만, 배아의 용해 후 생존율은 본 연구 결과보다 높고 또한 이식한 배아의 숫자도 본원의 경우보다 적어, 결과적으로 착상률은 다소 낮을 것으로 생각되므로 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 원에서는 1994년 ICSI 방법을 처음 시도하였고 높은 수정률과 임신율을 보고한 바 있으며 (Jun et al., 1995), 또한 선택적 보조 부화술을 이용하여 높은 임신율을 보고 한 바 있다 (Lee et al., 1995). 따라서 동결 수정란 이식과정에서도 보조 부화술을 이용하여 상해를 입은 할구나 세편들을 제거해 줌으로써 보다 높은 임상적 임신율을 얻을 수 있었다고 생각된다.

결론적으로 본 연구결과를 종합해 보면, ICSI 방법으로 얻은 수정란도 발생시기에 관계없이 동결보존할 수 있으며, 특히 ICSI방법으로 얻어진 전핵시기 배아의 용해 후 생존율이나 배발생률이 체외수정 방법으로 얻어진 배아의 경우보다 높은 것은 보다 동일한 시기에 수정이 이루어지므로 전핵형성시기도 일정하게 되어 배아의 발생양상이 보다 안정되므로 보다 좋은 상태의 배아를 획득하여 동결보존할 수 있었기 때문이라고 판단된다. 따라서 ICSI방법으로 얻어진 잉여의 수정란도 일반적인 체외수정 방법에서 얻어진 수정란과 동일하게 발생시기에 관계없이 동결보존할 수 있음을 알 수 있었으며 또한 배아

용해 후 선택적 보조부화술과 병행하여 상해를 입은 할구나 세편들을 제거하면 보다 높은 임신율을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

1990년대 초반 ICSI방법의 개발로 기존의 체외수정방법으로는 수정이 어려웠던 환자들에게서도 만족할 만한 수정율을 얻을 수 있었고 이에 따라 많은 수의 수정란을 얻을 수 있게 되었다. 따라서 이러한 잉여의 수정란들의 동결보존이 많이 행해졌으며 이러한 수정란의 동결-용해 후의 결과도 많이 보고되었다. 본 원에서도 1994년 5월 부터 ICSI방법을 이용하여 임신에 성공하였고 ICSI방법으로 얻어진 수정란의 동결보존도 많이 수행되었다. 따라서 본 연구는 1994년 5월부터 1996년 8월까지 본 원에서 일반적인 체외수정방법과 ICSI방법을 시행한 후, 잉여의 수정란을 동결보존한 환자들 중 1995년 1월 부터 1996년 10월 까지 동결수정란 이식을 시행한 267례를 대상으로 배아용해 후 이식의 결과를 알아보기 위해 수행되었다.

1. ICSI방법으로 얻어진 전핵시기, 2-8세포기, 전핵시기 + 2-8세포기 배아의 용해 후 생존율은 각각 63.5%, 68.2%, 64.0% 였으며 총 792개의 배아중 516개가 이식에 적합하여 평균 65.2%의 생존율을 보였다.

2. 일반적인 체외수정방법으로 얻어진 배아의 용해 후 생존율은 전핵시기의 배아가 58.2%, 2-8세포기 배아가 65.2%, 전핵시기 + 2-8세포기 배아가 40.2% 였으며 총 1033개의 배아중 594개의 배아가 생존하여 57.5%의 생존율을 나타내었다.

3. ICSI방법으로 얻어진 배아를 동결-용해한 후 이식한 111주기중 34례에서 임신에 성공하여 30.6%의 임신율을 얻었고, 체외수정 방법으로 얻어진 배아의 동결-용해 후 이식의 결과는 134주기중 38례에서 임신에 성공하여 28.4%의 임신율을 얻었다. 따라서 두 방법간의 임신율의 차이는 없었다.

4. 일반적인 체외수정 방법과 ICSI방법으로 얻어진 전핵시기의 배아만을 동결-용해 한 후 생존율은 각각 58.2%와 65.2%로 ICSI 방법으로 얻어진 배아의 생존율이 다소 높은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 그러나 용해 후 생존한 배아가 2세포기 이상으로 발생한 경우는 ICSI방

법의 경우가 61.3 %로 일반적인 체외수정의 경우 (53.4%) 보다 통계적으로 유의하게 높았다. 또한 이들 배아의 발생양상을 보면, grade II 이상의 양질의 배아로 발생된 배아의 비율도 ICSI의 경우 60.1%로 일반적인 체외수정의 경우 (57.2%) 보다 다소 높은 경향을 나타내어 ICSI방법으로 얻어진 전핵시기의 배아가 음해 후 보다 좋은 발생양상을 보임을 알 수 있었다.

결론적으로 ICSI방법으로 얻어진 배아도 발생 시기에 관계없이 성공적으로 동결보존할 수 있으며 기존의 체외수정 방법으로 얻어진 배아의 결과와 임신율에서 큰 차이가 없다는 것을 알 수 있었다. 특히 전핵시기 배아의 경우 ICSI 방법으로 얻어진 배아의 음해 후 발생률이 일반적인 체외수정 방법으로 얻어진 배아의 경우보다 높은 것은 동일한 시기에 수정을 시킬 수 있으므로 일정한 시기의 전핵시기 배아를 동시에 동결하였기 때문이라고 생각된다. 따라서 보다 많은 수의 전핵시기의 배아를 동결보존하면 다태아 임신을 감소시킬 수 있고, 과배란 증후군의 발생이 예상되는 주기에서 모든 수정란을 동결보존하므로써 심각한 합병증을 예방하고 후에 안전한 임신을 기대할 수 있다고 생각된다.

인 용 문 헌

- Al-Hasani S, Ludwig M, Gagsteiger F, Kupker W, Sturm R, Yilmaz A, Bauer O, Diedrich K: Comparison of cryopreservation of supernumerary pronuclear human oocytes obtained after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and after conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1996, 11, 604 - 607.
- Carroll J, Depyere H, Matthwes CD: Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1990, 90, 547 - 553.
- Chen C: Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986, 2, 884.
- Cohen J, Simons RS, Fehilly CB, Edwards RG: Factors affecting survival and implantation of cryopreserved human embryos. *J IVF ET* 1986, 3, 46 - 52.
- Cohen J, Kort HI, DeVane GW, Massey JB, Elsner CW, Turner TG, Fehilly CB: Cryopreservation of zygotes and early cleaved human embryos. *Fertil Steril* 1988, 49, 283 - 289.
- Demoulin A, Jouan C, Gerday C, Dubois M: Pregnancy rates after transfer of embryos obtained from different stimulation protocols and frozen at either pronucleate or multicellular stages. *Hum Reprod* 1991, 6, 799 - 804.
- Freeman L, Trounson A, Kirby C: Cryopreservation of human embryos : Progress on the clinical use of the technique in human in vitro fertilization. *J IVF ET* 1986, 3, 53 - 61.
- Fugger EF, Dorfmann AD, Bustillo M, Bender SD, Katz LP, Schulman JD: Embryonic development and pregnancy from fresh and cryopreserved sibling pronucleate human zygotes. *Fertil Steril* 1988, 50, 273 - 278.
- Hartshorne GM, Elder K, Crow J, Dyson H, Edwards RG: The influence of in-vitro development upon post-thaw survival and implantation of cryopreserved human blastocysts. *Hum Reprod* 1991, 6, 136 - 141.
- Jun JH, Lee HJ, Kim JW, Park YS, Lee YS, Hong JY, Son IP, Jun JY: Fertilization and pregnancy rate of intracytoplasmic sperm injection. *K J Fertil Steril* 1994, 21, 247 - 252.
- Kazem R, Thompson LA, Srikantharajah A, Laing MA, Hamilton MPR, Templeton A: Cryopreservation of human oocytes and fertilization by two techniques: in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995, 10, 2650 - 2654.
- Lee HJ, Kim JW, Byun HK, Jun JH, Son IP, Jun JY: The effect of assisted hatching (AHA) on pregnancy rates in human IVF-ET. *K J Fertil Steril* 1995, 22, 183 - 189.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A: Pregnancy after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992, 340, 17 - 18.
- Quinn P, Kerin JFP: Experiences with the cryopreservation of human embryos using the mouse as a model to establish successful techniques. *J IVF ET* 1986, 3, 40 - 45.
- Stephoe PC, Edwards RG: Birth after reimplantation

- of a human embryo. *Lancet* 1978, 2, 366.
- Trounson A, Mohr L: Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983, 305, 707.
- Van der Elst J, Van den Abbeel E, Joris H, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem AC: Cryopreservation of supernumerary multicellular human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994, 9(Suppl.4), 55.
- Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Zsolt N, Janssenswillen C, Tournaye H: Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal sperm insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod* 1993a, 8, 1055 - 1060.
- Van Steirteghem AC, Zsolt N, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J: High fertilization and im-plantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993b, 8, 1061 - 1066.
- Van Steirteghem AC, Joris H, Van der Elst J, Camus M, Van den Abbeel E, Devroey P: Cryopreservation of supernumerary multicellular human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994, 62, 775 - 780.
- Veeck LL, Amundson CH, Brothman LJ: Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. *Fertil Steril* 1993, 59, 1202 - 1207.
- Yang HW, Choi KY, Cheon HS, Cha YB, Lee SJ, Park JM: Pregnancy and development rates of human embryos cryopreserved at pronuclear and 2-8 cell stages. *K J Fertil Steril* 1994, 21, 69 - 76.
-