

시험관 아기 시술에서 여성의 연령이 수정란의 질과 다태 임신 발생에 미치는 영향

울지대학부속병원, 불임연구소, 산부인과¹, 울지병원 의과학연구소²
이명섭 · 박장욱 · 정지학¹ · 박준숙¹ · 강희규² · 김동훈² · 이호준²

Influence of Maternal Age on Embryo Quality and the Frequency of Multiple Pregnancy in IVF-ET Program

Myeong Seop Lee, Jang Ok Park, Ji Hak Jung¹, Jun Suk Park¹,
Hee Gyoo Kang², Dong Hoon Kim², Ho Joon Lee²

Laboratory of Infertility, ¹Department of OB/GY, Eulji University Hospital, Daejeon 301-726;
²Medical Science Institute, Eulji Medical Center, Seoul 139-711, Korea

Objective: This study was performed to evaluate the influence of maternal age on embryo quality and the frequency of multiple pregnancy in IVF-ET program.

Method: 86 conventional IVF-ET cycles were divided into three groups according to the age by 5 year (group A: 26-30, group B: 31-35, group C: 36-40 yrs). The *in vitro* fertilization and development outcome (fertilization, cleavage and high quality embryo rate) and the pregnancy outcome (pregnancy, implantation, G-sac/high quality embryo and multiple pregnancy rate) were examined. And then, these results were compared among the groups.

Results: The rates of fertilization (62.7, 68.5 and 65.4%, respectively) and cleavage (95.6, 97.6 and 98.0%, respectively) were not different among the groups. And the high quality embryo (HQE) rate also was not different among the groups (61.8, 62.9 and 62.8%, respectively). The pregnancy rate of group C (23.3%) was significantly lower than that of group A (41.2%) and B (48.7%). And the implantation rate was significantly decreased with advance in maternal age (group A; 17.3%, B; 12.6% and C; 6.0%). The G-sac/high quality embryo rate was significantly higher in group A (70.8%) when compared to group B (32.2%) and C (40.0%). On the other hand, the multiple pregnancy rate was significantly lower in group C (14.3%) when compared to group A (71.4%) and B (36.8%).

Conclusion: The pregnancy rate was significantly decreased over 35 years. The G-sac/HQE and multiple pregnancy rate were significantly high below 31 years. Thus, these results suggest that the number of high quality embryo transferred should be limited by the age and another criteria for embryo quality evaluation were required for single embryo transfer.

Key Words: Maternal age, Embryo quality, Multiple pregnancy, High quality embryo

여성에 있어서 임신 능력은 30대 초반부터 감소하기 시작해서 30대 후반과 40대 초반에 가속화된다.¹ 나이에 따른 임신 능력의 저하는 주로 난

모세포의 고갈에서 기인하는데 30대 부터 난소의 기능이 저하되기 때문이다.² 이러한 경향은 시험관 아기 시술에서도 나타나는데 대체적으로 여성

이 35세 이후인 경우 임신율이 현저히 감소하는 것으로 보고되고 있다.^{3,4}

시험관 아기 시술시 임신 성공 요인에 있어서 가장 직접적인 인자는 이식된 수정란의 질과 수로 알려져 있다.^{5,6} 따라서, 지금까지는 임신율을 높이기 위해 다수의 수정란을 이식하는 것이 일반적인 추세가 되어 왔다. 그렇지만, 이러한 다수의 수정란 이식은 다태 임신 (multiple pregnancy)의 발생과 밀접한 관계를 갖고 있으며,⁷ 또한 다태 임신은 의료비용을 증가시키며 산모와 태아에 위험도를 증가시키는 등 심각한 문제를 유발시킨다.⁸ 이러한 다태 임신의 문제점을 해결하고자 최근에는 수정란의 질적 등급을 다양한 세포단계에서 판정하고 상급 수정란 (HQE, high quality embryo)만을 이식하여 다태 임신의 예방 및 수정란 효율의 증진을 시도한 연구 결과들이 보고되고 있으며, 다태 임신의 예방을 위해서는 이식 수정란의 수를 제한하고 최종적으로는 단일 수정란 이식 (single embryo transfer)이 가장 이상적인 예방법이 될 수 있다.⁹⁻¹²

시험관 아기 시술시 각 주기별 수정란의 체외 발생능과 착상능에는 상당한 변이가 있어서 단순히 형태학적인 등급만으로 이식 수정란의 수를 정하기는 매우 어렵다. 시험관 아기 시술 성공에 영향을 미치는 여러 요인을 종합하여 이식 수정란의 수를 조정하여야 하며, 특히 기본 요인인 연령에 따른 수정란의 질과 착상능을 비교 검토하는 연구가 선행되어야 한다.

따라서 본 연구에서는 일반적인 체외수정 시험관 아기 시술에서 여성의 연령이 시험관 아기 시술의 임신 성적에 미치는 영향을 조사하고, 다태 임신의 예방이라는 측면에서 연령대별 수정란의 체외발생과 착상 및 다태 임신의 발생을 비교하여 고찰하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 을지대학 부속병원 불임센터에서 1997년 11월부터 2000년 4월까지 시행한 시험관 아기 시술 중 일반적인 체외수정 86주기를 대상으로 하였다. 연구 대상을 환자의 연령을 기준으로 26세에서 40세까지 5년 단위로 군을 나누어 (group A: 26-30, B: 31-35, C: 36-40) 군간의 체외수정, 발달 및 이식 성적을 비교하였다.

2. 다배란 유도

다배란 유도는 주로 GnRH-agonist와 hFSH/hMG를 병용한 장기요법으로 시행하였으며 18 mm 이상의 난포가 2개 이상 존재하는 경우 10,000 IU의 hCG를 주사하였고, 주사 후 36시간 경에 질식 초음파를 이용하여 난자를 채취하였다.

3. 난자 및 정자의 준비

채취한 난자-난구 복합체는 해부현미경 하에서 성숙도를 판정하였고 10% SSS (Synthetic serum substitute, Irvine)가 첨가된 P1 (Preimplantation one, Irvine) 배양액에서 배양을 실시하였다.

정자는 10% SSS가 포함된 F-10 Nutrient Mixure (Ham's F-10, Gibco) 배양액으로 Swim-up 방법에 의해 준비하였다. 난자 채취 후 4~8시간에 수정을 실시하였으며, 이때 정자의 최종 농도는 $1 \sim 2 \times 10^5$ live sperms/ml 이었다.

4. 수정 및 난할의 확인과 배양

체외수정 후 18~20시간에 해부현미경 하에서 미세 피펫으로 난구세포를 제거하여 자성전핵과 융성전핵의 형성 및 이차 극체의 방출을 관찰하여 수정여부를 확인하였다.

수정이 확인된 수정란은 20% hFF (human follicular fluid)가 포함된 P1 배양액에서 이식시까지 배양하였다. 난할율은 수정 확인 후 24시간에 조사하였다. 한편, hFF는 난자 채취시 성숙난자가 포함된 난포액을 회수한 후, 시험관 아기 시술에서 임신이 확인되고 전염성 질병 및 산부인과적 문제가 없는 환자의 난포액만을 선별하여 사용하였다.

5. 수정란의 형태학적 등급 및 상급 수정란 (HQE)의 판정

수정란의 형태학적 등급은 Veeck에 의한 방법을¹³ 변형하여 5단계로 판정하였다. 수정란을 세포질내 fragmentation의 정도에 따라 Grade 1 (0%), 2 ($\leq 25\%$), 3 ($\leq 50\%$), 4 ($\leq 75\%$), 5 ($> 75\%$)으로 구분하고, 할구가 비균일하면 한 단계씩 하향 조정하여 최종 등급을 판정하였다.

상급 수정란 (HQE)은 수정란의 형태학적 등급이 G2 이상이고, 수정 후 2일에 이식한 경우 4세포기 이상 또는 3일에 이식한 경우 6세포기 이상인 수정란으로 정의하였다.

6. 수정란 이식 및 임신 확인

수정란의 이식은 수정 후 2일 또는 3일에 실시하였고, 보조부화술을 병행하는 경우에는 보조부화술 시행 후 3~5시간째에 수정란을 자궁에 이식하였다. 임신 확인은 이식 후 11~12일에 혈청

내 β -hCG를 측정하여 10 mIU 이상이고, 이식 3주 후에 질식 초음파 검사에서 태낭 (gestational sac) 이 관찰되는 경우를 임상적 임신으로 정의하였다. 다태 임신은 임상적 임신 중 태낭이 2개 이상인 경우로 정의하였다.

7. 통계학적 분석

결과에 대한 분석은 통계프로그램 Microsoft Excel을 이용하여 Chi-square (χ^2) test와 t-test를 실시하였으며, $p < 0.05$ 이하의 유의성만을 통계학적 차이로 인정하였다.

결 과

Table 1에서는 각 군의 불임원인을 유형별로 정리하였다. 모든 군에서 난관요인이 주된 원인이었으며 배란장애나 원인불명인 경우가 약간씩 존재하였다.

Table 2에서는 각 군의 체외수정 및 배양 성적을 비교하였다. 회수된 난자의 수는 C군 (8.5 ± 5.7) 이 A군 (14.4 ± 8.8), B군 (13.0 ± 8.1)보다 유의적으로 낮았다. 수정율은 A군, B군, C군에서 각각 62.7,

Table 1. Causes of infertility

	Group A	Group B	Group C
Age (years)	26-30	31-35	36-40
Number (n)	17	39	30
Etiology			
tubal	11	23	22
ovulatory	4	5	0
unexplained	2	5	4
peritoneal	0	4	1
male	0	1	1
uterine	0	0	2
cervical	0	1	0

Table 2. Comparison of *in vitro* fertilization and development outcome among the groups

	Group A	Group B	Group C
No. of oocytes retrieved	14.4 ± 8.8^a	13.0 ± 8.1^a	8.5 ± 5.7^b
Fertilization rate (%) [*]	143/228 (62.7)	344/502 (68.5)	157/240 (65.4)
Cleavage rate (%)	131/137 (95.6)	286/293 (97.6)	148/151 (98.0)
HQE rate (%) ^{**}	81/131 (61.8)	180/286 (62.9)	93/148 (62.8)

^{*}No. of 2PN / No. of oocytes inseminated

^{**}No. of high quality embryos / No. of embryos cleaved

Values within rows with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

Table 3. Comparison of pregnancy outcome among the groups

	Group A	Group B	Group C
No. of embryos transferred	5.8 ± 1.9^a	5.7 ± 3.0^a	4.4 ± 2.0^b
Pregnancy rate (%)	7/17 (41.2) ^{ab}	19/39 (48.7) ^a	7/30 (23.3) ^b
Implantation rate (%)	17/98 (17.3) ^a	28/223 (12.6) ^{ab}	8/133 (6.0) ^b
G-sac/HQE rate (%)	17/24 (70.8) ^a	28/87 (32.2) ^b	8/20 (40.0) ^b
Multiple pregnancy rate (%) [*]	5/7 (71.4) ^a	7/19 (36.8) ^{ab}	1/7 (14.3) ^b

^{*}No. of multiple pregnancy / No. of pregnancy

Values within rows with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

68.5, 65.4%로 통계학적으로 유의차가 없었으며, 난할율도 각각 95.6, 97.6, 98.0%로 통계학적으로 유의차가 없었다. 상급 수정란 (HQE)의 형성율은 배양된 수정란 중 상급 수정란의 비율을 나타내는데 각각 61.8, 62.9, 62.8%로 유의한 차이가 없었다.

Table 3에서는 각 군의 임신 성적을 비교하였다. 이식된 수정란의 수는 C군 (4.4 ± 2.0)이 A군 (5.8 ± 1.9), B군 (5.7 ± 3.0)보다 유의적으로 낮았다. 임상적 임신율은 각각 41.2% (A군), 48.7% (B군), 23.3% (C군)로서, 36세 이후에서 통계학적 유의차를 보이며 감소하였다. 착상율의 경우에도 17.3% (A군), 12.6% (B군), 6.0% (C군)로 36세 이후에서 통계학적 유의차를 보이며 감소하였다. 그런데, 이식된 수정란의 상급 수정란과 태낭의 비율은 각각 70.8, 32.2, 40.0%로 31세 이후에서 통계학적 유의차를 보이며 감소하였다. 또한 다태 임신의 발생율은 각각 71.4, 36.8, 14.3%로 31세 이후에 통계학적 유의차는 없었으나 감소하기 시작하였고, 36세 이후에는 유의하게 감소하였다.

고 찰

여성의 연령은 자연 수태능 뿐만 아니라 시험관 아기 시술의 성공에 영향을 미치는 주요한 인자이다. Table 3에서 보는 바와 같이 36세 이상의 주기에서 임신 성적이 급격히 감소하였는데, 회수된 난자의 수 및 이식된 수정란의 수가 감소하기 때문이다. 이러한 결과는 이전에 보고된 결과들과 일치하고 있다. Stolwijk 등³은 36세 이상의 여성에서는 누적 임신율이 그 이하의 여성보다 유의적으로 감소한다고 보고하였고, Tan 등⁴과 Check 등¹⁴도 유사한 결과를 보고하였다. 시험관 아기 시술에서 여성연령의 증가에 따른 임신율의 감소는 자궁내막의 수용성 (endometrial receptivity)과 이식된 수정란의 착상능이라는 두가지 측면에서 검토할 수 있으며, 이러한 사실은 난자 공여 시험관 아기 시술을 통해 얻은 자료를 통해 보다 잘 알 수 있다. Cohen 등¹⁵은 난자 공여 시술주기에서 공여자의 연령대를 20세부터 3년 단위로 구분하여 임신율을 비교한 결과 28세 이하에서 유의적으로 높은 임신율이 나타나는 것으로 보고하였고, Shulman 등¹⁶은 난자 공여 시술주기에서 공여자가 35세 이상인 경우에서, 수란자가 45세 이상인 경우에서 각각 임신 성적이 유의적으로 감소함을

보고하였다. 따라서 연령의 증가에 따른 임신율의 감소는 자궁내막의 수용성보다는 이식된 수정란의 착상능이 연령이 증가함에 따라 감소하기 때문이라고 사료된다.

상급 수정란은 발달 단계와 형태학적 등급을 종합적으로 판정하여 착상능이 우수하다고 추정되는 수정란으로 이식에 우선적으로 이용된다. 상급 수정란에 대한 기준은 연구자마다 조금씩 다르지만 대체적으로 2일째 이식인 경우 4세포기 이상 또는 3일째 이식인 경우 6세포기 이상이고 세포질내 fragmentation이 25% 이하인 수정란을 상급 (High quality) 수정란으로 정의할 수 있다.^{6,9,10,13,17} Table 2에서 체외발생능 (수정율, 난할율, 상급 수정란 형성율)에는 연령대별로 유의적 차이 없이 고른 분포를 보였지만 Table 3에서 보는 바와 같이 착상율은 31세 이후 감소하였고, 태낭과 이식된 상급 수정란의 비율은 30세 이하에서 유의적으로 높았으며 다태 임신의 발생율과 비례함을 알 수 있었다. 따라서 같은 상급 수정란의 경우에도 연령에 따라 다른 착상능을 가진다고 할 수 있다.

Gerris 등⁸은 최상질 (top quality) 수정란을 수정 후 2일에 4세포기 이상이고, 3일에 7세포기 이상이며 다핵 할구가 없어야 하고, 20% 미만의 fragmentation을 보이는 수정란이라고 정의하였으며, 또한 하나의 최상질 수정란만을 이식하여 여성의 나이가 34세 미만인 군에서 다태 임신을 감소시켰다고 보고하였다. Tesarik 등¹¹은 접합자 (zygote) 단계에서 pronuclear morphology를 조사하여 구분한 후 이식하여, pronuclear synchrony를 보이는 수정란이 임신 및 착상에 우월하다고 보고하였다. 또한 pronuclear morphology와 기존의 수정란 선발법을 병합하면 단일 수정란 이식을 위한 효과적인 방법이 될 수 있다고 보고하였다. 이러한 연구 결과들은 이식시에 기존의 형태학적 평가 외에 다른 기준이 필요하다고 주장하고 있으며, 이것은 다태 임신의 예방을 위한 단일 수정란 이식과 수정란 효율의 증진이라는 측면에서 유용하다고 할 수 있다. 앞으로의 연구에서는 여러 기준에 의한 이식 수정란의 질적 평가와 연령대별 임신 성적을 조사하여 비교 검토하여야 한다.

결론적으로, 본 연구에서는 시험관 아기 시술에서 여성의 연령이 36세 이상이면 임신율이 급격히 감소한 반면, 30세 이하에서 다태 임신의 발생율이 높게 나타났다. 이러한 결과는 이식시 같은

상급 수정란이더라도 30세 이하의 수정란이 이후의 연령대 수정란보다 우월한 착상능을 갖기 때 문인 것으로 사료된다. 따라서 다태 임신의 예방 과 수정란 효율의 증진이라는 측면에서 상급 수정란의 이식 수를 연령대별로 제한해야 하며, 궁극적으로 단일 수정란 이식을 위해서는 기존의 수정란 평가법외에 다른 기준이 필요하다고 사료 된다.

참 고 문 헌

1. 대한 산부인과학회 교과서편찬위원회. 불임 증. In: 대한산부인과학회. 부인과학. 제3판. 서울: 도서출판 칼빈서적, 1997; p.599-600.
2. 대한 산부인과학회 교과서편찬위원회. 불임 증. In: 대한산부인과학회. 부인과학. 제3판. 서울: 도서출판 칼빈서적, 1997; p.601.
3. Stolwijk AM, Wetzels AMM, Braat DDM. Cumulative probability of achieving an ongoing pregnancy after *in-vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection according to a woman's age, subfertility diagnosis and primary or secondary subfertility. Hum Reprod 2000; 15: 203-9.
4. Tan SL, Royston P, Campbell S, Jacobs HS, Betts J, Mason B, et al. Cumulative conception and livebirth rates after *in-vitro* fertilization. Lancet 1992; 339(8806): 1390-4.
5. Erenus M, Leung S, Zouves C, Fluker M, Rajamahendran P, Gomel V. The effect of embryo quality on subsequent pregnancy rates after *in vitro* fertilization. Fertil Steril 1991; 56: 707-10.
6. Hsu MI, Mayer J, Aronshon M, Lanzendorf S, Muasher S, Kolm P, et al. Embryo implantation in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection: impact of cleavage status, morphology grade, and number of embryos transferred. Fertil Steril 1999; 72: 679-85.
7. Yaron, Y, Amit A, Kogosowski A, et al. The optimal number of embryos to be transferred in shared oocyte donation: walking the thin line between low pregnancy rate and multiple pregnancies. Hum Reprod 1997; 12: 699-702.
8. Gerris J, De Neubourg D, Mangelschots K, Van Royen E, Van De Meerssche M, Valkenburg M. Prevention of twin pregnancy after *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial. Hum Reprod 1999; 14: 2581-7.
9. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after *in vitro* fertilization. Hum Reprod 1997; 12: 1545-9.
10. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van De Meerssche M, Rychaert G, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. Hum Reprod 1999; 14: 2345-9.
11. Tesarik J, Junca AM, Hazout A, Aubriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P, et al. Embryo with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. Hum Reprod 2000; 15: 1396-9.
12. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. Fertil Steril 2000; 73: 1155-8.
13. Veeck LL. Atlas of the human oocyte and early conceptus. Vol. 2. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991: 121.
14. Check JH, Lurie D, Callan C, Baker A, Benfer K. Comparison of the cumulative probability of pregnancy after *in vitro* fertilization-embryo transfer by infertility factor and age. Fertil Steril 1994; 61: 257-61.
15. Cohen MA, Lindheim SR, Sauer MV. Donor age is paramount to success in oocyte donation. Hum Reprod 1999; 14: 2755-8.
16. Shulman A, Frenkel Y, Dor J, Levran D, Shiff E, Maschiach S. The best donor. Hum Reprod 1999; 14: 2493-6.
17. Hu Y, Maxson WS, Hoffman DI, Ory SJ, Eager S, Dupre J, et al. Maximizing pregnancy rates and limiting higher-order multiple conceptions by determining the optimal number of embryos to transfer based on quality. Fertil Steril 1998; 69: 650-7.