

체외수정시술시 미세조작술에 의한 수정률 향상과 임신에 관한 연구

제일병원 산부인과 체외수정 연구실 · *한양대학교 자연과학대학 생물학과

이호준 · 최규완 · 전종영 · 박종민 · 권혁찬 · 김문규*

Study on Pregnancy and Improvement of Fertilization rate by Micromanipulation (Partial Zona Dissection (PZD) and Micro-Insemination by Sperm Transfer(MIST) in human IVF-ET

Ho Joon Lee, Kyoo Wan Choi, Jong Yung Jun, Jong Min Park, Hyuck Chan Kwon,
Moon Kyoo Kim*

IVF Research Laboratory, Department of Obstetrics and Gynecology, Cheil General Hospital, Seoul 110,
Korea *Department of Biology, College of Natural Science, Hanyang University, Seoul 133, Korea

= Abstract =

The purpose of this study is to improve fertilization rate in IVF-ET program of patients with male infertility used micromanipulation technique, partial zona dissection (PZD) or micro-insemination by sperm transfer (MIST). The results were as follows

1. The fertilization rate of non-micromanipulated oocytes and micromanipulated (PZD) oocytes were 12.5% (n=2) and 42.2% (n=19), respectively, and showed significant differences between two groups ($p < 0.05$).
2. The fertilization rate of micromanipulated (MIST) oocytes was 30% (n=27).
3. The damage rate of Group 1 (PZD) and Group 2 (MIST) were 15.7% (3/19) and 29.6% (8/27), respectively.
4. One pregnancy resulted following replacement of micromanipulated (MIST) embryos in 4 patients.

서 론

불임치료방법으로 이용되는 체외수정시술은 여성과 남성 불임요인을 가지고 있는 환자에게서 획기적인 치료법으로서 유용하게 이용되고 있다. 특히, 여성에 의한 불임요인은 체외수정시술의 발달에 따라 많은 요인들이 해결되었으나, 남성의 불임요인인 심한 정자감소증(severe oligospermia), 운동성부전증(asthenospermia)환자의 치료는 체외수정시술에 의해서도 해결되지 않고 있다.

정상적 과정에 의한 체외수정시술에 있어 이러한 심한정자감소증 환자는 정상적인 수정을 일으킬수 있는 정자수의 부족으로, 심한 운동성

부전증환자는 난자의 투명대를 침투하여 수정을 일으킬수 있는 능력의 부족으로 인하여, 수정률이 떨어지거나, 수정이 일어나지 않는다. 따라서, 이러한 환자들을 치료하기 위하여 정자의 숫자와 활동성을 향상시킬수 있는 치료방법은 아직 미흡한 상태이다(de Kretser et al., 1986).

Uehara와 Yanagimachi(1976)는 Hamster의 핵을 추출하여 직접 난자에 주입하는 방법으로 전핵형성에 성공하였다. 그 이후로, 정자의 수정능력을 알아보기위한 실험들이 여러방법으로 진행되었다.

Laws-king등(1987)은 인간난자를 이용하여 위란강(perivitelline space)에 1개의 정자를 주입시켜 수정에 성공하였고, Lanzendorf등(1988)은 정

자를 직접 난자의 세포질에 주입시켜 수정에 성공하였다. 그후, 1988년 처음으로, Ng등이 7~10개의 정자를 위관강에 수정(insemination) 시키는 방법에 의해 수정 (fertilization)에 성공하였으며, 이수정란을 나팔관에 넣어주어 임신에 성공하였다. 한편 또다른 방법으로 Cohen 등 (1989)은 정자가 쉽게 수정할수 있도록 투명대를 부분절제 함으로써 수정률을 향상 시켰으며 임신에 성공하였다.

이와같이, 여러가지 남성불임 요인 즉, 숫자가 적거나 활동성이 떨어지거나 또는 형태학적으로 이상이 있는 등 복합적인 문제점을 가지고 있는 환자에게서 수정능력을 가지고 있는 1개 또는 여러개의 정자를 직접 난자와 수정이

일어나기 쉽게 해줌으로써 새로운 체외수정시술로서 이용되게 되었다(Ng et al., 1988; Malter et al., 1989).

따라서, 이러한 미세수정술 (micromanipulation technique)은 남성에 의해 불임인 환자들에게 새로운 치료법으로 이용될 수 있게 되었다. 그러나, 이러한 기술은 수정률이 낮고(15%) 기계적으로 난자를 다룸으로 인하여 난자의 상해률(25%)이 높기 때문에 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 보다 많은 연구가 필요하다(Sathananthan et al., 1989).

본 연구는 미세수정술을 이용하여 남성불임에 원인이 있거나, 면역적 요인에 의해 수정이 일어나지 않았던 환자들의 수정률을 향상 시키고, 수정여부를 확인하기 위해서 시행하였다.

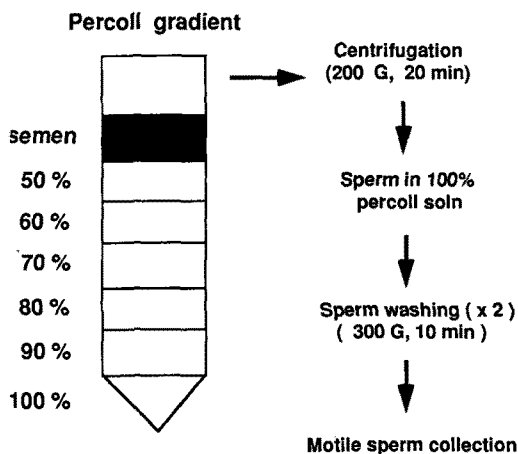


Fig. 1. Discontinuous Percoll gradient method.

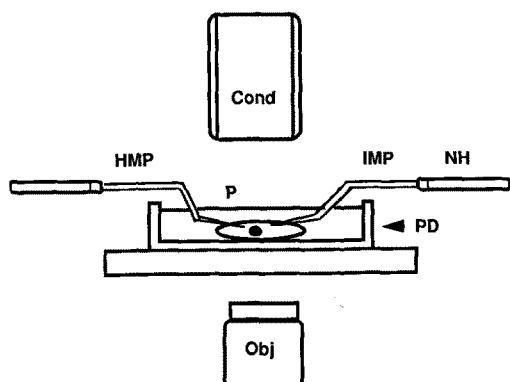


Fig. 2. Schematic diagram of microinjection system.

Oocyte (black ball), petri-dish (PD), injection micropipet(IMP), holding micropipet (HMP), needle holder(NH), paraffin oil (P) condenser (Cond), objective (Obj)

재료 및 방법

1. 대상

본 병원에서 불임치료를 받은 환자들 중 체외수정시술을 실시하여 수정이 일어나지 않았던 환자를 대상으로 하였다. 이러한 환자들은 일반적으로 면역적 이상에 의해 전주기에서 수정이 일어나지 않았거나, 심한 정자감소증(Count; $<10 \times 10^6/ml$), 운동성부전증환자 (Motility; $<10\%$)들로서 치료가 힘든 환자들이었다. 21명의 환자들에게서 실시하였는데, 6명의 환자는 부분적 투명대 절제방법을 실시하였으며, 16명의 환자에게서 미세수정법을 실시하여 체외수정시술을 실시하였다.

a. Holding Micropipet



b. Injection Micropipet

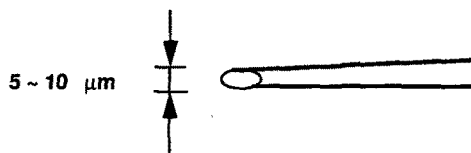


Fig. 3. Making micropipet from glass capillary tubing (Drummond Microcaps, 50 μ l capacity in 10 cm lengths).

2. 미세조작을 위한 과정

1) 난자의 획득

난자를 획득하기 위한 과배란 유도방법은 FSH (Metrodin, Serone)와 HMG (Pergonal, Serono) 그리고 hCG (Profasi, Serono) (Garcia et al., 1983; Johns et al., 1984; Bernadus et al., 1985)를 혼용한 방법과 자연주기 (Natural Cycle)에 의한 방법 (Paulson et al., 1989; Foulot et al., 1989)을 이용하였다. 난자의 획득 방법은 질식초음파 (vagina ultra-sonography, Ausonics)를 이용하였다.

과배란에 의해 획득된 난자는 성숙도에 따라 구분하여 배양접시에 옮겼으며 배양기에서 6~9시간 배양시켰다. 미세수정술을 시행하기 위하여 PBS에 0.1% bovine hyaluronidase (Type 1-S, Sigma)를 섞은 용액에서 2분간 처리하여 난자를 둘러싸고 있는 Cumulus cell들을 완전히 제거한 다음 전배양 (preincubation)을 시켰다.

2) 정자의 준비

정자의 처리는 discontinuous Percoll (Pharmacia, Uppsala) gradient 방법 (Dravaland and Mortimer, 1985)에 의해 처리 하였다. Percoll을 10배의 Ham's F10에 혼합하여 100, 90, 80, 70, 60, 50% 까지 농도별로 만들어 15ml 시험관에 미리 농도별로 층을 만들어 놓고 정자를 1ml정도 위층에 넣어서 300G 속도로 20분간 원심분리를 시행하였다. 이렇게 처리한 후 100% percoll층에 있는 정자를 56°C에서 30분간 비동화 시킨 환자의 혈청을 10% 섞은 Ham's F10 (Flow Lab.)으로 300G에서 10분간 2번 씻은 후 pellet만을 선택하여 3시간이상 37°C에서 배양하여 활동성이 있는 정자만을 선택하여 이용하였다 (그림 1).

3) 미세 조작술 (micromanipulation technique)

난자와 정자를 조작하기위해 사용되는 미세 조작술은 미세 조작기 (micromanipulator, MO-102N, Narishige, Japan)가 부착된 도립현미경 (inverted microscope, TMD, Nikon, Japan)하에서 시행하였으며 수정에 도움이 되도록 난자의 투명대에 부분적인 절제를 하거나, 직접 정자를 난자와 접하게 해줌으로써 수정이 쉽게 일어나도록 유도하였다. 사용되는 미세관 (micropipet, Drummond Microcaps, 50 μ l, Drummond Sci. Co., USA)은 난자를 잡기위해 사용되는 holding pipet (70~100 μ m)과 정자를 넣기위해

사용되는 injection pipet (5~10 μ m)을 사용하였다 (그림 2, 3) (Kishimoto, 1986).

배양중인 난자는 oil drop 방법 (Brinster, 1963)에서 의해 petridish내에 PBS방울을 만들고 paraffin oil (Sigma)로서 완전히 덮은 다음 여기에 난자를 넣고 250배 현미경 시야 아래에서 미세조작기를 이용하여 시행하였다.

3)-1. 부분적 투명대 절제 (PZD, partial zona dissection)

난자의 투명대를 Cutting pipet을 이용하여 부분 절제하는 기술로서 수정되지 않은 난자가 투명대를 쉽게 들어가게 하기위한 기술이다.

3)-2. 미세 정자 수정법 (MIST, micro-insemination by sperm transfer)

정자를 난자의 위란강 (perivitelline space)에 1~10개 정도 주입시키는 기술로서 정자를 수정 (fertilization)이 쉽게 일어나도록 정자를 직접 난자의 세포질 가까이 접근시켜 접합 (fusion)시키려는 기술이다.

3. 체외수정, 배양 그리고 자궁내 이식 (in vitro fertilization, culture and embryo transfer)

PZD를 시행한 난자 (제1군)는 배양접시 (organ culture dish, Falcon)로 옮긴다음 수정 (fertilization)을 시키기 위해 배양기 (incubator, Queue 2700)에서 배양하였다. 정자의 숫자는 50,000~100,000개 정도 수정 (insemination)하였다.

옮긴다음 배양기에서 배양하였다. 배양조건은 37°C, 공기중 CO₂ 5% 그리고 습도를 충분히 하였다.

수정 (fertilization)의 확인은 16~20시간이 지난다음 전핵을 확인함으로써 알 수 있었다. 배아의 자궁내 이식은 미세조작을 시행한 후 48시간이 지난 다음 실시하였고, 임신여부는 배아이식후 14일째 혈중 β -hCG를 측정하여 10mIU/ml 이상이면 임신으로 규정하였다.

통계적 유의성 검정은 Chi-square test에 의해서 분석하였고, $p < 0.05$ 일때 유의하다고 판정하였다

결 과

제1군에서 정상적 체외수정을 시행한 군의 수정률은 16개의 난자중 2개가 수정되어 12.5%를 보였으며, PZD를 시행한 군에서는 19개

Table 1. Outcome of patial zona dissection(PZD) of human oocytes

Cases	Proportion of oocytes fertilized		Further development	
	Control*	PZD	Control*	PZD
1	0/ 1	2/ 2	—	zygote
2	0/ 1	0/ 1	—	2-cell
3	0/ 5	1/ 6(1)	—	2-cell
4	2/ 5	4/ 4(2)*	4-cell 4-cell	4-cell 4-cell
5	0/ 2	0/ 3(1)	—	—
6	0/ 2	1/ 3(1)	—	4-cell
Total	2/16	9/19**		

():No. of damaged oocyte, ():polyspermy, *standard IVF, **p<0.05

Table 2. Outcome of Single-and Multiple-Micro-Insemination by SpermTransfer (MIST) into human oocytes

	Patients	Oocytes	Fertilized oocytes	Unfertilized oocytes	Damage oocytes	Pregnancy
Single-MIST	6	7	2	3	2	0
Multiple-MIST*	10	20	4 (1)	10	6	1

*3 to 7 sperms were transfered into perivitelline space

():polyspermy

의 난자중 8개가 수정되었으며, 42.2%를 나타내어 두군간에 수정률에서 유의한 차이를 보였다(p<0.05). PZD를 시행한 군에서 수정된 난자중에서는 polyspermy 현상이 25% (2/8) 나타나 정상적 체외수정에 비해 높게 나타남을 알 수 있었다(표1).

제2군에서 1개의 정자를 미세수정시킨 군에서의 수정률은 7개의 난자중 2개가 수정이 일어나 28.6%로 나타났으며, 2개의 난자는 완전히 상해를 입어 퇴화되었다. 3~7개의 정자를 미세수정시킨 군에서의 수정률은 20개의 난자중 4개가 수정이 일어나 20.0%로 나타났으며, 이중 6개의 난자가 완전히 상해를 입었다(표2).

두 군에서 수정된 난자는 정상 발생을 하여 자궁내 이식을 시행하였는데, 1군에서는 4명의 환자에서 이식하여 임신이 되지 않았으며, 2군에서는 4명의 환자에서 이식하여 이중 한명이 임신에 성공하였다. 그러나, 초음파 소견상 9주까지 태아 심장 박동(fetal heart beat)이 보이지 않아 인공유산을 시켰으며, abortus는 핵형 관찰을 위해 염색체 검사를 시행하였는데 분석 결과 염색체 이상(47 XY,+20)으로 판명되었다.

고 찰

정상적 체외수정기술에 의한 수정률은 60~80% 정도이며, 임신률은 10~25%까지 나타나고 있다. 그러나 남성불임 요인을 갖고있는 환자에서는 체외수정기술에서 수정률이 8%를 넘지 못한다고 보고하고 있다(de Kretser et al., 1985).

본 연구에서는 수정률을 높이기 위하여 난자의 투명대를 부분절제 하였는데 여러 보고자들(Malter et al., 1989;Cohen et al., 1989)과 같이 수정률이 유의하게 향상되는 것을 보았다. 그러나 polyspermy 현상이 정상적 체외수정기술 시 나타나는 것보다 훨씬 높은 33.3%로 나타나서 다른 보고자들과 일치하는 결과를 보였다(Malter et al., 1989). 이러한 결과는 투명대가 수정을 방해하는 요소로서 작용하여 결국 이러한 장벽을 제거시킴으로써 수정률이 높게 나타났으며, polyspermy 현상은 난자의 성숙에서 세포질성숙이 완전히 이루어지지 않은 상태에서 많은 정자가 난자의 투명대를 통과하여 들어와 수정막(fertilization membrane)을 제대로 형성하기 이전에 여러개의 정자가 난자와 접합(fusion)함으로써 일어나는 현상이라고 사료

된다.

난자에 상해(damage)를 입혀 퇴화되는 률은 대체로 20% 정도로 보고하고 있는데, 본 연구에서는 PZD군에서 15%가 되어 다른 보고자들과 비슷한 결과를 얻었고, MIST군에서는 30%로 높은 상해률을 보였다. 이러한 상해률을 낮추기 위한 노력으로는, sucrose를 사용하여 난자의 위란강을 넓혀 줌으로서 미세조작에 의한 기계적인 상해를 줄일수 있고 쉽게 시행할수 있다고 보고하고 있다(Lacham et al., 1989; Malter et al., 1989; Sathananthan et al., 1989).

수정률이 낮은 이유 중의 하나는 정자의 처리과정을 들고있다. 즉, 정자의 수정능력의 부여(capacitation)와 acrosome reaction이 많이 일어날수 있도록 유도하여야 한다(Sathananthan and Chen, 1986; Yamada et al., 1988). PZD를 시행하는 환자는 정상적인 수정(insemination)에 의해 체외수정 과정을 진행해도 되지만 (Cohen et al., 1989), MIST를 시행하는 환자에게는 이러한 정자의 기능적인 문제를 해결해 주어야 한다 (Sathananthan et al., 1989). 1개 또는 여러개의 정자가 위란강에 수정(insemination) 되었다고 하여도 이러한 정자가 수정을 일으킬수 있는 기능을 가지고 있지 않다면 수정(fertilization)은 일어나지 않게 되는 것이다. 따라서, 정자에게 수정을 일으킬수 있는 기능적인 문제를 해결하기 위해서 정자를 Percoll에 처리하는 방법(Lacham et al., 1989), Ficoll 방법 (Ng et al., 1988), polyvinyl pyrrolidone (PVP, MW=9000)를 이용하는 방법(Lanzendorf et al., 1988) 그리고 SrCl₂를 이용하여 배양하는 방법 (Laws-King et al., 1987) 등 수정률을 높이기 위해 여러가지 연구들을 행하고 있다.

이러한 미세조작술에 의해 임신된 보고가 많지 않으며, 수정후 수정란의 미세구조와 정상적인 발생능력을 정상적 수정란과의 비교관찰(Sathananthan et al., 1989)을 통해 정상 배아와 같다고 보고하였으나, 기계적조작에 의한 난자의 상해등에 의한 유전적 이상현상등 아직도 연구되어야 할 것이라 사료된다.

본 연구에 의해 임신된 1례에서 나타난 염색체이상 (47 XY, +20)은 미세조작술에 의한 기계적 손상에 의한 것이거나, 정자자체의 염색체 이상에 의한것이 아니라, 분열시 배아가 감수분열에 의한 염색체 불분리 현상(non-disjunction)에 의한 염색체 이상이 일어났다고 사료

된다(Kessler et al., 1988; Plachot et al., 1988).

본 연구에서 나타났듯이 복합적 남성불임 요인을 가지고 있는 환자의 치료법이 개발되지 않는 상태에서 미세조작술은 정상적 체외수정시술과 함께 유일한 치료법으로 이용될수 있다. 미세조작술에 의해 처리된 난자에서 수정률도 향상되는 것을 확인 했으며, 또한 임신도 가능하다는것을 입증하였으므로 앞으로 남성불임에 의한 치료법으로 널리 이용되리라고 사료된다.

결 론

남성불임 요인을 가지고 있는 환자들은 정상적 체외수정시술에서 수정률이 현저히 떨어진 다. 본 연구는 이러한 환자에게서 체외수정시술시 수정률을 향상시키기 위하여 PZD (Partial Zona Dissection)와 MIST (Micro-Insemination by Sperm Transfer)를 시행하였다. 결과는 아래와 같다.

1. 정상적 체외수정을 시킨 군과 PZD를 시행한 군에서 수정률이 각각 12.5% (n=16), 42.4% (n=19)로 유의하게 차이가 있었다 (p<0.05).

2. MIST를 시행한 군에서는 수정률이 30% (n=27)를 나타내었다.

3. PZD를 시행한 군과 MIST를 시행한 군간의 난자의 상해률은 각각 15.7% (3/19) 29.6% (8/27)로 나타났다.

4. MIST를 시행한 군에서 자궁내 이식하여 1례에서 임신에 성공하였다.

결론적으로, 미세조작술에 의한 남성불임환자의 체외수정시술은 수정률을 향상시키고 임신률을 높일수 있을 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

Bernadus RE, Johes GS, Acosta AA, Garcia JE, Lin HC, Jonee, DI, Rosenvaks K: The significance of the ratio of follicle stimulation hormone and luteinizing hormone in induction of multiple follicular growth. *Fertil Steril* 1985, 43, 373.

Brinster RL: A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp Cell Res* 1963, 32, 205.

Cohen J, Malter H, Wright G, Kort H, Massey

- J, Mitchell D: Partial zona dissection of human oocytes when failure of zona pellucida penetration is anticipated. *Hum Reprod* 1989, 4, 435.
- De Kretser DM, Yates CA, McDonald J, Leeton JF, Southwick G, Temple-Smith PD, Trounson AO, Wood EC: The use of in vitro fertilization in the management of male infertility. In *Gamete Quality and Fertility Regulation*, Edited by R. Rolland, M.J. Heineemann, S.G. Hillier, H. Vemer. *Amsterdam Excerpta Medica* 1986, p213.
- Dravland JE, Mortimer D: A simple discontinuous percoll gradient procedure for washing human spermatozoa. *IRCS Med Sci* 1985, 13, 16.
- Foulot H, Rambaud D, Ranoux C, Aubriot F, Dubuisson J, Poirot C: In vitro fertilization without ovarian stimulation: a simplified protocol applied in 80 cycles. *Fertil Steril* 1989, 52, 617.
- Garcia JE, Jones GS, Acosta AA, Wright G, Jr: Human menopausal gonadotropin human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: Phase II, 1981. *Fertil Steril* 1983, 39, 174.
- Jones HW. Jr, Acosta AA, Andrews MC, Garcia JE, Jones GS, Mayer J, Mayer J, McDowell JS, Rosenwaks A, Sandow BA, Veeck LL, Wilkes CA: Three years of in vitro fertilization at Norfolk *Fertil Steril* 1984, 42, 826.
- Kessler HH, Winter R, Dohr G, Urdl W, Puch HH: The importance of an early diagnosis of fertilization disorders. *Hum Reprod* 1988, 3, 767.
- Kim MK, Lee HJ, Lee SJ, Jun JY: Effects of warming rate degenerated blastomere(s) on development of frozen and thawed mouse embryos. *Kor J Fertil Steril* 1987, 14, 51.
- Kishimoto T: Microinjection and cytoplasmic transfer in starfish oocytes. *Methods Cell Biol* 1986, 27, 1986.
- Lacham O, Trounson A, Hoden C, Mann J, Sathananthan H: Fertilization and Development of mouse eggs injected under the zona pellucida with single spermatozoa treated to induce the acrosome reaction. *Gamete Res* 1989, 23, 233.
- Lanzendorf SE, Slusser J, Maloney MK, Hodgen GD, Veeck LL, Rosenwaks Z: A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril* 1988, 49, 835.
- Lassalle B, Courtot AM, Testart J: In vitro fertilization of hamster and human oocytes by microinjection of human sperm. *Gamete Res* 1987, 16, 69.
- Laws-King A, Trounson A, Sathananthan H, Kola, I: Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoon under the zona pellucida *Fertil Steril* 1987, 48, 637.
- Malter H, Talansky B, Cordon J, Cohen J: Monospermy and polyspermy after partial zona dissection of reinseminated human oocytes. *Gamete Res* 1989, 23, 377.
- Malter H, Cohen J: Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 1989, 51, 139.
- Malter H, Cohen J: Blastocyst formation and hatching in vitro following zona drilling of mouse and human embryos. *Gamete Res* 1989, 24, 67.
- Ng S, Bongso A, Ratnam S, Sathananthan H, Chan C, Wong PC, Hagglund L, Anandakumar C, Yong, YC, Goh V: Pregnancy after transfer of sperm under zona. *Lancet Oct 1*, 1988.
- Paulson R, Sauer MV, Lobo RA: In vitro fertilization in unstimulated cycles: A new application. *Fertil Steril* 1989, 51, 1059.
- Plachot M, Veiga A, Montagut J, De Grouchy J, Calderon G, Lepretre S, Junca A, Santalo J, Carles E, Mandelbaum J, Barri P, Degoy J, Cohen J, Egozeue J, Sabatier JC, Salat-Baroux J: Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorder in early life: a multicentric study. *Hum Reprod* 1988, 3, 627.
- Sathananthan AH, Chen C: Sperm-oocyte membrane fusion in the human during mono-

- spermic fertilization. *Gamete Res* 1986, 15, 177.
- Sathananthan A, Ng SC, Trounson A, Bongso A, Laws-king A, Ratnam SS : Human microinsemination by injection of single or multiple sperm:ultrastructure. *Hum Reprod* 1989, 4, 574.
- Uehara T, Yanagimach R:Activation of hamster eggs by pricking. *J Exp Zool* 1977, 199, 269.
- Yamada K, Stevenson AFG, Mettler L:Fertilization through spermatozoal microinjection : significance of acrosome reaction. *Hum Reprod* 1988, 3, 657.
-