

## 체외수정 및 배아이식술에서 세포질내 정자주입술(ICSI)의 수정률과 임신율

제일병원 체외수정연구실, 산부인과 불임클리닉<sup>1</sup>, 비뇨기과<sup>2</sup>

전진현 · 이호준 · 김정욱 · 박용석<sup>2</sup> · 이유식<sup>2</sup> · 홍재엽<sup>2</sup> · 손일표<sup>1</sup> · 전종영<sup>1</sup>

### Fertilization and Pregnancy Rate of Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)

Jin Hyun Jun, Ho Joon Lee, Jeong Wook Kim, Yong Seog Park, Yu Sik Lee,  
Jae Yup Hong, Il Pyo Son and Jong Young Jun

*Cheil General Hospital Infertility Clinic, Seoul, Korea*

#### = Abstract =

Intracytoplasmic sperm injection(ICSI) was known as effective method in treatments of couples who unable to be helped by conventional in vitro fertilization. In 78 treatment cycles of 78 infertile couples using ICSI performed at our infertility clinic between May and August 1994 were analyzed. These patients were classified two groups, andrological factor(AF) and non-andrological factor(non-AF) group. The AF group, which had abnormal sperm physiology, included oligozoospermia, asthenozoospermia, oligoasthenoteratozoospermia(OATS) and microsurgical epididymal sperm aspiration(MESA) patients. The non-AF group, which had abnormal oocyte physiology, included abnormal zona pellucida, poor quality of oocyte and immune factor infertile patients. A single spermatozoon was injected into the ooplasm of 776 metaphase II oocytes. The fertilization rate was 44.6%(346/776) and 319 embryos were transferred. After 73 embryo transfers(93.6% of treatment cycles) 23 pregnancies were established, i. e. pregnancy rate of 29.4% per started cycle and 31.5% per embryo transfer. Fertilization rate of AF and non-AF group was 46.2% and 35.8%, pregnancy rate was 34.5%(20/58) and 20.0%(3/15), respectively. In order to increase the pregnancy rate, assisted hatching(AHA) has done after ICSI in 47 treatment cycles. Pregnancy rate of ICSI with AHA and without AHA group was 34.0%(16/47) and 26.9%(7/26), respectively. ICSI was more effective in andrological factor infertility and the pregnancy rate was increased by ICSI with AHA procedure.

#### 서 론

일반적인 체외수정 방법으로 수정(fertilization)이 어려운 환자에서 미세조작기(micromanipulator)를 이용한 보조생식술(assisted reproductive technique)은 1980년대 중반부터 IVF-ET program에 연구 시행되어 왔다. 일반적인 체외수정 방법으로 수정에 실패하였을 때의 원인은 크게 두 가지로 나눌 수 있는데 첫째는, 정자의 상태에 이상이 있는 남성요인(andrological factor, AF)과 둘째는, 난자 상태의 이

상 또는 면역학적인 원인이 있는 비남성 요인(non-andrological factor, non-AF)으로 구분할 수 있다. 남성요인은 희소정자증(oligozoospermia, OLIGO), 무력정자증(asthenozoospermia, ASTHENO), 기형정자증(teratozoospermia, TERATO) 등으로 세분할 수 있다. 이러한 요인들에 의해 체외수정시 수정에 실패하거나 수정률이 매우 낮은 경우에는 미세조작술을 이용한 미세수정(micro-insemination)방법이 이용되어 왔다(Cohen et al., 1992a). 미세수정의 방법으로는 기계적으로 투명대의 일부를 절개해 주는 부분적 투명대 절개술(par-

tial zona dissection, PZD:Cohen et al., 1988), 정자를 위란강(perivitelline space)에 주입하는 투명대하 정자주입술(subzonal insemination, SUZI:Ng et al., 1988), 하나의 정자를 난자의 세포질내에 주입하는 세포질내 정자주입술 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI:Palermo et al., 1992) 등이 있다. 최근에 활발히 연구 시행되고 있는 ICSI는 기존의 PZD나 SUZI에 비해 높은 수정률과 임신율을 보고(Palermo et al., 1993)하고 있으며, 수술로서 교정이 불가능한 폐쇄성 무정자증(obstructive azoospermia)이나 선천성 정관형성 부전(vas agenesis)과 같은 환자에서 미세수술적 부고환 정자흡입술(microsurgical epididymal sperm aspiration, MESA)과 ICSI를 병행하여 좋은 결과를 얻고 있다(Tournaye et al., 1994). 또한, 미세조작술을 이용한 보조부화술(assisted hatching, AHA)은 4-8세포기에 배아를 둘러싸고 있는 투명대(zona pellucida)의 일부분을 acidified Tyrode's solution으로 녹여주어 배아의 부화를 도와주는 것으로 임신율을 증가시키기 위한 방법으로 이용되고 있다(Cohen et al., 1992b). 이에 본 연구에서는 ICSI를 이용한 IVF-ET program에서 환자의 불임요인에 따른 수정률과 임신율을 분석하고, AHA를 시행했을 경우 임신율의 증진에 대해 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구대상

본 연구는 1994년 5월부터 8월까지 제일병원 불임클리닉에서 ICSI를 시행한 78명, 78주기를 대상으로 하였다. 대상환자는 정자의 상태에 이상이 있는 남성요인군(AF group, 61례)과 난자 상태의 이상 또는 면역학적 원인이 있는 비남성요인군(non-AF group, 17례)으로 구분하였다. 남성요인군(AF group)은 정자수가  $10 \times 10^6$ /ml이하인 최소정자군(OLIGO), 운동성(motility) 정자가 20% 이하인 무력정자군(ASTHENO), 전체 운동 정자수(total motile sperm)가  $0.5 \times 10^6$  이하인 최소무력기형정자군(oligoasthenoteratozoospermia, OATS), 부고환 정자흡입술(MESA)을 이용해서 채취한 정자군 등으로 세분하였다.

### 2. 정자 준비

환자로부터 채취한 정액을 30분 정도 액화

시킨 후 CASA(computer assisted sperm analyser)를 이용하여 정자의 수, 운동성 등을 판정하였다. 정자의 상태에 따라 swim-up 방법과 mini-percoll(50-70-100%)방법을 병행하여 운동성 정자(motile sperm)를 회수하였으며, 3mM pentoxifylline과 3mM 2-deoxyadenosine을 30분간 처리하고, 50% follicular fluid를 3-5시간 처리한 정자를 ICSI에 사용하였다.

### 3. 난자 준비

과배란 유도는 FSH-hMG 또는 FSH/hMG와 GnRH agonist를 병용하였으며, hCG주사 후 34시간에 질식초음파를 이용하여 난자를 채취하였다. 난자-난구세포 복합체(oocyte-cumulus complex)의 성숙도를 판정하고, 3-5시간 후에 0.1% hyaluronidase를 처리하여 난구세포를 분리하였다. ICSI를 시행하기 직전에 난자의 성숙정도를 현미경하에서 판정하여 제1극체가 방출된 제2감수분열 중기(meta-phase II)의 난자만을 ICSI에 사용하였다.

### 4. ICSI 과정

미세조작은 도립현미경(Diaphot TMD, Nikon, Japan)에 장착된 1쌍의 미세조작기(NT-88, Narishige, Japan)를 사용하였다. ICSI에 사용한 holding pipette은 외경 100-200 $\mu$ m, 내경 15-20 $\mu$ m, injection pipette은 외경 6-8 $\mu$ m, 내경 4-5 $\mu$ m인 것을 사용하였다. Injection pipette은 ICSI시에 투명대, 난자 세포막 등을 관통하기 용이하도록 pipette 끝에 spike를 만들어 사용하였다. 준비된 정자를 10% polyvinylpyrrolidone(PVP) 용액에 넣어 운동성을 감소시키고, injection pipette으로 운동 정자(motile sperm)의 체부(midpiece)에 물리적 힘을 가하여 비운동화(immobilization)시킨 후 난자에 주입하였다. 준비된 난자는 0.4% BSA HEPES-buffered T6 medium drop내에서 holding pipette으로 제1극체가 12시 또는 6시 방향에 위치하도록 고정하였으며, 준비된 정자를 3시 방향으로 주입하였다. 정자 주입시 여분의 배양액이 난자 세포질내에 들어가지 않도록 주의하였으며, 수정 여부는 ICSI 시행 후 16-20시간에 확인하였다.

### 5. AHA 과정

AHA에 사용한 hatching pipette은 외경 10-12 $\mu$ m, 내경 7-9 $\mu$ m인 것을 사용하였으며,

pH 2.3인 acidified Tyrode's solution을 이용하여 투명대의 일정부위를 녹여주었다. AHA은 난자채취 후 72시간 동안 배양하여 정상적으로 발생된 4-8세포기 배아에서 시행하였으며, AHA 시행 3-5시간 후에 배아이식을 실시하였다.

## 6. 배아이식 및 임신 확인

AHA를 시행하지 않은 경우는 난자채취 후 48-50시간에, AHA을 시행한 경우는 75-77시간에 배아이식을 실시하였다. 임신여부는 이식 12-14일 후 혈청내  $\beta$ -hCG양으로 판정하였고, 태아의 심박동(fetal heart beat)이 확인된 경우를 clinical pregnancy로 정의하였다.

**Table 1.** Fertilization rate of intracytoplasmic sperm injection(ICSI)

	Number	%/Injected oocytes
Injected oocytes	776	
Fertilized oocytes(2-PN)	346	44.6
Transferred embryos	319	41.1
Cryopreserved embryos	14	1.8
Abnormal pronucleus	8	1.0

**Table 2.** Pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection(ICSI)

	No. of cycles	%
ICSI	78	
Unfertilization	5	6.4 <sup>a</sup>
Embryo transfer	73	93.6 <sup>a</sup>
Pregnancy	23	31.5 <sup>b</sup>
Clinical pregnancy	20	27.4 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Per ICSI cycle, <sup>b</sup>Per embryo transfer cycle.

**Table 3.** Outcome of intracytoplasmic sperm injection(ICSI) in andrological factor(AF) and non-andrological factor(non-AF) group

	AF group		non-AF group	
	Number	%	Number	%
ICSI cycles	61		17	
Injected oocytesf	656		120	
Fertilized oocytes	303	46.2 <sup>a</sup>	43	35.8 <sup>**</sup>
Embryo transfer	58	95.1 <sup>b</sup>	15	88.2 <sup>b</sup>
Pregnancy	20	34.5 <sup>c</sup>	3	20.0 <sup>c</sup>
Clinical pregnancy	17	27.3 <sup>c</sup>	3	20.0 <sup>c</sup>

a;Per injected oocyte, b;Per ICSI cycle, c;Per embryo transfer cycle, Significance: <sup>\*</sup>p<0.05.

## 7. 분석 및 통계 방법

결과에 대한 통계적 분석은  $\chi^2$ -test를 이용하였고, p값이 0.05 이하인 경우를 통계적 유의성이 있다고 판정하였다.

## 결 과

대상환자의 평균나이는  $31.2 \pm 3.3$ 세였으며, 78주기에서 채취한 1040개의 난자 중, 776개의 성숙난자에서 ICSI를 시행하였다. ICSI를 시행한 난자 중에서 346개(44.6%)가 수정되었고, 319개(41.4%)의 배아를 이식하였다. 배아이식 후 여분의 14개 배아는 동결보존하였다. 또한, 수정란 중에는 하나의 전핵 또는 3개 이상의 전핵을 갖는 비정상적인 수정란도 8개 관찰되었다(표 1).

ICSI를 시행한 78주기 중에서 5주기(6.4%)에서 수정에 실패하였고, 73주기(93.6%)에서 배아이식을 수행하였다. 배아이식 후  $\beta$ -hCG 검사 결과 23주기(31.5%)에서 임신에 성공하였으며, 20주기(27.4%)에서 clinical pregnancy를 얻을 수 있었다(표 2).

남성요인군(AF group)과 비남성요인군(non-AF group)에서의 ICSI 결과를 비교해 보면, 수정률은 AF group이 46.2%, non-AF group이 35.8%로 통계적으로 유의한 차이(p<0.05)를 나타냈으며, 임신율은 AF group이 34.5%, non-AF group이 20.0%로 AF group이 다소 높은 경향을 나타내었다(표 3).

AF group을 세분하여 ICSI 결과를 비교해 보면 OLIGO군, ASTHENO군, OATS군, MESA군에서 각 군간의 수정률 및 임신율은 유의한 차이를 보이지 않았으며, MESA군에서 가장 높은 44.4%의 임신율을 나타내었다(표 4).

**Table 4.** Outcome of intracytoplasmic sperm injection(ICSI) in andrological factor(AF) group

	OLIGO		ASTHENO		OATS		MESA	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
ICSI cycles	18		11		15		18	
Injected oocytes	187		110		180		179	
Fertilized oocytes	79	42.2 <sup>a</sup>	53	48.1 <sup>a</sup>	90	50.0 <sup>a</sup>	80	48.5 <sup>a</sup>
Embryo transfer	9	94.4 <sup>b</sup>	9	81.8 <sup>b</sup>	15	100.0 <sup>b</sup>	18	100.0 <sup>b</sup>
Pregnancy	4	23.5 <sup>c</sup>	3	33.3 <sup>c</sup>	5	33.3 <sup>c</sup>	8	44.4 <sup>c</sup>
Clinical	4	23.5 <sup>c</sup>	3	33.3 <sup>c</sup>	4	26.6 <sup>c</sup>	6	33.3 <sup>c</sup>

a;Per injected oocyte. b;Per ICSI cycle. c;Per embryo transfer cycle.

**Table 5.** Outcome of intracytoplasmic sperm injection(ICSI) with and without assisted hatching (AHA) group

	ICSI with AHA		ICSI without AHA	
	Number	%/transfer	Number	%/transfer
Embryo transfer	47		26	
Pregnancy	16	34.0	7	26.9
Clinical pregnancy	15	31.9	5	19.2

ICSI 시행 후 AHA을 수행했을 경우의 임신율이 34.0%로 AHA을 수행하지 않았을 경우의 26.9%에 비해 높게 나타났으며, clinical pregnancy도 AHA을 수행했을 경우(31.9%)가 AHA을 수행하지 않았을 경우(19.2%)보다 높게 나타났다(표 5).

## 고 찰

미세조작기를 이용한 세포질내 정자주입술(ICSI)은 남성요인(AF) 및 비남성요인(non-AF)의 환자 모두에서 상당히 높은 수정률과 임신율을 나타내는 효과적인 방법이었다. 본 연구에서도 다른 연구자들이 보고한 바(Van Steirteghem et al., 1993a; Fishel et al., 1994)와 마찬가지로 ICSI는 PZD, SUZI 등에 비해 높은 수정률과 임신율을 얻을 수 있는 방법임을 알 수 있었으며, ICSI의 단점으로 지적되었던(Redgment et al., 1994) 난자의 상해는 숙련되고 세심한 주위를 기한다면 10% 이내로 유지할 수 있어 이러한 것은 문제점이 되지 않는 것으로 생각된다. 또한, ICSI 후에 1개의 전핵 또는 3개 이상의 전핵을 갖는 비정상적인 수정란도 관찰되었는데, 이것은 난자의 성숙 또는 정자의 genome상에 문제가 있어 이러한 현상이 나타난 것으로 사료된다. 그리고 남성요인군(AF group)이 비남성요인군(non-

AF group)에 비해 높은 수정률과 임신율을 나타내었는데, 이것은 ICSI가 남성요인의 불임환자에서 더욱 효율적으로 이용될 수 있음을 시사하여 준다(Van Steirteghem et al., 1993a). 비남성요인군(non-AF group)에는 난자의 상태에 이상이 있는 환자를 포함하고 있으므로, 수정률 및 임신율에서 차이를 나타낸 것으로 생각되며, 난자의 질(quality)이 ICSI의 결과에 영향을 나타낼 수 있는 것으로 사료된다. 남성요인군(AF group)을 더욱 세분한 OLIGO, ASTHENO, OATS, MESA 각 군의 수정률 및 임신율에서 비슷한 결과를 나타냈는데, 이것은 ICSI가 전반적인 남성불임에 효과적인 치료법임을 보여준다. 최근에는 MESA 방법으로 채취한 정자 뿐만 아니라 MESA 후 동결보존했던 정자 또는 인공 정자낭(artificial spermatocele)에서 채취한 정자를 이용한 ICSI도 수행하고 있으며 좋은 결과를 얻고 있다. ICSI 후 AHA을 수행하였을 때 보다 높은 임신율을 보였는데, 이것은 ICSI 과정이 난자의 세포막이나 투명대에 비정상적인 변화를 유발하여 투명대 경화현상을 일으킬 수도 있음을 간접적으로 보여주는 것으로 사료된다.

결론적으로 ICSI는 기존의 PZD나 SUZI에 비해 높은 수정률과 임신율을 얻을 수 있는 방법이며, 특히 남성요인(AF)의 불임환자에

서 임신 성공률이 높은 효과적인 방법으로 생각된다. AHA는 배아의 착상과정에 도움을 주는 방법으로 ICSI와 병행하여 시행하면 임신율을 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다. 그리고 이러한 ICSI 과정은 매우 미세하고 섬세한 조작이 필요하므로 기술자의 숙련도, 적절한 미세조작기구 등이 결과에 영향을 미칠 수 있다.

## 결 론

미세조작기를 이용한 미세수정방법 중에서 최근에 개발된 세포질내 정자주입술(ICSI)은 정자의 상태가 비정상적인 남성요인과 원인불명으로 수정에 실패한 경험이 있는 비남성요인 환자의 체외수정 및 배아이식술에서 좋은 결과를 얻을 수 있는 효과적인 방법으로 알려져 있다. 본 연구는 1994년 5월부터 1994년 8월까지 제일병원 불임클리닉에 내원한 환자 중에서 ICSI를 시행한 78명, 78주기를 대상으로 하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. ICSI를 시행한 776개의 난자중에서 346개(44.6%)가 수정되었고, 319개(41.1%)의 배아를 이식하였다.

2. ICSI를 시행한 78주기 중에서, 73주기(93.6%)에서 배아이식을 수행하였으며, 5주기(6.4%)에서 수정에 실패하였고, 23주기(31.5%)에서 임신에 성공하였다.

3. 남성요인으로 인해 ICSI를 시행한 경우 수정률은 46.2%, 임신율은 34.5%(20/58)였으며, 비남성요인에서 수정률은 35.8%, 임신율은 20.0%(3/15)로 나타났다.

4. ICSI 후 보조부화술(AHA)을 시행한 경우의 임신율은 34.0%(16/47)였으며, 보조부화술을 시행하지 않았을 경우의 임신율은 26.9%(7/26)로 나타났다.

이상의 결과에서 ICSI는 남성요인의 불임치료에 보다 효과적인 방법임을 알 수 있으며, 부가적으로 보조부화술을 시행함으로써 임신율을 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다.

## 인 용 문 헌

- Cohen J, Malter H, Fehilly C, Wright G, Elsner C, Kort H, Massey J, Mayer M: Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. *Lancet* 1988, 2, 162.
- Cohen J: A review of clinical microsurgical fertilization. In: Cohen J, Malter H, Talansky B, Glifo J, eds. *Micromanipulation of human gametes and embryos*. New York: Raven Press, 1992a, 7, 163-190.
- Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z: Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of embryos with poor prognosis. *Human Reprod* 1992b, 7, 685-691.
- Fishel S, Timson J, Lisi F, Jacobson M, Rinnaldi L, Gobetz L: Microassisted fertilization in patients who have failed subzonal insemination. *Human Reprod* 1994, 9, 501-505.
- Ng S, Bonso A, Ratnam S, Sathanathan H, Chans L, Wong P, Hagglund L, Anandakumar C, Wong V, Goh V: Pregnancy after transfer of multiple sperm under the zona. *Lancet* 1988, 11, 790.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A: Pregnancy after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992, 340, 17-18.
- Palermo G, Camus M, Joris H, Devroey P, Derde M, Van Steirteghem A: Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1993, 59, 826-835.
- Redgment C, Yang D, Tsigotis M, Yazdani N, Al Shawaf T, Craft I: Experience with assisted fertilization in severe male factor infertility and unexplained failed fertilization in vitro. *Human Reprod* 1994, 9, 680-683.
- Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, Van Steirteghem A: Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deference. *Fertil Steril* 1994, 61, 1045-1051.
- Van Steirteghem A, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde M,

Van Assche E, Devroey P: Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Human Reprod* 1993a, 8, 1055-1060.

Van Steirteghem A, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smith J, Wistano A, Devroey P: Higher fertilization and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod* 1993b, 8, 1061-1066.

---