

염색체 이상에 의한 반복 유산 환자에서 체외수정기술 및 착상전 유전진단을 통한 임신 성공 1례

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 산부인과학교실

정진석 · 연구선 · 채희동 · 전용필 · 김정훈 · 강병문 · 장윤석 · 목정은

A Case of Successful Pregnancy in Patient with Recurrent Spontaneous Abortion by Preimplantation Genetic Diagnosis Following IVF-ET

Jin-Seok Jeong, Gyu-Sun Yeon, Hee-Dong Chae, Yong-Pil Cheon, Chung-Hoon Kim,
Byung-Moon Kang, Yoon-Seok Chang and Jung-Eun Mok

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, University of Ulsan,
Asan Medical Center, Seoul, Korea

= Abstract =

It was reported that the etiologies of recurrent spontaneous abortion are immunologic factors, endocrinologic problems, anatomical abnormalities, genetic abnormalities, infection, and unexplained factors. Among those etiologic factors, genetic abnormalities occur in about 5% of the couples who experience recurrent spontaneous abortions, and most common parental chromosomal abnormality contributing to recurrent abortion is balanced translocation.

The advent of in vitro fertilization (IVF), the development of skills associated with the handling of human embryo, and an explosion of knowledge in molecular biology have opened the possibility of early diagnosis of genetic disease in preimplantation embryos. Therefore preimplantation genetic diagnosis (PGD) is indicated for couples, infertile or not, at risk of transmitting a genetic disease.

A case of successful pregnancy and term delivery by PGD using fluorescence in situ hybridization (FISH) technique in patient with recurrent spontaneous abortion due to balanced translocation is presented with brief review of literatures.

Key Words: Recurrent spontaneous abortion, Balanced translocation, Preimplantation genetic diagnosis (PGD), Fluorescence in situ hybridization (FISH)

서 론

반복 유산은 임신 중 중요한 합병증 중의 하나로 일반적으로 임신 20주 이전에 자연 유산된 경우가 총 3회 이상 또는 연속하여 2회 이상 반복되는 경우를 지칭하며, 그 빈도는 0.4~1% 정도로 나타나고 있다 (Wilcox *et al.*, 1988). 이러한 반복 유산의 원인으로는 저자들마다 다양하게 보고하

고 있으나, 면역학적 (immunologic) 이상이 50%, 내분비계 (endocrinologic) 이상이 17%, 해부학적 (anatomical) 이상이 12%, 유전적 (genetic) 이상이 5%, 감염 (infection)이 5%, 그리고 원인불명 (unexplained)이 10% 등으로 알려져 있다 (Hill, 1996). 이 중에서 유전적 이상은 부모에게 염색체 이상이 있는 경우와 유산된 태아만이 무작위적으로 염색체 이상을 가지고 있는 경우로 나눌 수 있는데, 전자의 경우, 균형전좌 (balanced translocation)가 가장

흔히 발견되는 것으로 보고되고 있다 (Plouffe *et al.*, 1992; Tulppala *et al.*, 1993).

최근 보조생식술 (assisted reproductive technology, ART)의 미세조작술 (micromanipulation)과 분자생물학 영역의 획기적인 발달로 유전적 결함이 있는 배아를 착상 전에 가려내는 착상전 유전진단 (preimplantation genetic diagnosis, PGD)이 가능하게 되었다. 착상전 유전진단을 위한 기법으로는 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)과 fluorescence in situ hybridization (FISH)이 사용될 수 있는데, 배아의 성 (sex)을 결정하기 위해서는 PCR과 FISH 두 방법이 모두 이용될 수 있고 단일 유전자결핍 (single gene defect)의 진단을 위해서는 PCR이 적절하다. FISH의 경우는 특정 염색체 및 염색체 특정 부위를 직접 관찰할 수 있으므로 배아에서의 염색체의 수적 이상을 진단하는 데에 유용하다 (Kearns and Pearson, 1994). 따라서 부모의 균형전좌에 의한 반복 유산 환자에서는 FISH를 이용한 착상전 유전진단이 유용하게 사용될 수 있다.

저자들은 균형전좌에 의한 반복 유산 여성에게 체외수정기술 (in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)과 FISH를 이용한 PGD를 시도하여 임신과 분만에 성공한 1례를 경험하였기에 문헌 고찰과 함께 보고하는 바이다.

증 례

환 자: 함 O O, 28세

주 소: 반복 유산

산과력: 0-0-3-0으로 1995년, 그리고 1996년 각각 임신 7주, 8주, 6주에 자연 유산의 병력이 있었다.

월경력: 초경은 15세에 있었으며 월경 주기는 30일로 규칙적이고 지속기간은 5일, 양은 중등도이었다.

기왕력: 특이 사항 없음

가족력: 특이 사항 없음

현병력: 환자는 1994년 결혼 후 계속되는 자연 유산으로 1996년 12월 울산대학교 의과대학 서울 중앙병원 산부인과 불임클리닉을 방문하였다. 내원 당시 시행한 일반혈액검사 및 요검사와 항원-항체 검사는 정상 소견을 보였다. 자궁난관조영검사 (hysterosalpingography)는 정상 소견으로 자궁의 기형이나 자궁내 유착 (intrauterine adhesion) 혹은

점막하 근종 (submucosal myoma) 등의 소견은 보이지 않았다. 기저 혈중호르몬 검사상 유즙분비호르몬 (prolactin) 15.1 ng/ml, 갑상선자극호르몬 (thyroid stimulating hormone, TSH) 1.0 μ U/ml, 황체화호르몬 (luteinizing hormone, LH) 14.2 mIU/ml, 난포자극호르몬 (follicle stimulating hormone, FSH) 5.7 mIU/ml, 그리고 testosterone 0.16 ng/ml으로 모두 정상 범위 내에 있었다. 면역학적 검사상 antinuclear antibody (ANA) 음성, lupus anticoagulant (LAC) 음성, anticardiolipin antibody (ACA) IgG/IgM 각각 음성, rheumatoid factor (RA) <20 U/ml, antithyroglobulin antibody <20 μ /ml, antiTSH-receptor antibody 8.4%, 그리고 antimicrosome antibody <10 U/ml로 이상 소견은 발견되지 않았다. 1996년 12월 16일 시행한 남편의 정액 검사상 정자의 수, 운동성 정자의 분포 및 정자의 형태 등은 모두 정상이었다. 12월 30일 자궁내막조직검사를 시행한 결과, 황체기 결함 (luteal phase defect)이나 자궁내막염증 등의 소견은 없었다. 1997년 1월 3일 환자와 남편의 염색체검사를 시행하였다. 남편의 핵형은 46XY로 정상이었으나 환자는 46XX, t (11:12) (q22.3;q11.21)로 균형전좌를 가지고 있는 것이 확인되어 염색체 이상에 기인한 반복 유산으로 진단하고 체외수정술 및 착상전 유전진단을 시행하기로 결정하였다.

치료 경과: 1997년 2월 17일 과배란유도를 위하여 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist (Decapeptyl, D-Trp-6-LH, Ferring, Malmo, Sweden)를 사용한 황체기 장기투여법 (luteal phase long protocol)을 시작하였다 (Neveu *et al.*, 1987; Tan *et al.*, 1992 & 1994). 외인성 성선자극호르몬으로는 human menopausal gonadotropin (hMG; Hume-gon, Organon, Holland)과 human follicle stimulating hormone (hFSH; Metrodin, Serono, Switzerland)이 사용되었고 외인성 성선자극호르몬 투여 방법은 기본적으로 단계적 용량감소법 (step-down fashion)을 채택하였다. 3월 15일 질식초음파 유도하 난자채취를 시행하여 10개의 성숙한 배란전 난자 (preovulatory phase oocyte)를 얻었다. FISH를 시행하기 위하여 각 미수정란의 극체 (polar body)를 미세조작기 (micromanipulator)로 적출한 후, 운동성이 있는 남편의 정자를 각 난자당 1×10^5 /ml의 농도로 함께 배양하여 수정시키고 18시간 후에 전핵 (pronucleus)의 유무로 수정여부를 판정하였다. 각각의 수정란에 해당되는 이들의 극체를 각

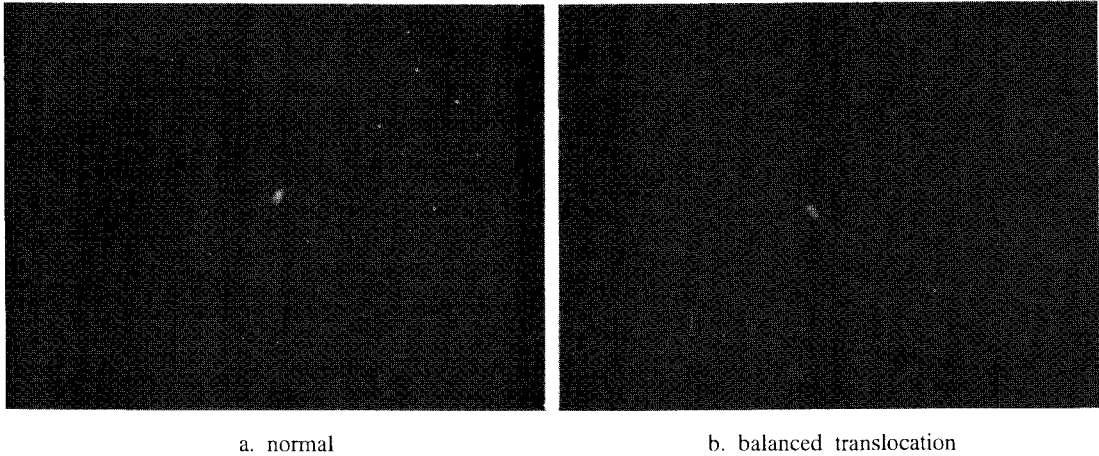


Fig. 1. Fluorochrome-labeled chromosome 11 (red) and 12 (green)-specific DNA by in situ hybridization.

각의 슬라이드에 부착시킨 후 72~74℃ 중탕냄비에서 변성 (denaturation)을 유도하고 70%, 85%, 100% 에탄올로 탈수시킨 후 건조하였다. 한편, FISH에 사용된 probe는 WCP[®] Chromosome Patient DNA FISH Probe (Vysis, Framingham, MA)로 11번과 12번 염색체의 probe를 각각 1 µl씩 7 µl hybridization buffer와 1 µl H₂O에 혼합 후 74℃에서 5분간 정치 후 사용 전까지 얼음에 꽂아 두었다. 45℃의 slide warmer 위에 검체를 놓아 온도를 평형시키고 10 µl probe mix를 loading하였고 cover slip을 덮은 후 42℃를 유지하기 위해 습상자 (humidity box)에서 12시간 이상 배양하여 결합을 유도하였다. 그 후 50% formamide, 2X SCC (pH 7.0~8.0)로 3회, 2X SCC (pH 7.0)로 10분, 그리고 2X SCC, 0.1% nondiet-P40으로 1회 세척 후, 암상자에서 건조하였다. 이 후 4,6-diamino-2-phenylidole (DAPI)로 counter staining하고 coverslip을 덮어 형광현미경 (Olympus, Japan)을 이용하여 염색체 이상 유무를 판정하였다.

수정된 10개의 배아 중 6개는 정상 염색체를 가지고 있었으나 4개에서는 비정상 염색체가 있는 것을 발견하였고 (Fig. 1) 이에 난자채취 3일 후인 3월 18일, 상기 정상 배아 4개를 배아 이식하였으며 이식 당시 배아의 등급은 4세포기 1등급이 2개, 8세포기 1등급이 2개이었다. 배아 이식 후 progesterone in oil (Progest, Samil pharm., Korea) 일일 50 mg을 근육주사함으로써 황체기 보강을 시행하였다.

3월 31일, 배아 이식 13일 후 혈중 β-hCG가 407

mIU/ml로 나타났고 4월 15일 무월경 6⁺주에 질 식초음파상 자궁강내 임신낭 (gestational sac)과 태아의 심박동이 관찰되었으며 이때 태아의 두 정둔부길이 (crown-rump length, CRL)는 3.1 mm로 임신 6주에 해당되었다. 이후 산전 진찰에서 특이 소견없이 임신이 지속되어오다 11월 11일 임신 40⁺주에 분만 진통이 발생하여 입원하였으나 진행이 되지않아 응급 제왕절개술을 시행하였고 여아 3525 gm을 분만하였으며 산모와 아이 모두 별다른 문제없이 퇴원하였다.

고 찰

반복 유산의 여러 원인들 중 가장 확실하게 밝혀진 것 중 하나가 염색체 이상에 의한 것으로, 부모의 염색체 이상에 의하여 발생하는 경우가 이중 3~8%를 차지하며 가장 많은 원인은 균형 전좌에 의한 것으로 보고되고 있다 (Plouffe *et al.*, 1992; Tulppala *et al.*, 1993). 이러한 염색체 이상은 반복 유산 뿐만 아니라 태아의 기형이나 정신 지체 (mental retardation) 등의 원인으로 작용할 수도 있기 때문에 반복 유산 환자와 그 배우자의 염색체 검사는 그 효용성에 있어 약간의 논란은 있으나 중요하리라고 사료된다. 그러나 반복 유산 환자가 임신에 성공한 경우, 음모막 생검 (chorionic villi sampling, CVS)이나 양수 천자 (amniocentesis)를 통하여 태아의 염색체 이상을 진단하는 것은 적어도 태아가 이미 유산의 위험을 어느 정도는 넘어서는 시기에 고려하게 되는 것이므로 이러한

염색체 이상에 의하여 이미 유산에 이른 경우에는 큰 도움이 되지 않는다고 하겠다.

최근 보조생식술, 특히 체외수정기술과 미세조작술의 발달은 정자를 난자 세포질로 직접 주입하는 intracytoplasmic sperm injection (ICSI)으로 과거에는 임신이 불가능하던 남성 불임의 해결에 괄목할만한 발전을 가져온 것은 물론, 수정란 또는 그 일부를 생검할 수 있게 되었고 이와 함께 분자유전학적 발달에 힘입어 유전 이상을 배아의 이식전에 알아내는 것이 가능하게 되었다. 향후 이러한 분자유전학적 발달과 유전 질환에 대한 깊은 학문적 발전이 이루어지게 된다면 많은 유전 질환의 해결 및 반복 유산의 치료에 획기적인 발전이 있으리라고 기대한다.

착상전 유전진단은 배아를 자궁 내에 이식하기 전에 유전 질환에 이환되어 있는 배아를 선별함으로써 건강한 배아를 이식하려는 것이 그 목표로 대상 환자들은 반드시 체외수정술 과정을 거쳐야 하고 유전 분석을 위하여 배아의 성장에 장애가 되지 않는 범위에서 일부의 세포를 채취하는 것이 필요하게 된다. 착상전 유전진단에서 세포를 채취하는 방법으로는 극체 생검, 난할 시기 (cleavage stage)에서의 할구 생검 (blastomere biopsy), 그리고 trophectoderm 생검 등이 있다 (Dokras *et al.*, 1990; Verlinsky *et al.*, 1990; Delhanty, 1994). 모성 유전 질환을 가진 난소로부터 임신 전 유전진단 분석으로 제1극체의 분석이 시도된 이래 (Verlinsky *et al.*, 1990), 이러한 제1극체를 이용한 진단은 제1극체가 1차 감수분열시기 (first meiotic division) 동안 성숙된 난자로부터 얻어질 수 있고 따라서 수정이나 정상 배아의 발달에는 큰 영향을 주지 않으며 오히려 이 과정을 통하여 난자의 투명대 (zona pellucida)에 보조부화술 (assisted hatching)을 시행하는 결과가 되어 착상률을 향상시킬 수 있다는 이론 (Cohen *et al.*, 1990)과 검사 시간이 충분하다는 장점이 있지만 한 개의 극체를 생검해야 하는 기술상의 어려움이 있고 단지 모성 측의 유전적 결함만을 진단할 수 있다는 단점이 있다 (Krzyminska *et al.*, 1990; Hardy *et al.*, 1990). 그러나 본 증례의 경우에서처럼 반복 유산의 원인이 모성측 염색체 이상에서 기인한 것일 경우에는 비교적 유용하고 안전하게 이용될 수 있으리라 생각된다.

이러한 착상전 유전진단의 시기로 난할 단계의 8-세포기가 가장 적절하다고 하는데 그 이유

로는 첫째, 가장 분열이 왕성하게 진행되고 있는 (high mitotic index) 시기이므로 보다 빨리 보상 (compensation)이 가능할 수 있고 (Krzyminska *et al.*, 1990), 둘째, 가장 좋은 생존율 (survival rate) 과 발달을 보이는 시기이며 (Hardy *et al.*, 1990), 셋째, 이 시기에는 잘 형성된 structural junction을 가지고 있어 배아 이식을 하는 동안 그 구조를 잘 유지할 수 있으나 (Dale *et al.*, 1991), 단점으로 단지 1~3개의 세포만을 분석에 이용할 수 있고, mosaicism은 진단되지 않을 수 있다는 것이 보고되고 있다.

이렇게 얻어진 세포 또는 그 일부를 이용하여 유전진단을 시행하는 데에는 PCR 또는 FISH가 이용될 수 있다. PCR은 유전자 단계에서의 돌연변이 (mutation)에 의한 유전 질환과 단일유전자 이상 등을 진단하는데 이용되는데 (Grifo *et al.*, 1992; Muggleton-Harris *et al.*, 1993), 민감도와 정확도를 증가시키기 위해서는 많은 세포가 필요하다 알려져 있다. 이론적으로는 PCR은 한 개의 분자로부터 유전자를 증폭할 수 있고 따라서 유전자의 염기 서열 (DNA sequence)이 알려진 특정 유전 질환을 진단하는 데에는 유용하나 특정 염기 서열의 증폭은 가변적일 수 있고 다른 비특정 증폭으로 인한 간섭의 가능성이 있을 뿐만 아니라 FISH와 같은 각 유전병에 대한 표준화된 방법이 없어 특별한 방법론이 필요한 단점이 있다.

한편, FISH는 특정 염색체 또는 염색체의 특정 부위에 대한 특이한 반복적인 유전자 탐식자 (DNA probe)를 이용함으로써 배아의 성감별 뿐만 아니라 염색체 수의 이상 (aneuploidy) 및 다배성 (polyploidy) 진단이 가능하다 (Griffin *et al.*, 1992; Munne *et al.*, 1993; Verlinsky *et al.*, 1996). 세포 분열 중기 (metaphase)와 간기 (interphase)에 모두 분석 가능하여 염색체 수의 이상을 진단하는 데에는 매우 유용한 방법으로 보고되고 있다 (Hopman and Ramaekers, 1988). 이와 함께 염색체 일부의 결손 (deletion), 전좌, 그리고 삽입 (insertion) 등의 이상도 진단이 가능하다. 그러나 현재까지는 체외수정술시 얻어낼 수 있는 세포의 수 및 그 시기에 따른 한계점이 있기 때문에 이에 대한 기술적 보완이 있어야 하리라고 생각된다.

따라서 착상전 유전진단의 방법론에 대한 연구가 보조생식술 및 분자유전학적 발전이 동반된다면, 부모의 염색체 이상이 있는 경우나 성염색체 유전질환 (X-linked disease) 등에서 체외수정술

을 시도하고 FISH를 이용함으로써 배아의 염색체 이상을 진단하고 정상 배아만을 이식하거나 이화된 성을 제외하면 태아의 선천적 염색체 이상을 근본적으로 방지할 수 있을 뿐만 아니라 유전 질환이나 반복 유산을 감소시켜 성공적인 임신에 이르게 함으로써 이러한 치료에 지대한 발전을 도모할 수 있으리라 사료된다.

결 론

본 저자들은 울산대학교 의과대학 서울중앙병원 산부인과에서 균형전좌에 의한 반복 유산으로 진단받은 여성에게 체외수정시술시 FISH를 이용한 착상전 유전진단을 시도하여 임신과 분만에 성공한 1례를 경험하였기에 문헌 고찰과 함께 보고하는 바이다.

인 용 문 헌

- Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter HJ, Massey J, Mayer MP, et al: Impairment of the hatching process following IVF in human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum Reprod* 1990, 5, 7-13.
- Dale B, Gualtieri R, Talevi R, Tosti E, Santella L, Elder K: Intercellular communication in the early human embryo. *Mol Reprod Dev* 1991, 29, 22-28.
- Delhanty JD: Preimplantation diagnosis. *Pren Diag* 1994, 14, 1217-1227.
- Dokras A, Sargent IL, Ross C, Gardner RL, Barlow DH: Trophoctoderm biopsy in human blastocysts. *Human Reprod* 1990, 5, 821-825.
- Griffin DK, Wilton LJ, Handyside AH, Winston RML, Delhanty JDA: dual fluorescent in situ hybridization for simultaneous detection of X and Y chromosome-specific probes for the sexing of human preimplantation embryonic nuclei. *Hum Genet* 1992, 89, 18-22.
- Grifo JA, Tang YX, Cohen J, Gilbert F, Sanyal MK, Rosenwaks Z: Ongoing pregnancy in a hemophilia carrier by embryo biopsy and simultaneous amplification of X and Y chromosome specific DNA from single blastomeres. *JAMA* 1992, 6, 727-729.
- Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RML, Handyside AH: Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990, 5, 708-714.
- Hill JA: Recurrent spontaneous early pregnancy loss. In: Berek JS, Adashi EY, Hillard PA, eds. *Novak's Gynecology*, 12th ed. Baltimore; Williams & Wilkins, 1996, 963-973.
- Hopman AHN, Ramaekers FCS: In-situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. *Histochem* 1988, 89, 307-316.
- Kerns WG, Pearson PL: Fluorescence in situ hybridization using chromosome-specific DNA libraries. In: Choo KHA, ed. *Methods in molecular biology*. New York; Humana Press, 1994, 15-22.
- Krzyminka UB, Lutjen J, O'Neill C: Assessment of the viability and pregnancy potential of mouse embryos biopsied at different preimplantation stages of development. *Hum Reprod* 1990, 5(2), 203-208.
- Muggleton-Harris AL, Glazier AM, Pickering SJ: Biopsy of the human blastocyst and polymerase chain reaction (PCR) amplification of the beta-globulin and a dinucleotide repeat motif from 2-6 trophoctoderm cells. *Hum Reprod* 1993, 8, 2197-2205.
- Munne S, Grifo J, Cohen J: Preimplantation diagnosis with fluorescence in situ hybridization. *Assist Repro Rev* 1993, 3, 100-106.
- Neveu S, Hedon B, Bringer J, Chinchole JM, Arnal F, Humeau C, Cristol P, Viala JL: Ovarian stimulation by a combination of a gonadotropin-releasing hormone agonist and gonadotropins for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1987, 47, 639-643.
- Plouffe L Jr, White EW, Tho ST, Sweet CS, Layman LC, Whitman GF, McDonough PG: Etiologic factors of recurrent abortion and subsequent reproductive performance of couples: have we made any progress in the past 10 years? *Am J Obstet Gynecol* 1992, 167, 313-320.

- Tan SL, Kingsland C, Campbell S, Mills C, Bradford J, Alexnader N, Yovich J, Jacobs HS: The long protocol of administration of gonadotropin-releasing hormone agonist is superior to the short protocol for ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1992, 57, 810-814.
- Tan SL, Maconochie N, Doyle P, Campbell S, Balen A, Bekir J, Brinsden P, Edwards RG, Jacobs HS: Cumulative conception and live birth rates after in vitro fertilization with and without the use of the long, short and ultrashort regimens of the gonadotropin-releasing hormone agonist busserelin. *Am J Obstet Gynecol* 1994, 171, 513-520.
- Tulppala M, Palosuo T, Ramsay T, Miettinen A, Salonen R, Ylikorkala O: A prospective study of 63 couples with history of recurrent spontaneous abortions: contributing factors and outcome of subsequent pregnancies. *Hum Reprod* 1993, 8, 764-770.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Freidline M, et al: Polar body diagnosis of common aneuploidies by FISH. *J assist Reprod Genet* 1996, 13, 157-162.
- Verlinsky Y, Ginberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Storm CM: Analysis of the 1st polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod* 1990, 5, 826-829.
- Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC: Incidence of early loss of pregnancy. *N Eng J Med* 1988, 319, 189-194.
-