

고식적 체외수정 시술 시 수정 실패 환자에 대한 세포질내 정자주입술의 효용성

동아대학교 의과대학 산부인과학교실
한 명 석

The Efficacy of Intracytoplasmic Sperm Injection for Previous Fertilization Failure with Conventional In Vitro Fertilization

Myoung Seok Han

Department of Obstetrics and Gynecology, Dong-A University College of Medicine, Busan, Korea

Objective: This study is to evaluate the efficacy of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for previous fertilization failure with conventional in vitro fertilization (IVF), compared with ICSI for male factor.

Method: The author analyzed the 3 years of clinical experience with ICSI retrospectively, between the conventional IVF failure group (IVF failure) and male factor group (male factor). Surgically retrieved epididymal or testicular spermatozoa for ICSI were excluded. The IVF failure group was 13 cycles of 6 patients and male factor group was 30 cycles of 15 patients.

Results: The fertilization rates of the IVF failure group and male factor group were 63% and 66% respectively ($p=0.635$). The clinical pregnancy rates of the both group were 23.1% and 26.7% ($p=0.804$), and that of live birth rates were 15.4% and 13.3% ($p=0.858$). There were no significant difference between the two groups.

Conclusion: The author concluded that ICSI can overcome previous fertilization failure, with the same fertilization and clinical pregnancy rates seen in patients with male factor.

Key Words: Intracytoplasmic sperm injection, In vitro fertilization, Fertilization failure

ICSI는 보조생식술 영역에서 심한 남성 불임 환자 혹은 고식적 체외수정 시술 시 수정율이 낮거나 수정 실패의 경우에 성공적인 방법으로 인식되고 있다. 현재까지 ICSI는 남성 불임 환자의 정액 검사상 정액 소견 차이나, 정자의 채취 부위와 관계없이 비슷한 결과들을 나타내는 것으로 보고하고 있다.

ICSI에 관한 많은 연구들이 있어 왔으나, 정상 정액 검사 소견을 보이면서 수정율이 낮거나 수정 실패를 나타내는 경우 다음 주기에 ICSI를 시행한 결과에 대해서는 비교적 연구된 바가 적다. 대체로 이러한 수정 실패의 원인으로 정자가 투명대 (zona pellucida)를 통과하지 못하거나 통과하였더라도 난자의 잠재적 결함에 의해 난자 활성이 일어나지 못한 것으로 생각되고 있다. 과거에 이런 고식적 체외수정 주기에서 수정 실패가 일어난 경우 치료로써 partial zona dissection이나 subzonal insemination이 시도

를 나타내는 경우 다음 주기에 ICSI를 시행한 결과에 대해서는 비교적 연구된 바가 적다. 대체로 이러한 수정 실패의 원인으로 정자가 투명대 (zona pellucida)를 통과하지 못하거나 통과하였더라도 난자의 잠재적 결함에 의해 난자 활성이 일어나지 못한 것으로 생각되고 있다. 과거에 이런 고식적 체외수정 주기에서 수정 실패가 일어난 경우 치료로써 partial zona dissection이나 subzonal insemination이 시도

되어 왔으나 성공률이 좋지 않았고 높은 비율의 다정자수정 (polyspermy)이 발생하여 왔다.²³ 최근에 이런 단점을 극복하기 위한 방법으로 ICSI가 표준적인 방법으로 인식되고 있으나, 위와 같은 정상 정액 소견에도 불구하고 수정 실패한 환자에 대해 성공적인 방법으로 인식되는지는 명확하지 않다.

최근의 몇몇 연구에 의하면 ICSI가 정상적인 정액 검사 소견을 보이면서 고식적 체외수정에서 수정 실패를 나타낸 경우에 시도될 경우 그리 만족스러운 결과를 보이지 않는 것으로 보고하고 있다.⁴⁵ 이러한 연구들은 ICSI가 잠재적인 난자 내부의 결합을 극복하지 못한 것으로 생각되고 있다.

반면 다른 연구에서는 ICSI가 정상 정액 소견을 보이면서 원인 모를 수정 실패의 경우와 남성인자에 의한 경우를 비교할 때 비슷한 수정율과 임신율을 보임으로써 유용하게 이용될 수 있는 방법으로 주장하고 있다.⁶⁷

본 연구에서는 정상 정액 검사 소견을 보이면서 고식적 체외수정 시도에서 수정이 이루어지지 않아 ICSI를 시행한 군과 심한 남성인자로 인해 ICSI를 시행한 군 사이에 수정율, 할구 분할율, 임신율, 출산율 등을 비교하여 ICSI가 고식적 방법으로 수정 실패한 환자에게도 유용한 방법인지 알아보려고 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구에서는 최근 3년간 동아대학교 병원 불임 클리닉에서 시행한 ICSI 환자를 두 군으로 나누어 후향적 고찰을 하였다. 첫번째 군은 체외수정을 시도한 주기에서 정액 검사 소견은 WHO 기준으로 정상이었으나 원인 모를 수정 실패를 보여 배아 이식을 할 수 없었던 경우로 6명 환자의 13주기를 대상으로 하였다 (IVF failure group). 두번째 군은 정액 검사상 정자의 수나 운동성이 심하게 떨어져 있어 정상적인 체외수정으로 수정이 어려운 15명의 환자의 30주기를 대상으로 하였다 (Male factor group). 같은 기간 ICSI를 시행한 환자 중 무정자증으로 인해 고환 정자나 부고환 정자를 이용한 경우는 제외시켰다.

2. 연구 방법

1) 과배란 유도

난자 채취를 위한 과배란 유도는 모든 대상 환자에게 단기 요법 (short protocol)을 사용하였는데, 생리 2일째부터 GnRH agonist인 Suprefact® (Hoechst AG, Germany)를 피하주사하고 생리 3일째부터 hMG (IVF-M, LG chemistry, Korea)와 high-purified FSH (Follimone, LG chemistry, Korea) 병용하여 근주하였다 (flare-up protocol), 생리 7일째부터 질식 초음파를 이용하여 우성 난포의 크기와 혈청 E₂ (estradiol) 농도를 측정하였다. 우성 난포의 크기가 18~20 mm에 도달하면 hCG (IVF-C, LG chemistry, Korea) 10,000 IU를 투여하였고, hCG 투여 후 36시간 후에 질식 초음파 유도 하에 난자 채취를 시행하였다.

2) 정자 처리

정액 채취는 3~5일간의 금욕 후 수음에 의하여 소독된 용기에 받은 후 37℃ 상온에서 30분간 액화시켰다. WHO 기준 (1992)에 의해 정액을 평가한 후 15 mL 원추관에 정액을 옮긴 후 10% Serum Substitute Supplement (IRVINE, 99193, USA; 이하 10% SSS)를 혼합한 Ham's F-10 배양액을 정액 양의 2배로 넣어 희석시키고 300xG로 10분간 원심분리시킨다. 상층액을 제거하고 정자피에 다시 1 mL의 배양액을 넣고 다시 동일한 방법으로 원심분리를 시행하여 세척하고 다시 상층액을 제거한 다음 정자피 위에 0.2 mL의 배양액을 조심스럽게 올려놓은 후 60분간 배양하여 swim-up시켜 운동성 정자를 회수하였다.

3) 난자 처리

채취된 난자는 P-1 (IRVINE, 99242, USA; 이하 SSS)에 10% SSS를 첨가한 배양액 (이하 P-1, +10% SSS)에 4~5시간 배양한 후에 난구 세포를 제거하기 위해 80 IU/mL hyaluronidase (Sigma, H-3506)에 노출시킨 후 가늘게 뽑은 피펫을 이용하여 난구 세포를 완전히 제거한 후 3회 세척하였다. 세척된 난자는 P-1 배양액에 옮긴 후 세포질내 정자주입술을 시행하기 전까지 CO₂ 배양기 내에서 배양하였다. 세포질내 정자주입술 전에 난자의 성숙도를 확인한 후 극체 (polar body)가 확인된 난자만 세포질내 정자주입술을 시행하였다.

4) 세포질내 정자주입

세포질내 정자주입술은 도립현미경 (Nikon, Diaphot, Japan) 하에서 미세조작기 (Narashige, Japan)을 이용해서 시술하였으며 난자 고정 피펫은 직접 손으로 제조한 것을, 정자주입 피펫 (Humagen fertility diagnostics, Ins., USA)은 내경이 5~6 μm이고 45° 각을 가진 피펫을 사용하였다.

시술은 광유 (mineral oil)로 덮은 페트리 접시 (Falcon 1006, USA) 내에서 phenol red가 없는 EBSS (Gibco, 14015-069, USA) 배양액을 사용하였으며 정자는 PVP (IRVINE, 99219, USA)에 넣어 운동성을 감소시킨 후 정자주입 피펫으로 정자의 꼬리 중편부에 물리적인 힘을 가하여 운동성을 없애고 피펫 내로 흡인하여 난자 세포질내로 주입하였다. 정자가 주입된 난자는 2~3회 세척한 후 수정 확인까지 P-1 (+10% SSS) 배양액으로 옮겨 배양하였다.

5) 수정 확인 및 배아 이식

ICSI 시행 후 16~18시간 후 두 개의 전핵이 형성

되었는지를 x100의 위상차 도립현미경으로 관찰하였다. 2개의 전핵이 확인된 수정란은 HTF (IRVINE, 9962, USA)에 20% SSS를 첨가한 배양액에 배양하였다. 그리고 배양된 배아는 이식할 때까지 매 24시간마다 신선한 배양액으로 교환하여 계속 배양시켰고, 배아의 형태학적 평가는 3등급으로 나누었는데 할구의 분절 (fragmentation)이 없는 것을 Excellent, 20% 이하인 것을 Good, 그리고 20% 이상인 것을 Poor로 나누었다. 난자 채취 후 48~72시간 후에 발달 상태가 양호한 배아만을 플라 자궁 내에 이식하였다.

6) 통계 처리 및 분석

SAS Ver 6.12 (SAS Institute, USA)를 이용하여 두 군간의 평균 비교는 Student t-test로 비교하였고, 두 군간의 빈도 비교는 χ^2 -test 또는 Fisher's exact test를 이용하여 비교하였으며, 유의 수준은 p<0.05인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

Table 1. The causes of infertility in previous in-vitro fertilization failure group (IVF failure group)

Characteristics	No. of cycle
Tubal factor	4
Ovulatory factor	1
Endometriosis Stage III	2
Unexplained	6
Total	13

Table 2. Characteristics of ejaculated semen used in male factor group

Characteristics	No. of cycle
Oligozoospermia	4
Asthenozoospermia	11
Oligoasthenozoospermia	12
Asthenoteratozoospermia	2
Oligoasthenoteratozoospermia	1
Total	30

Table 3. Clinical features of both group

	IVF failure group	Male factor group	p-value
No. of patients	6	15	
No. of cycles	13	30	
Age			
Female	36.4±3.9	30.4±4.8	0.001
Male	38.5±7.5	36.3±6.3	0.34
Duration of infertility (years)	7.1±1.4	5.6±2.7	0.07
No. of oocyte recovered	11.1±7.4	8.1±4.2	0.11
Maximal E ₂ level (pg/mL)	3412.6±1168.4	2878.0±1223.1	0.18

E₂: estradiol, Values are means±SD

Table 4. Results of ICSI of both group

	IVF failure group	Male factor group	p-value
No. of oocytes collected	144	244	
No. of mature oocytes injected	80 (56)	181 (74)	0.001
No. of oocytes fertilized	55 (63)	119 (66)	0.635
No. of oocytes cleaved	55 (100)	111 (93)	0.057
No. of embryo transferred	50	102	
Average no. of embryo per transfer	3.9	3.4	

Values in parentheses are percentages

Table 5. Quality of embryo transferred after ICSI

	IVF failure group	Male factor group
No. of blastomere		
≤3	10 (15)	22 (20)
4~6	45 (85)	85 (77)
≥7	0 (0)	4 (3)
Morphologic grade		
Excellent	46 (84)	82 (73)
Good	8 (14)	22 (19)
Poor	0 (0)	3 (3)
Arrest	1 (2)	6 (5)

Values in parentheses are percentages

결 과

두 군간의 채취수정 원인에 대한 분석으로 IVF failure군 6명 환자의 13주기 중 원인 불명의 불임이 6주기였고, 난관인자가 4주기였으며, 종종 자궁내막증과 배란인자가 각각 2주기, 1주기였다 (Table 1).

Male factor군은 15명 환자의 30주기 중 oligoasthenozoospermia가 12주기였고, asthenozoospermia가 11주기였으며 oligozoospermia가 4주기였다 (Table 2).

두 군간의 임상적 특징에 관한 차이는 IVF failure군에서 여성의 나이가 36.4 ± 3.9 세로 male factor군의 30.4 ± 4.8 세 보다 유의하게 높은 것으로 나타났다 ($p=0.001$). 그 외 두 군간의 불임 기간, 채취한 난자의 수 그리고 난자 채취 당시의 E₂ 농도에서는

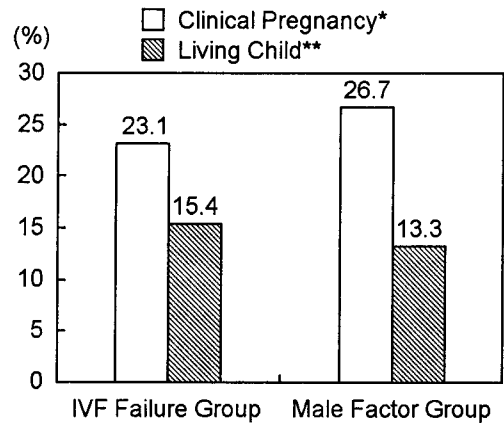


Figure 1. Comparison of clinical pregnancy and living child of both group (* $p=0.804$, ** $p=0.858$).

차이가 없었다 (Table 3).

두 군간의 채취된 난자의 수는 IVF failure군이 144개이고, male factor군이 244개였다. ICSI를 시행한 성숙난자의 수는 IVF failure군이 80개로 채취된 난자의 56%였고, male factor군에서는 181개, 74%로 male factor군이 더 많았다 ($p=0.001$). ICSI후 두 군간의 수정율을 보면 IVF failure군이 55개로 63%, male factor군이 119개 66%였으며 두 군간의 유의한 차이는 없었다 ($p=0.634$). 배아 이식의 수는 IVF failure군이 50개로 주기당 평균 3.9개였고, male factor군이 102개로 주기당 평균 3.4개였다 (Table 4).

두 군간의 할구의 수는 난자 채취 후 48시간 후에 평가한 것으로 IVF failure군에서 4~6개의 할구 분할을 보이는 배아가 45개로 85%였으며, male factor군에서 85개로 77%였다. 배아의 형태학적 평가에서 IVF failure군은 Excellent가 46개로 84%였고 Good

이 8개로 14%였으며, male factor군은 Excellent가 82개로 73%였고 Good이 22개로 19%였다 (Table 5).

임상적 임신율은 IVF failure군이 23.1%였고, male factor군이 26.7%로 두 군간에 유의한 통계적 차이는 없었다 ($p=0.804$). 만삭아 출산율에서도 IVF failure군이 15.4%, male factor군이 13.3%로 두 군간에 유의한 통계적 차이가 없었다 ($p=0.858$) (Figure 1).

고 찰

ICSI가 보조생식술 영역에서 이용되기 전에는 심한 남성 불임 환자나 고식적 체외수정 후 수정 실패 환자에서는 불임 치료가 어려웠으나, 1992년 Palermo 등에⁸ 의해 ICSI가 수정 실패를 극복하는 획기적인 방법으로 떠오른 이후로 많이 이용되고 있다. 심한 남성 불임, 특히 정액 처치 후 운동성 있는 전체 정자 수가 1×10^6 개 이하의 경우는 자연 수정이 일어나기 힘든 것으로 생각되고 있고 그런 경우 체외수정 시술에서 ICSI가 보편적으로 이용되고 있다. 그러나 정상 정액 검사 소견을 보일 경우는 수정 여부를 예측할 수는 없고, 수정 시도 후 그 결과를 확인할 수밖에 없는데, 이러한 경우 수정이 일어나지 않으면 다음 체외수정 주기에서 ICSI를 이용하게 된다. 하지만 이런 경우에서 남성 불임으로 시도된 ICSI 정도의 수정율이나 임신율을 나타내는지는 논란이 있다. 본 연구는 위의 두 경우를 구분하여 ICSI를 시행한 환자에 대해 후향적 고찰을 통해 비교하였다.

수정이 이루어지기 위해서는 정자가 투명대와 난자 세포막을 통과하여야 하는데, 수정 실패의 경우에 ICSI가 이러한 장벽을 극복해 주게 된다. ICSI를 시행하여도 수정이 일어나지 않는 경우는 정자난자의 세포질내로 들어온 이후에도 난자의 활성이 없거나, 비정상적인 경우로 설명하고 있다.⁹ 본 연구의 수정율을 보면 IVF failure군에서 63%, male factor군에서 66%를 나타내어 두 군간의 통계적 유의한 차이는 없었다. 이것은 다른 연구의 결과와도 유사한데 1998년 Tomas 등의⁴ 연구에서는 각 군의 수정율이 65%로 나타났었고, 1999년 Benadiva 등도⁶ 수정 실패 환자군에서 68%, 남성 불임군에서 64%의 수정율을 보고하였다. 하지만 다른 결과를 보고한

경우도 있는데 1996년 Gabrielsen 등의¹⁰ 연구에 의하면 male factor군의 수정율이 90%, IVF failure군이 82%로 전체적으로 다른 연구에서 보다 높으며 특히, male factor군의 수정율이 통계적으로 유의하게 높게 나온 것으로 보고하고 있지만, 이런 상이한 연구 결과에 대해서는 지금까지 설명되어지지 않고 있다.

1999년 Benadiva 등은⁶ 수정 실패 환자의 임상적 임신율을 22.6%로 보고하면서 남성 불임 환자군 20.0%와 비교하여 통계적 차이가 없는 까닭에 ICSI가 원인 불명의 수정 실패군에서 유용하게 이용될 수 있는 방법으로 주장했다. 본 연구에서도 임신율을 보면 IVF failure군에서 23.1%, male factor군에서 26.7%를 보임으로써 두 군간의 유의한 차이가 없었다. 따라서 본 연구의 결과로 볼 때 ICSI는 체외수정에서 수정 실패를 나타낼 경우 다음 주기에 유용하게 쓸 수 있는 방법으로 생각된다.

어떤 연구에서는 불임의 원인이 수정 실패에도 불구하고 고식적 체외수정을 반복할 경우의 결과에 영향을 미친다고 한다. Lipitz 등은¹¹ 난관요인에 의한 불임일 경우 비록 수정 실패가 일어날지라도 다시 고식적 체외수정을 시도할 경우에 예후가 좋은 것으로 보고하고 있다. 본 연구에서는 수정 실패가 일어날 경우 다시 고식적 체외수정 시도 없이 ICSI를 시행하였으므로 불임 원인에 따른 반복 체외수정의 결과는 알 수 없었다.

여성의 나이가 통상적으로 체외수정에서 임신율에 영향을 미치는 것으로 여겨지고 있다. 본 연구에서는 IVF failure군이 36.4 ± 3.9 세로 male factor군의 30.4 ± 4.8 세 보다 유의하게 높으나, 수정율과 임신율에 있어서 두 군이 비슷한 결과를 보이는 것으로 보아 본 연구에서는 여성의 나이는 결과에 영향을 미치지 못한 것으로 사료된다. 그러나 대상 예가 많으면 나이에 따른 차이도 나타날 수 있을 것으로 생각된다.

이상과 같은 연구 결과로 고식적 체외수정 시도 시 수정 실패의 경우에 시도되는 ICSI가 남성 불임에 의해 시도되는 ICSI 만큼 임상적으로 유용하게 사용될 수 있는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Nagy Z, Liu J, Cecile J, Silber S, Devroey P, Van Steirteghem A. Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995; 63: 808-15.
2. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, et al. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod* 1993; 8: 1055-60.
3. Vanderzwalmen P, Barlow P, Nijs M, Bertin G, Leroy F, Schoysman R. Usefulness of partial dissection of the zona pellucida in a human in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod* 1992; 7: 537-44.
4. Tomas C, Orava M, Tuomivaara L, Martikainen H. Low pregnancy rate is achieved in patients treated with intracytoplasmic sperm injection due to previous low or failed fertilization in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13: 65-70.
5. Miller KF, Falcone T, Goldberg JM, Attaran M. Previous fertilization failure with conventional in vitro fertilization is associated with poor outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69: 242-5.
6. Benadiva CA, Nulsen J, Siano L, Jennings J, Givargis HB, Maier D. Intracytoplasmic sperm injection overcomes previous fertilization failure with conventional in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1999; 72: 1041-4.
7. Svalander P, Forsberg AS, Jkobsson AH, Wikland M. Factors of importance for the establishment of a successful program of intracytoplasmic sperm injection for male infertility. *Fertil Steril* 1995; 63: 828-37.
8. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-8.
9. Tesarik J, Sousa M. More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. *Fertil Steril* 1995; 63: 343-9.
10. Gabrielsen A, Petersen K, Mikkelsen AL, Lindenberg S. Intracytoplasmic sperm injection does not overcome an oocyte defect in previous fertilization failure with conventional in-vitro fertilization and normal spermatozoa. *Hum Reprod* 1996; 11: 1963-5.
11. Lipitz S, Rabinovici J, Goldenberg M, Bider D, Dor J, Mashiach S. Complete failure of fertilization in couples with mechanical infertility: implications for subsequent in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 1994; 61: 863-6.