

# 착상전 유전진단 (Preimplantation Genetic Diagnosis)의 임상적 적용

관동대학교 의과대학 제일병원 산부인과

김진영 · 강인수\*

## Clinical Application of Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD)

Jin Yeong Kim, Inn Soo Kang\*

Department of Obstetrics and Gynecology, Cheil General Hospital, Kwandong University College of Medicine

[Korean. J. Reprod. Med. 2008; 35(1): 19-38.]

착상전 유전진단 (preimplantation genetic diagnosis, PGD)은 산전진단 (prenatal diagnosis)의 대안으로 소개된 방법으로, 착상전 배아 단계에서 유전질환이나 염색체 이상의 유무를 진단하여 이환되지 않은 배아를 이식함으로써 정상적인 태아의 임신을 성립시킬 수 있는 방법이다. 따라서 유전질환이나 염색체 이상이 있는 태아의 임신 중절을 피할 수 있는 장점이 있다. 산전진단은 임신이 된 후 양수검사나 융모막 융모검사, cordocentesis 등을 통해 얻어진 태아세포에서 유전질환이나 염색체 이상을 진단하는 것으로, 이상이 있는 경우에는 임신 중절을 하여 이환된 태아의 출생을 예방하게 되는데, 이러한 경우 임신 중절에 따르는 신체적, 정신적 고통을 겪게 되며 윤리적 문제가 있다. 또한 부부의 염색체 이상으로 인한 반복 자연유산에서는 산전진단이 가능한 시기 이전에 유산이 일어나기 때문에 산전진단보다 더 조기에 진단할 수 있는 방법이 필요하며, 이러한 측면에서 착상전 유전진단은 매우 효과적인 방법이다.

그 과정은 체외수정 기술 (in vitro fertilization and

embryo transfer, IVF-ET)을 시행하여 얻어진 난자의 극체 (polar body)를 생검 (biopsy)하거나 배아 (embryo)로부터 1~2개의 할구세포를 생검 (biopsy)하여 단일세포 수준에서 polymerase chain reaction (PCR)이나 fluorescence in situ hybridization (FISH) 기법을 이용한 유전진단을 시행하고, 유전병이 없거나 정상적인 염색체를 갖는 배아를 선별적으로 자궁내에 이식하여 임신을 시도한다.

착상전 유전진단의 착안은 배아의 초기 발달 단계에 있어 indeterminate cleavage라는 현상에 기초한다. 즉, 8세포기 정도의 초기 배아로부터는 한 개 내지 두 개의 할구를 떼어내도 배아는 계속 발달할 수 있다는 것이다.<sup>1</sup> 그러나 문제는 이렇게 얻어진 단일세포에서 유전진단을 할 수 있을 정도로 예민한 진단 기법이 뒷받침되어야 했으며, 착상전 유전진단의 발달은 FISH나 PCR로 적은 검체에서도 유전진단을 할 수 있는 진단 기법이 발달함으로써 가능하게 되었다.<sup>2</sup> 최초의 착상전 유전진단은 1990년 Handyside 등이 X-linked recessive 유전질환을 가진 가계의 부부에서 정상인이나 보인자가 되는 여아를 선택적으로 이식하여 임신을 보고한 것이었다.<sup>3</sup> 배아의 할구세포에서 PCR 기법을 이용하여 Y 염색체 특이 서열을 증폭시킴으로써 증폭이 없는 경

주관책임자: 강인수, 우) 100-380 서울특별시 중구 목정동 1-19, 관동대학교 의과대학 제일병원 산부인과  
Tel: (02) 2000-7581, Fax: (02) 2000-7790  
e-mail: lkang67@yahoo.co.kr

우는 여아로 진단하여 배아 이식을 하였다. 한편 배아에서 뿐 아니라, Verlinsky 등은 난자의 극체를 생검하여 착상전 유전진단을 시행하였다.<sup>4</sup> 성공적인 착상전 유전진단을 위해서는, 고도의 보조생식술 기법과 단일 할구세포를 얻기 위한 미세조작기술, DNA양이 매우 적은 단일세포 수준에서의 정확한 분자생물학적 진단 기법 등이 요구된다.

최근까지 착상전 유전진단을 시행하는 유전질환이 계속 증가되고 있으며, 배아의 염색체 이수성을 선별하여 보조생식술의 효율을 증대시키는 방안으로도 이용되고 있고, late onset disorder나 HLA typing 등으로 그 적용범위가 확대되고 있다. 유럽 생식의학회 (European Society for Human Reproduction and Embryology, ESHRE) 산하의 PGD consortium의 최근 보고에 의하면 1997년부터 2004년 까지 세계적으로 약 9180주기의 착상전 유전진단이 시행되어, 약 1170명의 건강한 아기가 태어났다.<sup>5</sup> 이에 착상전 유전진단의 임상적 적용 및 결과, 새로운 진단 기법 등의 최신 동향에 대하여 알아보하고자 한다.

### 착상전 유전진단의 적응증

착상전 유전진단의 적응증이 되는 질환들은 주로 단일 유전질환 (single gene disorder, 상염색체 우성, 상염색체 열성, X-연관 질환, triplet repeat disease)과 염색체의 구조적 이상 (전좌, 역위, 결실, 삽입 등)이며 또한 염색체의 숫적 이상 (aneuploidy)을 예방하기 위한 경우 등에서도 시행된다. 그 외에도 최근 적용범위가 확대되고 있다.

#### 1. 단일 유전질환의 착상전 유전진단

착상전 유전진단은 단일세포에서의 진단이므로 단일 유전자 질환에서 많이 연구되고 시행되어 왔다. 대표적인 질환은 cystic fibrosis로, 가장 흔한  $\Delta F508$  돌연변이를 진단하기 위한 착상전 유전진단이 최초로 시행되었다.<sup>6</sup> 단일 유전질환은 유전자의 돌연변이 (mutation), 결실 (deletion) 등에 의해 발생할 수 있으며, 유전되는 방식에 따라 상염색체

우성, 상염색체 열성, X-연관 열성, X-연관 우성 유전, 및 3개의 염기서열의 수가 과다하게 증가되는 triple repeat disease로 분류된다. 착상전 유전진단을 시행하는 경우에는 임상적, 유전적으로 정확한 진단이 확립되고, 단일 유전자 이상에 의한 유전질환인지 명확해야 하며, 정확한 가계도와 가능한 많은 가족 구성원에 대한 유전정보가 있어야 한다. 다인자성 유전에서는 적용이 불가능하다. 또한 치료방법이 없는 치명적인 병인지 윤리적 측면도 고려하여야 한다. 다양한 단일 유전자 질환에서 착상전 유전진단이 시행되어 보고되고 있다 (Table 1,<sup>5</sup> Table 2). 최근 우리나라에서는 생명윤리법에 의거, 배아나 태아를 대상으로 시행할 수 있는 유전자 검사를 63종의 유전질환으로 제한하고 있다 (생명윤리법 제 25조 2항, 시행령 제 14조)

#### 1) 상염색체 우성 유전질환 (Autosomal dominant)

변이 유전자 하나만 있어도 질환이 발현되는 경우이다. 보통 증상이 심하지 않은 경우가 많고 성장한 후에 서서히 발현되는 경우도 있기 때문에 자식을 가질 수도 있으며 자식의 50%가 질환에 이환된다. 한편, 우성 유전질환은 변이 유전자가 있더라도 질환이 발현되지 않는 경우가 있을 수 있고 (low penetrance), retinoblastoma 같은 유전적인 종양에서는 "second hit" 개념으로 반대편의 정상 유전자까지 변이가 일어나 종양이 발생되고 그렇지 않으면 변이 유전자 하나만을 갖고 있어도 질환이 발생하지 않을 수도 있다. 우성 유전에서는 착상전 유전진단시에 변이 유전자와 정상 유전자를 모두 정확히 진단해 내야 하므로 오진이 되지 않도록 주의를 요한다. 착상전 유전진단이 시행된 질환으로는 가장 흔한 경우가 myotonic dystrophy, Huntington disease, Marfan syndrome, Familial adenomatous polyposis coli이고, 그 외 Charcot-Marie-Tooth disease, Crouzon syndrome, achondroplasia, neurofibromatosis type 2, Osteogenesis imperfecta I and IV, Stickler syndrome, tuberous sclerosis 등이 있다.<sup>5</sup>

**Table 1.** Indications of preimplantation genetic diagnosis for monogenic diseases (ESHRE consortium data collection V, 2005)

---

21-hydroxylase deficiency
Adrenoleukodystrophy
Agammaglobulinemia
Alport syndrome
Adult polycystic kidney disease
BRCA1
Canavan disease
Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A
Central core disease
Crouzon syndrome
Familial adenomatous polyposis coli
Fanconi anemia
Gaucher disease
Glucose-6-phosphatase deficiency
Gorlin syndrome
Hunter syndrome (MPS II)
Hyperinsulinemic hypoglycemia PHH1
Infantile neuronal ceroid lipofuscinosis
Junctional epidermolysis bullosa
Lesch-Nyhan syndrome
LCHAD (long chain 3-hydroxyacyl-coA dehydrogenase deficiency)
Medium chain acyl-coA dehydrogenase deficiency

---

## 2) 상염색체 열성 유전질환 (Autosomal recessive)

대부분의 치명적인 질환은 열성 유전이다. 부모로부터 물려받은 유전자가 모두 변이 유전자일 때 질환을 나타내는 경우이다. 한 개의 변이 유전자와 한 개의 정상 유전자를 가진 이형접합 (heterozygous)일 때는 질환을 나타내지 않는다. 가계도에서 보면 남자, 여자가 동일하게 이환되고, 한 세대

**Table 1.** Continued

---

MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lacticidosis, stroke)
Metachromatic leukodystrophy
Multiple exostosis
Neurofibromatosis
Norrie's disease
Oral facial digital syndrome type 1
Ornithine transcarbamylase deficiency
Osteogenesis imperfecta type I, IV
PDH deficiency
Pelizaeus-Merzbacher disease
Retinoblastoma
RhD sensitization
Rhizomelic chondrodysplasia punctata
Severe combined immunodeficiency
Skewed X inactivation
Skin fragility syndrome
Spinal and bulbar muscular atrophy
Spinocerebellar ataxia type 3, 7
Stickler syndrome
Tay-Sachs disease
Tuberous sclerosis
Tyrosinemia
Von-Hippel-Lindau disease
Waardenburg syndrome

---

에 국한되어 나타나며, 이환된 아이가 있을 때 다음 아기에서 다시 나타날 확률은 1/4이고, 환아가 있는 가계에서 정상아가 보인자일 확률은 2/3이다.  $\beta$ -thalassemia나 Cystic fibrosis의 경우에는 돌연변이가 환자마다 매우 다양하고, 양측으로부터 물려받은 돌연변이가 각각 다른 경우도 있는데 이를 compound heterozygous라고 하며, 이 경우 착상전 유전진단이 매우 까다롭다. 착상전 유전진단이 시

**Table 2.** Indications and diagnostic strategies in PGD for monogenic disease

Indication	Method	Reference
Familial adenomatous polyposis coli	Primer extension pre-amplification, PCR for mutation and for marker	Ao et al., 1998 <sup>7</sup>
Cystic fibrosis	Fluorescent PCR-allele size difference Fluorescent marker multiplex	Findlay, et al., 1995 <sup>8</sup> Dreesen et al., 2000 <sup>9</sup>
$\beta$ -thalassemia	Restriction enzyme digestion and linked marker Denaturing gradient gel electrophoresis	Kuliev et al., 1998 <sup>10</sup> Kanavakis et al., 1999 <sup>11</sup>
Congenital adrenal hyperplasia	Fluorescent PCR and restriction enzyme	Van de Valde et al., 1999 <sup>12</sup>
Marfan syndrome	Fluorescent PCR and marker	Sermon et al., 1999 <sup>13</sup>
Ornithine transcarbamylase deficiency	Nested PCR (mutation+ marker) Duplex nested PCR	Ray et al., 2000 <sup>14</sup> 이형송 등, 2004 <sup>15</sup>
DMD	Nested multiplex Fluorescent multiplex and marker	Ray et al., 2001 <sup>16</sup> 이형송 등, 2005 <sup>17</sup>
Spinal muscular atrophy	Fluorescent PCR	Georgiou et al., 2001 <sup>18</sup>
Myotonic dystrophy, cystic fibrosis, fragile X syndrome, neurofibromatosis, Crouzon	Fluorescent multiplex	Harper et al., 2002 <sup>19</sup>
Charcot-Marie-Tooth disease type 1A	Fluorescent multiplex	De Vos et al., 2003 <sup>20</sup>
Cystic fibrosis, $\beta$ -thalassemia, sickle-cell anemia, hemophilia A, retinoblastoma, spinal muscular atrophy	Fluorescent multiplex and mini-sequencing	Fiorentino et al., 2003 <sup>21</sup>
Achondroplasia	Fluorescent PCR	Moutou et al., 2003 <sup>22</sup>
Familial adenomatous polyposis coli, von Hippel-Lindau disease, retinoblastoma, Li-Fraumeni syndrome, neurofibromatosis, familial posterior fossa brain tumor	Polar body, nested multiplex PCR	Rechitsky et al., 2002 <sup>23</sup>

행된 대표적인 질환들은 cystic fibrosis,  $\beta$ -thalassemia spinal muscular atrophy, sickle cell anemia 등이며, Tay-Sachs disease, Lesch-Nyhan syndrome, epidermolysis bullosa, adrenoleukodystrophy, Gaucher's disease, congenital adrenal hyperplasia 등에서 시행되었다.

**3) X-연관 열성 유전질환 (X-linked recessive disease)**

번이 유전자가 X 염색체에 존재하는 경우이며, 심한 경우는 모두 열성이다. 모친은 증상이 없는 보인자이고 그 아들의 번이 질환에 이환된다. 번이 유전자가 발견되는 경우도 있지만 정확한 유전정보를 모르는 경우도 있어, 착상전 유전진단시 sexing

으로 정상 또는 보인자인 여아를 선별하여 이식하기도 한다. 대표적으로 Duchenne muscular dystrophy (DMD), fragile X syndrome, haemophilia A에서 많이 시행되고 있으며, Alport syndrome, Hunter's syndrome, retinitis pigmentosum 등에서 착상전 유전진단이 시행된 바 있다.

**4) X-연관 우성 유전질환 (X-linked dominant disease)**

번이 유전자가 X 염색체에 존재하며 보인자인 여아에서도 증상이 나타날 수 있다. Ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency, Alport syndrome, orofacial-digital syndrome type I 등이 있다.

**5) Triplet repeat disease**

특정 유전자와 관련된 3염기의 수가 불안정하게 반복되어 증가되면서 나타나는 질환이다. 각 세대를 내려오면서 반복되는 염기의 수가 증폭되어 대를 이어서 점점 심해진다. Neurological disease와 관련되어 있다. Myotonic dystrophy, Huntington's disease, 취약 X 증후군 (Fragile X syndrome) 등이 해당된다. 취약 X 증후군은 정신박약을 나타내는 가장 흔한 유전질환으로, X염색체 FMR1 gene 내에 있는 CGG 염기가 증폭된다. 정상적으로는 약 6~54개의 copy를 갖지만, 54~200사이의 copy를 가지면 premutation으로서 보인자 상태이고, 200개 이상을 가지면 질환을 나타내는데 특히 남성에서는 심하게 나타나고, 여성에서는 정도나 증상이 다양하게 나타난다. Premutation은 조기 폐경과도 관련이 있다.

**2. 염색체 이상 (Chromosomal abnormality)에서의 착상전 유전진단**

**1) 구조적 이상 (structural aberration)에 기인한 반복 자연유산**

**(1) 상호 전좌 및 로벗슨 전좌 (reciprocal and Robertsonian translocation)**

2개 이상의 관련된 염색체 일부가 각각 잘려서 위치가 서로 교환되는 경우로 전체적 염색체의 양은 정상이므로 대개 표현형은 정상이지만, 감수분열 과정에서 많은 수의 불균형적 염색체를 가진 난자, 정자를 형성하므로 반복 자연유산의 원인이 된다 (Figure 2a, b). 로벗슨 전좌는 선단부 부착 염색체 (acrocentric chromosome, 13, 14, 15, 21, 22)에서 일어나는데, 단완의 위성부위가 손실되고 중심에서 두 염색체가 융합된다. 상호 전좌는 관련된 두 염색체의 일부가 절단된 후 서로 위치만 바뀌는 경우이다.

**(2) 역위 (inversion)**

한 염색체의 일부의 양끝이 잘려서 거꾸로 재조합되면, 그 부위 유전물질의 순서가 거꾸로 된다. 중심체를 포함하는 중심체주변 역위 (pericentric inversion)과 중심체로부터 떨어진 부위의 부중심절

역위 (paracentric inversion)가 있다. 보인자는 임상적으로 대개 정상이나, 생식세포는 감수분열 과정에서 불균형한 염색체를 가진 난자, 정자를 생성할 수 있다.

**2) 염색체 이수성 (aneuploidy)에 대한 screening**

PGD-AS (preimplantation genetic diagnosis-aneuploidy screening), 또는 PGS (preimplantation genetic screening) 라고도 한다.

**(1) Advanced maternal age**

체외수정을 통하여 수정관에서 염색체 이상이 높다는 것을 알게 되었다. 수정관의 약 23~80% 정도가 염색체 이수성을 보이며 FISH 기법의 발달로 염색체 이상의 기전이나 종류에 대해 알려지게 되었다.<sup>24,25</sup> 정상적 또는 비정상적으로 발달하는 수정관에서 13, 18, 21, X, Y에 대한 FISH 결과 비정상적 발달을 보이는 배아에서 염색체 이상이 높게 나타나며,<sup>26</sup> 모체의 나이가 증가함에 따라 염색체 이수성의 난자 및 배아의 염색체 이수성이 증가되어 20~34세에서 이수성의 비율이 30.6%에 비해 40~47세에서는 52.4%로 나타나 이는 임신실패나 자연유산, 기형아의 위험으로 나타난다.<sup>27</sup> 따라서 모체의 연령이 고령인 경우 자연유산과 흔히 관련되는 염색체- 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22, X 및 Y 염색체- 등에 대해 FISH를 통한 착상전 유전진단을 하여 유산율을 감소시키고 착상율을 높일 수 있다.<sup>28,29</sup>

**(2) 반복 자연유산 (recurrent pregnancy loss), 반복적인 착상 실패 (repeated implantation failure)**

원인 불명의 반복적인 자연유산이나 착상 실패에서도 염색체 이수성을 갖는 배아에 기인하는 경우가 있으며, 착상전 유전진단을 적용하여 착상율을 증가시킬 수 있다.<sup>30,31</sup>

**(3) 성염색체 이상 (sex chromosome abnormality)**

터너증후군 (45,XO)이나 클라인펠터 증후군 (47, XXY) 등 성염색체 이상에서는 난소나 고환의 형

성부전으로 임신가능성이 낮으나 간혹 난자, 정자가 채취되는 경우가 있으며 특히 모자이시즘에서는 생성되는 경우가 많다. 그러나 생성된 난자, 정자 및 배아의 염색체 이상 확률이 높으므로 착상전 유전진단을 적용하여 정상적인 임신을 유도할 수 있다.<sup>32</sup>

#### (4) 심한 남성 요인의 불임 (severe male factor infertility)

무정자증이나 심한 희소정자증 환자에서 multiple testicular sperm extraction과 ICSI로 임신이 가능할 수 있으나, 비정상적인 염색체를 갖는 수정란 발생의 위험이 높다. 그러나 아직은 선별적으로 시행되며, 이런 환자군에서 일괄적으로 적용하지는 않는다.

### 3. Expanding indications for PGD

#### 1) Late onset disorders with genetic predisposition

유전자 변이가 있는 가계에서 성인이 된 후 심각한 질환이 발생할 가능성이 높은 경우, 산전진단으로 진단을 할 수는 있어도 이미 자란 태아를 유산 시키기는 어렵다. 그러나 임신이 성립되기 전에 착상전 유전진단으로 심각한 위험성을 가진 배아를 이식에서 배제시키는 방법은 유산을 시키는 것보다 윤리적으로 더 수용할 만하며, 이런 점은 착상전 유전진단의 적용범위가 산전진단보다 확대되어 시행될 수 있다는 것을 보여준다. 가족력을 보이는 치매질환으로서 early onset Alzheimer disease (APP gene)나,<sup>33</sup> Retinoblastoma (RB1), p53 tumor suppressor gene mutation, familial adenomatous polyposis coli, BRCA1, BRCA2, neurofibromatosis 1, 2 같은 cancer predisposition gene에 대한 착상전 유전진단이 시행된 바 있으며 유전적인 암의 발생을 방지할 수 있다.<sup>23</sup> 이러한 적용은 윤리적 논란이 있으나 이러한 질환의 소인을 가지고 있는 것이 환자에게는 매우 치명적인 부담이므로 대체로 착상전 유전진단을 수용하는 의견이 우세하다.

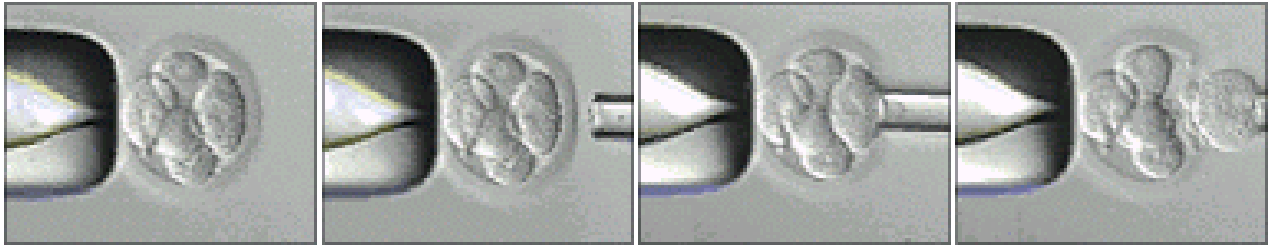
#### 2) Preimplantation HLA typing

Verlinsky 등<sup>34</sup>은 Fanconi anemia 환아를 출산한 부부에서, 두 번째 임신을 위해 착상전 유전진단을 시행하면서 Fanconi anemia 유전자 진단과 HLA typing을 함께 시행하여, Fanconi anemia에 이환되지 않고 환아와 동일한 HLA를 가진 수정란을 선택하여 이식하였다. 이렇게 태어난 건강한 둘째 아기의 제대혈 줄기세포를 환아에게 이식하여, 면역학적 거부현상 없이 환아를 치료할 수 있었다. 이러한 적용 역시 윤리적 논란이 있는데, 이러한 시술에 반대하는 의견은 '사람은 어떤 목적을 위해서 사용되어서는 안된다'는 원칙에 위배된다는 주장이며, 찬성하는 의견은 이렇게 태어난 아기도 다른 자녀와 마찬가지로 가정에서 사랑과 보살핌을 받기 때문에 이 원칙에 위배되지 않으며, 또한 만약 환아와 HLA가 일치하는 형제가 있다면 부모는 골수이식 치료를 시행할 것이므로 이러한 시술이 인정된다고 주장하고 있다. 이외에도 다양한 hematopoietic disease, thalassemia, Wiskott-Aldrich syndrome, leukemia 등에서 HLA matching을 위한 착상전 유전진단이 보고된 바 있다<sup>35</sup>.

### 착상전 유전진단의 방법

#### 1. 체외수정 시술 및 착상전 유전진단의 일정 및 개요

PGD에서는 수정란을 검사해야 하기 때문에 불임 환자가 아니더라도 체외수정 시술을 시행해야 한다. 시술 전에는 질환에 대한 사항 및 이환된 환아를 가질 위험성, 예방을 위한 다른 option 등에 대한 전문적인 유전상담을 비롯하여, 체외수정 전반 (과배란의 위험성, 이식을 못할 가능성, 보인자의 구분이 불가능한 경우 보인자의 이식 등)에 대한 상담과정이 필요하다. 또한 PGD로 임신이 된 경우 반드시 산전검사로 확인이 필요하며, 기술적 한계에 따른 오진율이 있을 수 있음을 충분히 상담하여야 한다. 체외수정 시술을 위해 GnRH (gonadotropin releasing hormone) analogue와 gonadotropin을



**Figure 1.** Blastomere biopsy of cleavage-stage embryo with acid Tyrode's solution

사용하여 과배란 유도 (controlled ovarian hyperstimulation: COH) 후 난포가 충분히 성장하면 hCG를 투여하고 36시간 후 난자 채취를 한다. 난자와 정자를 수정시킬 때 다른 세포의 유전물질이 혼입되는 것을 막기 위해서 세포내 정자 주입술 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI)을 시행하여 수정을 시행한다. 정상적으로 배아가 발생하는 경우에는 수정 1일 후 전핵 단계 (pronucleus, PN stage), 제 2일에 4-cell stage, 제 3일에 8-cell stage, 제 4일에 상실기 (morula stage), 제 5일에 포배기 (blastocyst)로 발달한다. 대개 할구 생검 (blastomere biopsy)은 제 3일째 6~10 cell stage embryo에서 시행하며 미세조작술로 할구를 1~2개 분리해 낸다. 이외에도 난자의 극체 (polar body) 또는 포배기 생검을 할 수 있다. 채취된 1~2개의 세포에서 유전검사를 시행한다. 단일 유전자 질환에서 유전자 돌연변이 진단의 경우 PCR 기법을 이용하며, 염색체 이수성의 진단은 FISH를 시행하여 염색체 검사를 시행한다. 검사결과, 비정상적인 수정란 즉, 돌연변이 유전자가 있어 유전병이 발현될 수정란 또는 유산이나 기형아를 초래할 불균형 염색체를 가진 수정란은 이식에서 제외된다. 유전병이 발현되지 않을 정상 수정란 또는 균형 염색체를 가진 수정란만을 선택하여 수정 제 4~5일에 자궁에 이식한다. 임신이 성공하면 산전진단 (chorionic villi sampling 또는 amniocentesis)을 시행하여 염색체나 유전자 상태를 확인한다.

## 2. Cell Preparation Methods

과배란 유도 및 난자 채취를 하여 얻은 난자나

체외수정 후 얻은 수정란의 일부를 생검하여 세포를 얻어내는 과정은 다음과 같다 (Figure 1).

### 1) Making a hole in zona pellucida (투명대)

우선 난자나 수정란을 둘러싸고 있는 투명대를 열어준다.

#### (1) Acidified Tyrode's solution

pH 2.2~2.4의 산성을 이용하여 배아의 투명대를 녹이는 방법으로 현재 가장 널리 사용되고 있으며, 난자의 극체를 생검하는 데는 적합하지 않다.

#### (2) Mechanical dissection (partial zona dissection: PZD)

물리적인 방법으로 "V" 또는 "X" 자 형태의 투명대 절개를 하는 방법으로 극체를 생검하는 데 많이 사용된다.

#### (3) Laser hatching

사용이 간단하며 구멍의 크기를 정확히 조절할 수 있고, 수정란에 해를 줄 가능성이 적다. 최근 그 사용이 증가되고 있다.

## 2) Cell Biopsy

### (1) 극체 생검 (Polar body biopsy)

감수분열의 결과로 형성된 극체는 배아발달에 필수적 요소가 아니므로 생검하여 진단에 활용될 수 있다. 극체의 염색체나 유전자 상태는 난자의 것과 상호 관련되므로 극체를 생검하여 유전검사를 시행하면 난자의 상태를 진단할 수 있다. 난자로부터 제 1극체만 생검하거나 제 1극체와 함께 수정 후 제2 감수분열이 완성된 후 제 2극체를 생검하여 진단의 정확도를 증가시킬 수 있다. Verlinsky 등<sup>36</sup>은 다양한 단일 유전자 질환에서 채취된 난자 98%에서 성공적으로 제 1, 제 2극체 생

검을 통한 착상전 유전진단을 보고하였다. 그러나 난자, 즉 모계에서 유래되는 질환에만 적용이 가능하고, 2개의 극체를 모두 얻는데 작업량이 많다는 단점이 있다.

### (2) 난할 과정 배아의 할구 생검 (cleavage-stage blastomere biopsy)

현재 가장 많이 이용되는 방법으로서 수정란의 할구를 진단에 이용하므로 모계나 부계 어느쪽에서 유전되든지 사용할 수 있다.<sup>37</sup> 수정란의 compaction이 완전히 일어나면 세포를 분리하기가 어려우므로 수정 3일째 (6~10 세포기) 오전에 시행한다. 이 시기에는 생검 후에 세포의 회복이 빠르며, 할구 사이에 junction이 잘 발달하여 자궁에 이식할 때 수정란의 구조를 그대로 잘 유지하기 때문에 가장 널리 사용된다. 8세포기 수정란에서 할구 1~2개를 생검해 내어도 inner cell mass와 trophoctoderm 세포의 비율이 정상으로 유지되며, 남은 할구세포로부터 정상적으로 온전한 개체가 발생한다는 사실은 이미 생쥐와 사람에서 증명되었으며,<sup>1</sup> 생검된 배아의 착상 능력에도 차이가 없다.<sup>38</sup> 방법은 acid Tyrode's solution 또는 laser hatching으로 투명대 (zona pellucida)에 구멍을 뚫은 후에 biopsy pipet으로 할구를 흡인 (aspiration)하거나 액체를 이용하여 밀어내는 방법 (extrusion)으로 할구를 분리해 낸다. 이 방법의 단점으로는 1~2개의 세포만 진단에 이용된다는 제한이 있고, 배아의 모자이시즘을 진단하기 힘들며, 체외수정 시술 기간 내에 metaphase의 염색체 배열을 얻기가 어렵다는 점이다. 현재, acid Tyrode's solution에 의한 zona drilling 및 blastomere aspiration 방법이 가장 널리 사용되고 있으며, 약 97%의 배아에서 성공적으로 할구 생검이 된다.<sup>39</sup>

### (3) Trophoctoderm biopsy

수정란이 발생하여 blastocyst stage에 도달하면 inner cell mass와 trophoctoderm으로 나뉜다. Trophoctoderm은 주로 태반을 형성하며 태아형성에는 직접 관여하지 않으므로 trophoctoderm 세포를 여러 개 떼어내어도 태아에게 해를 주지 않는다는 장점이 있다. 방법은 발생 5~6일째에 blastocyst

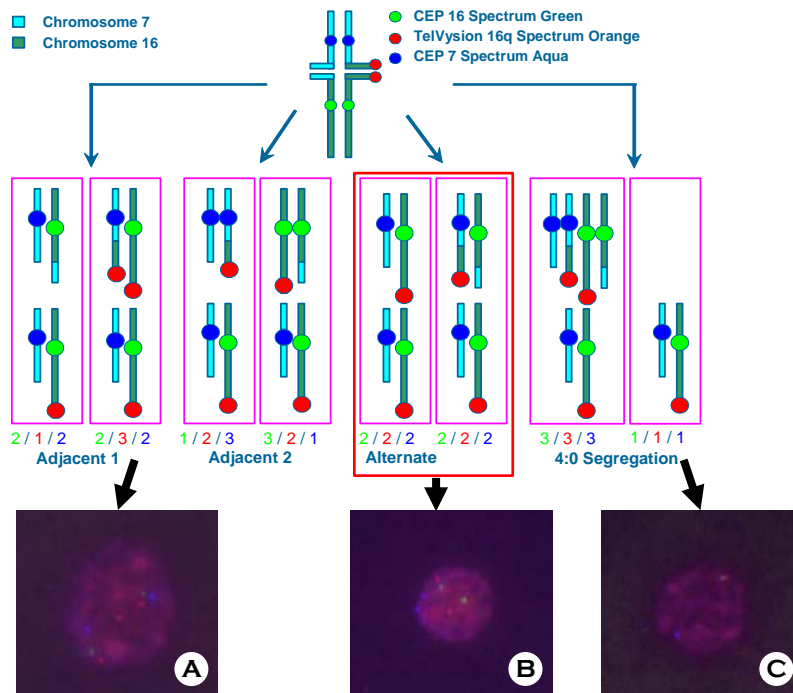
를 고정하고 inner cell mass의 반대편에 피펫으로 incision을 형성한 후 6~24시간 후 일부 trophoctoderm이 herniation되면 그 일부를 생검한다. 10개 이상의 많은 세포의 생검이 가능하다. 10개 정도까지의 세포 생검은 포배기 배아의 생존을 나타내는 hCG 생성에 큰 영향이 없다.<sup>40</sup> 5~20개의 세포를 얻으면 metaphase chromosome spread를 얻기가 훨씬 수월하여 더욱 정확한 유전진단이 가능하다. 최근 trophoctoderm biopsy로 2~6개의 세포를 생검하여 착상전 유전진단 후 포배기 배아 이식으로 임신에 성공한 예들이 보고된 바 있다.<sup>41,42</sup> 그러나 단점으로는 수정란의 약 36~66%만이 blastocyst에 도달하므로 사용 가능한 수정란이 수적으로 제한된다는 점이며,<sup>43</sup> 태아와 태반세포 사이에 염색체 상태가 다른 confined placental mosaicism인 경우에는 태반세포로 진단해도 태아의 유전자 상태를 정확히 알 수 없다는 점, 그리고 곧 이식해야 하므로 유전진단을 할 수 있는 시간이 짧다는 점이다.

## 3. 단일세포에서의 유전학적 분석

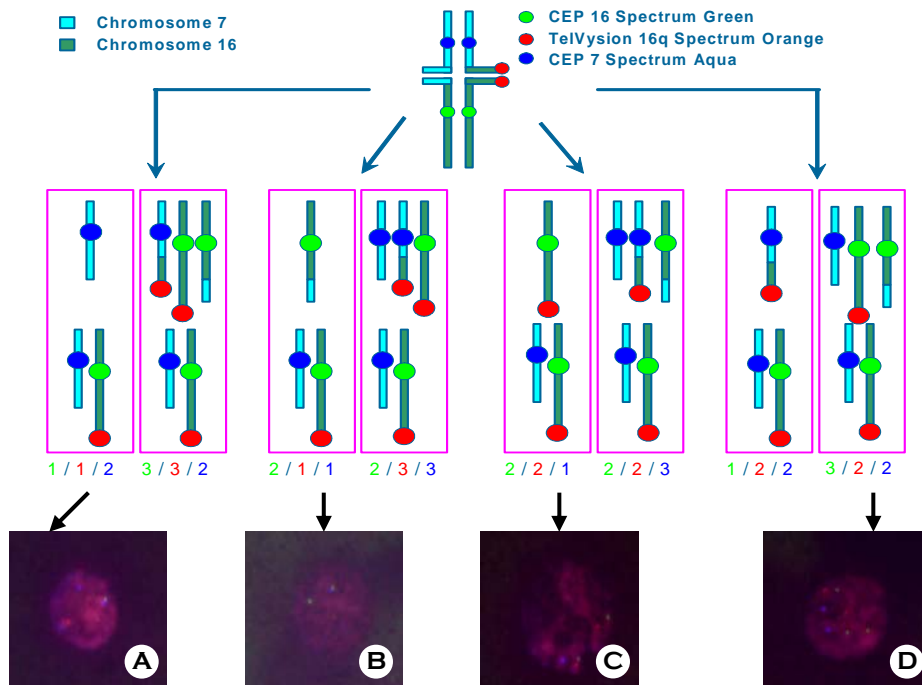
### 1) Fluorescent in situ hybridization (FISH)

염색체의 구조적 이상이나 고령임신, 성염색체 이상 등에서 염색체의 이수성 (異數性, aneuploidy)을 진단하기 위해서는 FISH를 이용한다.<sup>44,45</sup> PGD에서는 생검된 할구세포에서 metaphase의 염색체를 얻기가 힘들기 때문에 FISH를 이용하면 interphase nucleus의 염색체에서 발광체의 signal을 관찰하여 염색체의 수를 진단할 수 있으므로, 염색체의 수적 이상 (aneuploidy), X-linked 유전질환에서 sexing 등을 판정할 수 있다. 일반적으로 FISH는 각 염색체에 특이적인 반복서열 (repetitive satellite)의 DNA probe를 사용한다. 각각 다른 색깔의 형광 signal을 내는 repetitive satellite probe를 사용하면 여러 개의 DNA target을 동시에 관찰할 수 있다 (Figure 2). Red (tetra-rhodamine isothiocyanate: TRITC), green (fluorescein isothiocyanate: FITC), blue (AMCA) 형광물질만 FISH에 적합하기 때문에 두 개의 형광물질 혼합비율에 따라 다른 색상이 나타날 수 있다. 이렇





**Figure 2a.** FISH probes and signal in 2:2 or 4:0 segregations in patients with 46,XX,t(7;16)(q22.1;q23.2) **A)** adjacent-1 segregation showing 3 orange, 2 green and 2 aqua signals, **B)** alternate segregation (balanced) showing 2 orange, 2 green and 2 aqua signals, **C)** 4:0 segregation showing 1 orange, 1 green and 1 aqua signal.



**Figure 2b.** FISH probes and signals in 3:1 segregation in the same patient as in Figure 2a. **A)** showing 1 green, 1 orange and 2 aqua signals, **B)** showing 2 green, 1 orange and 1 aqua signals, **C)** 2 green, 2 orange and 1 aqua signals **D)** 3 green, 2 orange and 2 aqua signals.

게 하면 휴지기 세포에서 X, Y, 13, 16, 18, 21, 22 등의 염색체를 동시에 진단할 수 있다. 더 많은 염색체에 대해 진단하기 위해서는 FISH를 2~3회 반복하여 이용할 수 있다. 균형 전좌를 가진 생식세포가 감수분열을 할 때 흔히 2:2 segregation이 많이 일어나서 adjacent type 1이나 adjacent type 2로 분리되면 불균형 염색체를 가진 배아가 형성되고, alternate segregation을 할 때만 정상 염색체 또는 균형 전좌 염색체를 갖는 배아가 형성된다 (Figure 2a). 3:1 segregation은 일반적으로 빈도가 적고 생존하기 힘들다, 특정 염색체의 균형 전좌에서는 비교적 흔히 발생하며 태아가 생존하여 기형을 갖고 태어날 수 있어 진단 과정에서 포함되어야 한다 (Figure 2b). PGD 시행 전에 probe를 계획하고 환자의 lymphocyte를 이용하여 FISH probe의 efficiency를 측정 후 할구세포에서 PGD를 시행한다. FISH의 제한점으로는 signal이 superimpose되는 경우 판독상의 문제, 사용할 수 있는 color의 제한, 그리고 배아의 mosaicism의 가능성이 있다는 점이다. 배아의 mosaicism은 약 25%에서 나타나며, 10~25%는 chaotic 형태로 나타난다. 이 시기의 비정상 할구는 정상 apoptosis 과정일 수도 있다. FISH의 오진율은 약 5~10% 정도로 보고되고 있다.<sup>46</sup>

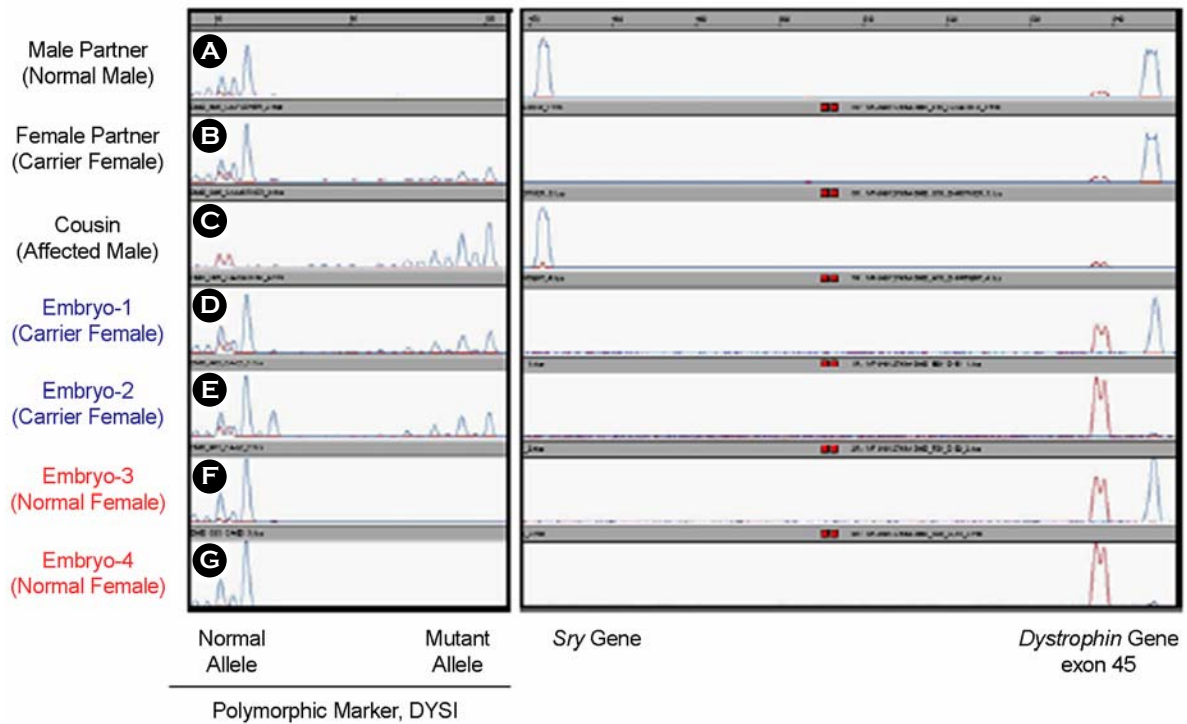
## 2) Polymerase chain reaction (PCR) 및 관련 기법

일반적으로 단일 유전자 질환에서는 PCR로 진단한다. 돌연변이가 일어난 특정 유전자 부위 전후에 충분한 길이의 염기서열을 알고 있으면 2개의 oligonucleotide sequence를 선택하여 PCR로 유전자를 증폭할 수 있다. PCR primer가 없는 경우에는 X-연관 열성질환에서 성 (gender)을 선택하기 위하여 FISH를 시행하기도 한다. PCR을 이용한 착상전 유전진단에서의 유의점으로는, 적은 수의 세포를 증폭하여 진단을 하게 되므로 contamination의 문제, PCR 반응의 특이성 문제, allele drop out (ADO)의 문제 등을 들 수 있다. Contamination을 방지하기 위해서는 PCR 반응 장소를 청결히 유지하고 시약을 구분하여 분주하여 사용하여야 하며, 비특이적

증폭을 방지하고 정확성을 높이기 위하여 hemi-nested 또는 nested primer를 사용하여 2단계의 PCR을 시행한다. 즉, 첫 단계의 PCR에서 일단 증폭한 fragment의 내부에 2단계 PCR의 primer들이 결합할 수 있도록 하여 원하는 부위만을 증폭하는 방법으로, 단일 유전자 질환에서 PCR을 이용한 착상전 유전진단에서 대부분 적용하고 있다.<sup>15</sup> 또한 단일 유전자 질환에서는 ADO으로 인해 심각한 오진이 될 수 있으므로 ADO를 줄이는 것이 중요하다. 일반적인 heterozygotic cell의 allele 중 한 allele에서는 약하게 증폭이 일어나고 다른 allele에서 많이 증폭되는 경우를 preferential amplification (PA)라고 하며, PA가 극단적으로 되는 경우 즉, 한쪽 allele만 증폭이 되고, 다른 쪽은 증폭이 거의 안되면 ADO라고 한다. ADO rate를 줄이기 위한 방안으로 할구 2개를 생검하거나 최근에는 대부분 민감도가 높은 fluorescence PCR 기법, linked polymorphic marker를 이용하여 multiplex PCR을 이용하여 진단한다.<sup>47,48</sup> PCR 실패율은 약 5~10%에서 있고, 90~95%의 efficiency는 적절한 것으로 볼 수 있다.

### (1) Multiplex PCR

PGD에서는 단일세포를 이용하므로 PCR 증폭시 여러 유전자를 조사하기에는 그 양이 제한적이다. 그러나 multiplex PCR을 사용하여 2개 이상의 여러 유전자를 동시에 조사할 수 있다 (Figure 3).<sup>17,49</sup> 여러 개의 서로 관계없는 primer set를 혼합하여 한번에 PCR을 시행하는 방법으로 이때에는 primer들과 또는 PCR product들 사이에 상호작용이 없어야 한다. 첫 번째 PCR을 할 때 다른 종류의 primer 쌍을 여러 개 넣어 증폭하고, 2번째 PCR에서는 sample을 나눈 후에 각기 다른 nested primer 쌍을 이용하여 증폭한다. 이 복합반응이 잘 일어나도록 primer들의 상대적인 농도, annealing temperature, reaction buffer를 최적화 시켜야 한다. 검사 시간이 6~8시간으로 짧으므로 PGD를 시행하는데 적합하다. 또한 multiplex PCR은 ADO 문제를 해결하는데 도움이 되는데, 병을 유발하는 돌연변이 유전자, 그리고 이와 인접한 linked marker의 polymorphism을 같이 조사



**Figure 3.** Electropherogram of the multiplex fluorescent PCR of dinucleotide repeat marker (DYSI), *Sry*, and *dystrophin* exon 45 for PGD of Duchenne muscular dystrophy. **A** (top): the unaffected male partner; **B**: the carrier female partner; **C** the affected son (no dystrophin gene peak); **D** and **E**: the carrier female embryos (with mutant liked marker and dystrophin gene peak); **F** and **G**: the normal female embryos (이형송 등<sup>17</sup>, 2005).

하면 이 두 곳에서 ADO가 동시에 일어날 확률은 매우 적으므로, 돌연변이가 없는 것인지 ADO가 발생한 것인지 정확히 진단이 될 수 있다. 이것은 특히 autosomal dominant 질환이나 compound heterozygote의 진단에 중요하다.

**(2) Fluorescent PCR**

일반적인 PCR 기법은 정성적인 방법이므로 비슷한 크기의 product를 구별할 수 없다. Fluorescent PCR에서는 한 primer 대신에 형광물질이 부착된 fluorescent oligonucleotide를 사용하여 증폭시켜 laser analysis system으로 그 product를 감지해 내므로 fluorescent PCR의 민감도는 기존 PCR의 약 1000배 이상이 된다. 이 방법으로 cystic fibrosis의 착상전 유전진단에서 정상 allele과 3 bp가 결손된 Δ508 allele을 정확히 구별해 낼 수 있었다.<sup>8</sup> Fluorescent PCR을 사용하면 민감도가 높아서 ADO이나 preferential amplification (PA) 문제를 해결할 수 있다.

즉, PA 경우에도 peak를 발견할 수 있어 PCR에서 ADO가 발생하여 오진되던 문제가 많이 해결되었다.

**(3) Whole genome amplification**

PGD에서 때로는 2개 이상의 돌연변이를 진단해야 하는데 단일세포를 사용하므로 적은 DNA량이 문제가 된다. 이것을 해결하기 위하여 primer extension preamplification (PEP), Degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR) 등이 개발되었다. 기존 PCR에서 사용하는 specific primer 대신에 15-base random oligonucleotide primer 또는 DOP primer를 이용하면 low stringency 조건에서 DNA 전체에 걸쳐 결합하므로 다량의 증폭을 얻을 수 있다. 이것은 PGD에서 comparative genomic hybridization (CGH)나 microarray를 하기 전에 반드시 필요한 방법이다.

최근에는 바이러스에서 유래한 phi 29 polymerase

와 random hexamer primer를 이용한 DNA 증폭방법인 multiple displacement amplification (MDA)를 이용한 착상전 유전진단도 확립되어 시행되고 있다. 일반 PCR로 증폭이 어려운 경우에서 MDA 기법을 이용하여 충분한 양의 DNA를 확보한 후 fluorescent PCR 등을 시행하면 증폭 성공율을 향상시킬 수 있다.<sup>50,51</sup>

### 3) Comparative genomic hybridization (CGH)

PGD-FISH에서는 대상 염색체 몇 개만을 검사하므로 검사하지 않은 다른 염색체의 이상 여부를 알 수 없다는 제한점이 있다. CGH는 reference DNA (digoxigenin-labeled)와 test DNA를 (biotin-labeled) 정상 중기 염색체에 동시에 경쟁적으로 hybridization시키는 방법으로, 상대적인 DNA copy 수의 비율을 측정할 수 있다 (Figure 4), test DNA의 염색체 결실 또는 중복, 이수성 등이 있으면 Green-to-red fluorescence의 차이로 나타나므로 이를 진단할 수 있다.<sup>50</sup> haploidy나 polyploidy, 균형 전좌는 진단할 수 없지만, 전체 염색체에 대해서 aneuploidy screening을 할 수 있는 장점이 있어, 포괄적 진단을 목적으로 CGH 기법을 이용한 착상전 유전진단이 시행되고 있다.<sup>51</sup> 실제로 5 panel의 FISH probe를 이용한 경우보다 CGH를 이용한 경우 임신율과 착상율이 높은 경향을 보였고, 5 probe 또는 9 probe로 놓칠 수 있는 38%, 25%의 aneuploidy를 발견할 수 있었다.<sup>52</sup> 단점은 시간 및 인력이 많이 소요된다는 점이다. 일반적으로 체외수정에서는 난자 채취 후 5일 후에는 수정란을 자궁 안에 이식해야 하는 시간적 제한이 있는데, CGH는 DNA amplification, labeling 및 중기 염색체를 template로 하여 hybridization시켜 CGH를 완료하기까지 5~6일이 소요되는 문제점이 있다. 만약 제 3일의 8세포기 수정란에서 할구세포를 생검하여 CGH를 시행하면 배아를 동결 보존해야 하는 단점이 생긴다. 그러나 난자 채취일에 극체를 생검하면 CGH를 수행해도 4~5일 만에 이식하는 것이 가능하다. Wells 등<sup>53</sup>은 극체를 생검하여 얻은 소량의 DNA를 whole genome amplification으로 증폭한 후 CGH를 시행하

고, 여분의 DNA로 single gene mutation까지 진단하였다. Voullaire 등<sup>54</sup>은 CGH를 이용한 할구세포의 분석 결과, 일반적인 FISH panel에 포함되지 않는 다른 염색체들의 이상이 발견되고, diploid embryo의 비율이 FISH를 이용한 경우보다 낮았으며 (25%), 또한 FISH로 발견될 수 없는 partial aneuploidy가 발견됨을 보고하였다. 즉, 수정란에서 post-zygotic breakage로 인하여 염색체의 partial gain이나 loss가 발생할 수 있는 것이다. 따라서 CGH 방법이 안정적으로 확립되면 지금까지 염색체의 일부만을 검사하던 FISH의 한계점을 극복하여 전체 염색체에 대한 포괄적인 진단이 가능할 것이다. 시간적 문제와 정확성을 극복하기 위해 microarray 기법을 도입한 microarray-CGH 기법도 연구되고 있으며, 이는 전체 염색체 각각에 특이적인 DNA sequence로 이루어진 microarray를 glass slide에 부착시키고, 이를 template로 하여 CGH를 시행하는 방법으로, 과정에 걸리는 시간을 단축할 수 있다.<sup>55</sup> 최근 microarray-CGH 방법을 이용하여 전체 염색체에 대한 이수성 진단이 보고된 바 있다.<sup>56</sup>

### 4) 할구세포 생검 후 배아의 동결 보존

착상전 유전진단 후 이식을 하고 남은 정상 잉여 배아를 동결 보존할 수 있으나, 일반적으로 배아의 용해 후 생존율은 매우 낮으며,<sup>57</sup> 동결-용해 방법을 적정화 하여 그 생존율을 75% 정도로 증가시킬 수 있음이 보고된 바 있다.<sup>58</sup>

### 5) DNA-Microarray

동시에 수천 개의 유전자에 대해 진단할 수 있는 방법으로 특정 DNA fragment들을 array시킨 chip으로 test DNA를 진단할 수 있다.<sup>59</sup> 2가지로 이용될 수 있는데 하나 이상의 돌연변이가 원인이 되는 유전질환 (cystic fibrosis, thalassemia 등)에서 돌연변이를 직접 진단하거나, comparative genomic hybridization에서 이용될 수 있다 (microarray-CGH). 알려진 돌연변이에 대한 Short oligonucleotide probe를 test DNA를 hybrid시키는 방법, mini-sequencing 방법 등이 있다.

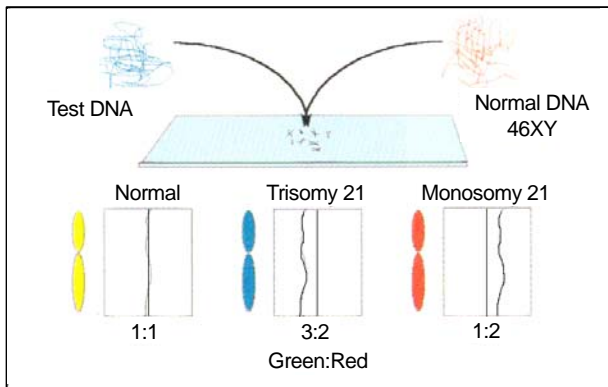


Figure 4. A schematic diagram of CGH procedure

6) Mini-sequencing

정상 염기서열을 고정한 후 test DNA를 hybridize 하고 이를 template로 하여 labeled ddNTP로 hybridization시켜 가며 sequencing을 하는 방법이다. 방법은 SNP (single nucleotide polymorphism)의 신속한 진단에 유용하다. SNP는 linked marker로 이용될 수도 있으며, microsatellite보다 흔히 발견되며 짧은 PCR fragment로 발견되는 장점이 있는데, 단일세포의 증폭시에는 짧은 DNA fragment가 진단에 더 효율적이다. 착상전 유전진단에서는 적은 수의 돌연변이 부위를 동시에 분석하게 되므로 mini-sequencing이 유용하다. Fiorentino 등<sup>60</sup>은 23종의 단일 유전질환에서 250주기의 PGD 시행 결과, 대부분 linked polymorphic marker를 이용한 multiplex fluorescent PCR과 mini-sequencing 기법을 함께 이용하여 정확하고 효율적인 진단을 보고하였다.

착상전 유전진단의 임상 결과

1. 단일 유전자 질환에서 착상전 유전진단의 결과

가장 흔히 시행되는 질환으로는 상염색체 우성 유전질환으로 Myotonic dystrophy, Huntington's disease 가 있고, 상염색체 열성 유전질환으로 cystic fibrosis,  $\beta$ -thalassemia, SMA, X-연관 유전질환 중에는 DMD, 취약 X 증후군 (fragile X) 등이 있다. 유전질환의 PGD 결과 전반적으로 할구 생김은 약 98%에서 가

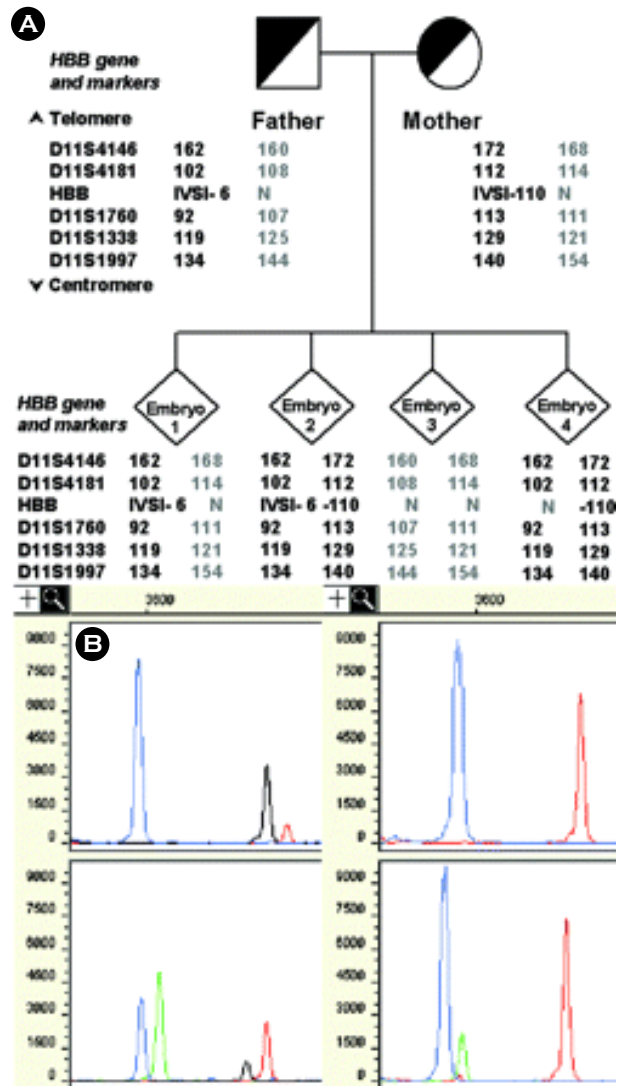


Figure 5. PGD for  $\beta$ -thalassemia performed by using the minisequencing technique. A) Pedigree of a couple carrying  $\beta$ -thalassemia mutations. Informative STR markers are ordered from telomere to centromere. B) The mutations of interest are IVSI-110G-A and IVSI-6T/C. Color is assigned to ddNTPs (green/A, black/C, blue/G, red/T). The blue peak represents the normal allele (wild-type base G), the green peak (mutant base A) the mutated allele. Embryo 1 (upper left) is a carrier for ISI-6 T/C mutation (showing black peak). Embryo 3 (upper right) is a normal; embryo 2 (lower left) is compound heterozygote for the 2 mutations.; Embryo 4 (lower right) is also affected, although the minisequencing result shows heterozygosity for mutation IVSI-110 G-A (linked STR markers highlights an ADO of affected allele) (Fiorentino F, et al.<sup>60</sup> 2006).

능하여, 생검된 할구의 약 86%에서 진단이 가능하였으며, laser drilling이 증가되고 있고, trophoctoderm 생검도 약 4% 정도에서 시행된다. 임상적 임신율은 이식 주기당 27%로 보고되었다.<sup>5</sup>

1)  $\beta$ -thalassemia

Fiorentino 등<sup>60</sup>은 부부가 각각 다른 HBB gene mutation을 가진 보인자에서 linked STR (short tandem repeat) marker를 함께 이용하여 multiplex PCR과 minisequencing으로 PGD를 시행하였으며 ADO로 인한 오진을 줄일 수 있었다 (Figure 5).

2) DMD (Duchenne Muscular Dystrophy)

부인이 Dystrophin gene mutation을 갖고 있는 부부에서 PGD를 시행하였으며, duplex-nested PCR과 dystrophin gene exon 45, Y specific Sry 및 poly-

morphic marker로 DYS1 부위를 동시에 증폭시키는 multiplex fluorescent PCR을 이용하여 PGD를 시행하였다. 이러한 방법으로 dystrophin gene mutation과 mutant allele을 함께 분석함으로써 ADO를 줄이고 보인자와 정상 수정란도 구분할 수 있다.<sup>17</sup>

3) Ornithine transcarbamylase deficiency

요소 회로에 관여하는 효소로, 결핍시에는 고암모니아혈증을 초래한다. X-linked co-dominant 질환으로 유전자는 Xp21.1에 위치한다. 이환된 남아의 경우 생후 몇 주안에 사망하며, heterozygous 여성의 경우 증상이 없는 경우부터 심한 증상을 나타내는 경우도 있다. 부인이 OTC 결핍증 보인자인 부부에서 duplex-nested PCR 및 RFLP 방법으로 PGD를 시행하여 건강한 남아를 출산하였다 (Figure 6).<sup>61</sup>

4) Fanconi anemia with HLA typing

Fanconi anemia에서 극체 생검 및 할구 생검을 하여 PGD를 시행하면서, linked marker를 함께 이용하여 mutation을 진단하고, 환아와의 HLA matching 및 aneuploidy 진단까지 함으로써 정상적인 둘째 아기의 출산이 가능하였으며, stem cell의 이식이 가능하였다 (Figure 7).<sup>62</sup>



Figure 6. Agarose gel electrophoresis of the restriction fragment length polymorphism (RFLP analysis with *bcII* restriction enzyme in the PGD for OTC deficiency. In normal embryos (No. 1, 2, 3, 8), the 218 bp PCR products were not digested with *bcII* (이형송 등<sup>61</sup>, 2004) (M: mother, NC: normal control).

2. 염색체 전좌에서 착상전 유전진단의 결과

염색체 전좌를 가진 환자에서 높은 자연유산의

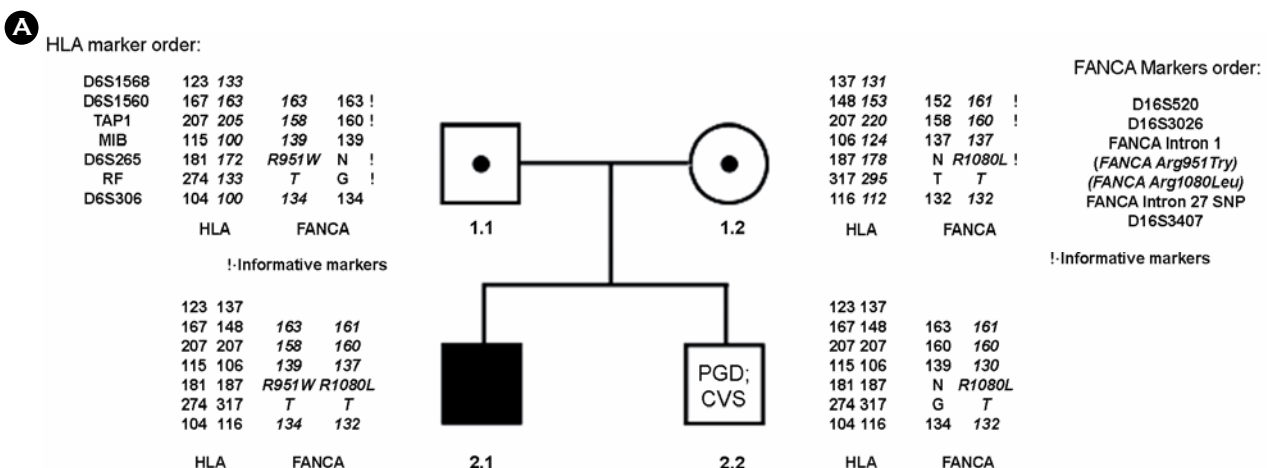


Figure 7. Preimplantation HLA typing combined with aneuploidy testing and PGD for Fanconi anemia complementation group A. HLA haplotype analysis based on parental and affected child's genomic DNA testing (Rechitsky,<sup>62</sup> 2006).

위험을 착상전 유전진단으로 감소시킬 수 있다.<sup>63</sup> 임상적 임신율은 주기당 28.6% (이식 주기당 31.3%) 정도로 보고된 바 있으며, 특히 전좌에서는 자연유산율이 87~95.8%로 높았던데 비해, 착상전 유전진단 후 16.7%로 현저히 감소 되었다.<sup>64</sup> ESHRE PGD Consortium Data에 의하면 평균 14개의 난자를 채취하여, 91~92%의 성공적인 할구 생검이 이루어졌고, 이식가능한 배아의 비율은 약 25%였으며, 전반적인 임상적 임신율은 난자 채취당 14~15% (이식 주기당 21~24%), 유산율은 14%였다. 각각의 임신율을 보면, 로벳슨전좌에서 18~20% (이식 주기당 25~26%), 상호 전좌에서 12~13% (이식 주기당 18~19%)로 보고되고 있다.<sup>5</sup> 착상전 유전진단시 얻어진 수정란 중 염색체적으로 균형적인 배아의 비율은 전좌에서 약 23~25% 정도밖에 되지 않으며,<sup>5,65</sup> 로벳슨 전좌에서는 균형적인 배아가 좀 더 많아 약 32% 정도이지만, 상호전좌에서는 19~21%로,<sup>5</sup> 자연임신이 시도될 경우 불균형적인 염색체로 인한 높은 유산율을 예상할 수 있다.

### 3. 염색체 이수성의 선별검사 (aneuploidy screening)

고령임신, 반복적 착상 실패, 반복 자연유산, 성염색체 모자이시즘 등에서는 배아의 염색체 이수성 위험이 높다. 따라서 착상전 유전진단으로 염색체 이수성의 선별검사를 하여, 염색체 이상과 관련된 자연유산율을 감소시키고, 임신유지율을 높일 수 있다.<sup>66</sup> PGD consortium data에서 aneuploidy screening시 정상 염색체를 갖는 배아의 비율은 34%, 임상적 임신율은 이식 주기당 24%였다.<sup>5</sup> 염색체 이수성을 갖는 배아도 20%는 blastocyst까지 발달되므로 외형적인 배아 선별에는 한계가 있으며, 35세 이상 고령에서는 염색체 이수성 배아가 약 50~60%로 높아, PGD로 유산율을 감소시키고 임신 유지율과 착상율을 증가시킬 수 있다. Munne 등<sup>67</sup>은 염색체 이수성 선별을 위한 PGD 결과 외형적으로 좋은 배아라도 35세 미만에서는 44%만이 염색체적으로 정상이었고, 35~37세에서 42%, 38~

40세에서는 30%, 41세 이상에서는 21%만이 정상 염색체를 나타내어, 나이에 따라 급격히 정상 배아의 비율이 감소되므로 고령에서 염색체 이수성에 대한 PGD가 유용함을 보고하였다. 고령에서 염색체 이수성 선별을 통해 착상율 증가의 효과가 있으며 (18% vs 11%), 특히 9개 이상의 FISH probe를 이용하여 (13, 15, 16, 18, 21, 22, X, Y 및 1, 7, 14 or 17), PN이 적어도 8개 이상인 경우에서 착상율 향상의 효과를 극대화 할 수 있었다.<sup>68</sup> 반복적 착상 실패에서도 배아의 염색체 이수성이 35.7% 정도로 나타나며, 염색체 이수성에 대한 착상전 유전진단으로 임신율을 향상시킬 수 있다.<sup>31</sup>

그러나 염색체 이수성의 선별을 위한 착상전 유전진단의 효과에 있어서는 아직 논란의 여지가 많은 상태이다. 최근 Mastenbroek 등<sup>69</sup>은 35~41세의 환자에서 PGS를 시행한 군과 체외수정만 시행한 군간에 착상율에 유의한 차이가 없었고, 임신유지율 및 출산율 (24% vs. 35%)은 PGS군에서 더 낮은 결과를 보고하였고, Staessen 등<sup>70</sup>도 포배기 배아 이식에서 염색체 이수성 선별을 한 군과 하지 않은 군간에 착상율 (17% vs. 11%), 임신유지율 (24% vs. 26%)에 차이가 없다고 하였다. 이에 대해 Verlinsky 등<sup>71</sup>은 이수성 선별 후에 착상율이 7.2%에서 34.8%로 증가되고, 유산율은 72%에서 26.9%로, 출산율은 27.9%에 비해 65.7%로 증가됨을 보고하면서, 적절한 할구 생검방법, 적절한 FISH probe 사용과 진단의 정확성이 중요하다고 하였다. 따라서 선별적인 환자군에서 효율적인 FISH 기법을 이용하면 특히 고령임신 등에서는 효과가 있을 것으로 생각되며, 추후 더 많은 전향적인 연구가 필요할 것이다.

한편, 성염색체 이상에서는 난자나 정자가 생성되기 어려우나 간혹 얻어지는 경우가 있고 특히 모자이시즘에서 가능하다. 클라인펠터 증후군 (47, XXY)의 경우 수술적 고환내 정자채취술을 통해 정자가 채취될 수 있어 보조생식술의 시도가 증가되고 있는데, 이 경우 채취되는 정자의 성염색체 및 상염색체 이수성 위험이 증가되어 배아의 염색

**Table 3.** Congenital malformations after preimplantation genetic diagnosis

Babies with malformation	17/426 (4%)
Major	
Absence of corpus callosum	1 singleton
Hemangioma	2 twins
Bilateral cryptorchidia	1 triplet
Inguinal hernia	1 twin
Unilateral cryptorchidia	1 singleton
Cleft lip unilateral	1 singleton
Esophageal atresia	1 twin
Omphalocele	1 twin
Pulmonary stenosis	1 singleton
Left ventricular hypoplasia syndrome, aorta stenosis	1 singleton
Minor	
Congenital hip luxation	2 singletons
Cranial asymmetry	1 twin
Kidney and bladder problems, mental retardation	1 singleton
Nephromegalia	1 twin
Pre-auricular tags	1 singleton

(from ESHRE consortium data collection VI, 2007)

체 이상이나 모자이시즘이 증가되는 것으로 보고되고 있으며, 따라서 착상전 유전진단으로 배아의 염색체 이수성을 예방하여 효율적인 시술을 할 수 있다.<sup>32</sup>

#### 4. 진단의 오류

단일세포의 PCR 과정에서 오류가 있을 수 있고, 배아의 모자이시즘 가능성 등이 오류의 원인이 될 수 있다. 전반적인 진단 오류는 약 2% 정도로 보고되고 있다.<sup>5</sup> FISH에서는 전좌에서 3:1 segregation을 구분하지 못하거나 배아의 모자이시즘으로 진단 오류가 발생할 수 있으며 1~10% 정도로 보고된다.<sup>65</sup>

#### 5. PGD의 산과적 합병증 및 선천성 기형

PGD 후 임신된 경우에서 태아기형의 발생율은 4% 정도로 (Table 3), 일반적인 ICSI에서의 경우와 유사하여,<sup>5</sup> 할구 생검 등의 과정이 태아 발달에 해를 주지는 않는 것으로 생각된다.

#### 결론

착상전 유전진단 (PGD)은 유전병이 있는 가계나 염색체 이상을 가진 부부에서 유전병에 이환된 환자의 출생이나 염색체 이상과 관련된 기형아 또는 습관성 유산을 예방할 수 있는 매우 효과적인 방법이다. PGD의 적용이 가능한 단일 유전질환의 종류가 확대되고 있고, 그밖에 유전적 악성 소인을 갖는 late onset disease 또는 HLA typing을 하여 골수 세포 이식을 가능케 하는 등 다양한 경우에서 시도되고 있다. 염색체 전좌 등의 염색체 구조적 이상이 있는 습관성 유산의 경우 PGD로 유산율을 현격히 감소시킬 수 있다. 또한 보조생식술시 염색체 이수성에 대한 PGD로 그 효율을 증대시키는 일환으로 이용되고 있으며, 아직 그 효용성에 대해서는 논란이 있으나, 선별적인 환자에서 적절한 방법으로 시행하여 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 단일세포를 이용한 진단 기법의 발전으로, 소량의 DNA로도 여러 염색체나 유전자에 포괄적 진단이 가능해짐으로써, PGD의 진단 오류를 줄이고 더욱 정확하고 안전한 기법으로 발전되고 있다.

#### 참고 문헌

1. 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(6): 708-14.
2. Griffin DK, Handyside AH, Penketh RJA, Winston RML, Delhanty JDA. Fluorescent in situ hybridization to interphase nuclei of human pre-implantation embryos with X and Y chromosome specific probes. Hum Reprod 1991; 6: 101-5.



3. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768-70.
4. Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Lifchez A, Storm C, Kuliev A, et al. Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body fluorescent in situ hybridization analysis. *Fertil Steril* 1996; 66: 126-9.
5. Sermon KD, Michiels A, Harton G, Moutou C, Repping S, Scriven PN, et al. ESHRE PGD consortium data collection VI: cycles from January to December 2003 with pregnancy follow-up to October 2004. *Hum Reprod* 2007; 22(2): 323-36.
6. Handyside A, Lesko J, Tarin J, Winston R, Hughs M. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1992; 327: 905-9.
7. Ao A, Wells D, Handyside A, Winston R, Delhanty J. Preimplantation genetic diagnosis of inherited cancer: familial adenomatous polyposis coli. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15: 140-4.
8. Findlay I, Ray P, Quirke P, Rutherford A, Lilford R. Allelic drop-out and preferential amplification in single cells and human blastomeres: implications for preimplantation diagnosis of sex and cystic fibrosis. *Hum Reprod* 1995; 10(6): 1609-18.
9. Dreesen J, Jacobs L, Bras M, Herbergs J, Dumoulin JC, Geraedts JP, et al. Multiplex PCR of polymorphic markers flanking the CFTR gene: a general approach for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 391-6.
10. Kuliev A, Rechitsky S, Verlinsky O, Ivakhnenko V, Cieslak J, Evsikov S, et al. Birth of healthy children after preimplantation genetic diagnosis of thalassemias. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 207-11.
11. Kanavakis E, Vrettou C, Palmer G, Tretis M, Mastrominas M, Traeger-Synodinos J. Preimplantation genetic diagnosis in 10 couples at risk for transmitting  $\beta$ -thalassemia major: clinical experience including the initiation of six singleton pregnancies. *Prenat Diagn* 1999; 19: 1217-22.
12. Van de Valde H, Sermon K, De Vos A, Lissens W, Joris H, Vandervorst M, et al. Fluorescent PCR and automated fragment analysis in Preimplantation genetic diagnosis for 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 691-6.
13. Sermon K, Lissens W, Messiaen L, Bonduelle M, Vandervorst M, Van Steirteghem A, et al. Preimplantation genetic diagnosis of Marfan syndrome with the use of fluorescent polymerase chain reaction and the Automated Laser Fluorescence DNA Sequencer. *Fertil Steril* 1999; 71: 163-5.
14. Ray PF, Gigarel N, Bonnefont JP, Attie T, Hamamah S, Frydman N, et al. First specific preimplantation genetic diagnosis for ornithine transcarbamylase deficiency. *Prenat Diagn* 2000; 20: 1048-54.
15. 이형송, 최혜원, 임천규, 민동미, 변혜경, 김진영, 등. Ornithine transcarbamylase (OTC) 효소 결핍증, 수포성 표피박리증 및 lactic acidosis 가계에서 duplex nested PCR 방법을 이용한 착상전 유전진단: OTC 효소 결핍증 가계에서의 정상아 임신 및 출산. *대한산부회지* 2004; 47(4): 708-17.
16. Ray P, Vekemans M, Munnich A. Single cell multiplex PCR amplification of five dystrophin gene exons combined with gender determination. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 489-94.
17. 이형송, 최혜원, 임천규, 박소연, 김진영, 궁미경, 등. 근이영양증에 대한 착상전 유전진단에서 duplex-nested PCR과 fluorescent PCR방법의 효용성. *대한불임학회지* 2005; 32(1): 17-26.
18. Georgiou I, Sermon K, Lissens W, De Vos A, Platteau P, Lolis D, et al. Preimplantation genetic diagnosis for spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Hum Genet* 2001; 108: 494-8.
19. Harper J, Wells D, Piyamongkol W, Abou-Sleiman P, Apeessos A, Ioulianos A, et al. Preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders: experience with five single gene disorders. *Prenat Diagn* 2002; 22: 525-33.
20. De Vos A, Sermon K, De Rijcke M, Goossens V, Henderix P, Van Ranst N, et al. Preimplantation genetic diagnosis for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 429-35.
21. Fiorentino F, Magli MC, Podini D, Ferraretti AP, Nuccitelli A, Vitale N, et al. The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 399-410.
22. Moutou C, Rongieres C, Bettahar-Lebugle K, Gardes N, Philippe C, Viville S. Preimplantation genetic diagnosis for achondroplasia: genetics and gynaecological limits and difficulties. *Hum Reprod* 2003; 18: 509-14.
23. Rechitsky S, Verlinsky O, Chistokhina A, Sharapova T, Ozen

- S, Masciangelo C, et al. Preimplantation genetic diagnosis for cancer predisposition. *Reprod BioMed Online* 2002; 4: 148-55.
24. Zenes MT, Casper RF. Cytogenetics of human oocytes, zygotes, and embryos after in vitro fertilization. *Hum Genet* 1992; 88: 367-75.
25. Delhanty JD, Griffin DK, Handyside AH, Harper J, Atkinson GH, Pieters MH, et al. Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridization. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1183-5.
26. Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993; 8: 2185-91.
27. Marquez C, Sandalina M, Bahce M, Alikani M, Munné S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod BioMed Online*. 2000; 1(1): 17-26.
28. Munné S, Cohen J, Sable D. Preimplantation genetic diagnosis for advanced maternal age and other indications. *Fertil Steril* 2002; 78: 234-6.
29. Munné S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, et al. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod* 1999; 14(9): 2191-9.
30. Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J, et al. chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003; 18: 182-8.
31. Kahraman S, Benkhalifa M, Donmez E, Biricik A, Sertyel S, Findikli N, et al. The results of aneuploidy screening in 276 couples undergoing assisted reproductive techniques. *Prenat Diagn* 2004; 307-11.
32. Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, Michiels A, Van Landuyt L, Devroey P, et al. PGD in 47, XXY Klinefelter's syndrome patients. *Hum Reprod* 2003; 9(4): 319-30.
33. Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, Masciangelo C, Lederer K, Kuliev A. Preimplantation diagnosis for early-onset Alzheimer disease caused by V717L mutation. *JAMA* 2002; 287: 1018-21.
34. Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Storm C, Kuliev A. Preimplantation genetic diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. *JAMA* 2001; 285: 3130-3.
35. Rechitsky S, Kuliev A, Tur-Kaspa I, et al. Preimplantation HLA typing with preimplantation genetic diagnosis. *Reprod BioMed Online* 2004; 6: 488-93.
36. Rechitsky S, Strom C, Verlinsky O, Amet T, Ivakhnenko V, Kukhareno V, et al. Accuracy of preimplantation diagnosis of single-gene disorders by polar body analysis of oocytes. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 192-8.
37. De Vos A, Van Steirteghem A. Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 2001; 21: 767-80.
38. Van de Velde H, De Vos A, Sermon K, Staessen C, De Rycke M, Van Assche E, et al. Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 2000; 20: 1030-7.
39. ESHRE PGD consortium Steering Committee. ESHRE preimplantation genetic diagnosis consortium: Preliminary assessment of data from January 1997 to September 1998. *Hum Reprod* 1999; 14: 3138-48.
40. Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M, Boada M, Carrera M, Santalo J, et al. Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human. *Zygotes* 1997; 5: 351-4.
41. de Boer KA, Catt JW, Jansen RPS, Leigh D, McArthur S. Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF. *Fertil Steril* 2004; 82: 295-8.
42. Kokkali G, Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Jones GM, Cram DS, Stavrou D, et al. Birth of a healthy infant following trophectoderm biopsy from blastocysts for PGD of  $\beta$ -thalassemia major: case report. *Hum Reprod* 2005; 20(7): 1855-9.
43. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998; 69: 84-8.
44. Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review. *Prenat Diagn* 2002; 22: 312-8.
45. Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L, Cohen J. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril* 2000; 73: 1209-18.
46. Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Marquez C, Cohen J. Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Repro BioMed Online* 2003; 4: 223-32.

47. Harton GL, Tsipouras P, Sisson ME, Starr KM, Mahoney BS, Fugger EF, et al. Preimplantation genetic testing for Marfan syndrome. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(9): 713-5.
48. Lee SH, Kwak IP, Cha KE, Park SE, Kim NK, Cha KY. Preimplantation diagnosis of non-deletion Duchenne muscular dystrophy (DMD) by linkage polymerase chain reaction analysis. *Mol Hum Reprod* 1998; 4(4): 345-9.
49. Pertl B, Weitgasser U, Kopp S, Kroisel PM, Sherlock J, Adinolfi M. Rapid detection of trisomy 21 and 18 and sexing with quantitative fluorescent multiplex PCR. *Hum Genet* 1996; 98: 55-9.
50. Buret P, Frydman N, Gigarel N, Kerbrat V, Tachdjian G, Feyereisen E, et al. Multiple displacement amplification improves PGD for fragile X syndrome. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 647-52.
51. 김민지, 이형송, 임천규, 조재원, 김진영, 궁미경, 등. 삼핵산 반복서열 질환인 헌팅톤병, 척수소뇌성 운동실조증, X-염색체 취약 증후군의 착상전 유전진단 방법에 대한 연구. *대한생식의학회지* 2007; 34(3): 179-88.
52. Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Hum Reprod Update* 2005; 11(1): 33-41.
53. Wilton L, Williamson R, McBain J, Edgar D, Voullaire L. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization. *N Engl J Med* 2001; 345: 1537-41.
54. Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williammson and McBain J, et al. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridisation of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2003; 80: 860-8.
55. Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty J, Munné S. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril* 2002; 78: 543-9.
56. Voullaire L, Slater H, Williamson R, Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 2000; 106: 210-17.
57. Hu DG, Webb G, Hussey N. Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridisation. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 283-9.
58. Joricho H, Wilton L, Gook D, Edgar D. A modified cryopreservation method increases the survival of human biopsied cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 2003; 18: 568-71.
59. Kurg A, Tonisson N, Georgious I, Shumaker J, Tollett J, Metspalu A. Arrayed primer extension: solid-phase four-color DNA resequencing and mutation detection technology. *Genet Test* 2000; 4: 1-7.
60. Fiorentino F, Biricik A, Nuccitelli A, De Palma R, Kahraman S, Iacobelli M, et al. Strategies and clinical outcome of 250 cycles of preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders. *Hum Reprod* 2006; 21(3): 670-84.
61. 이형송, 최혜원, 임천규, 민동미, 변혜경, 김진영, 등. Ornithine transcarbamylase 효소 결핍증, 수포성 표피박리증 및 lactic acidosis 가계에서 duplex nested PCR 방법을 이용한 착상전 유전진단: OTC 효소 결핍증 가계에서의 정상아 임신 및 출산. *대한산부인과학회지* 2004; 47(4): 708-18.
62. Rechitsky S. Preimplantation HLA typing with aneuploidy testing. *Reprod Biomed Online* 2006; 12(1): 89-100.
63. Munne S, Morrison L, Fung J, Marquez C, Weier U, Bahce M, et al. Spontaneous abortions are reduced after preconception diagnosis of translocations. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15: 290-6.
64. Lim CK, Jun JH, Min DM, Lee HS, Kim JY, Koong MK, Kang IS. Efficacy and clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis using FISH for couples of reciprocal and Robertsonian translocations: the Korean experience. *Prenat Diagn* 2004; 24: 556-61.
65. 김진영, 임천규, 송인옥, 유근재, 양광문, 한국선, 등. 유전질환 및 염색체 이상의 예방을 위한 착상전 유전진단의 결과. *대한불임학회지* 2002; 29(4): 269-78.
66. Gianaroli L, Magli MC, Fiorentino F, Baldi M, Ferrareti AP. Clinical value of preimplantation genetic diagnosis. *Placenta* 2003; 24: S77-S83.
67. Munne S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage stage embryos. *Reprod Biomed online* 2007; 15(5): 628-34.
68. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, et al. *Reprod Biomed Online* 2003; 7(1): 91-7.
69. Mastenbroek S, Twisk M, Van Echten-Arends J, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *NEJM*

2007; 357: 9-17.

70. Staessen C, Platteau P, Van Assche E, et al. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. Hum Reprod

2004; 19: 2849-58.

71. Verlinsky Y, Tur-Kaspa I, Cieslak J, et al. Preimplantation testing for chromosomal disorders improves reproductive outcome of poor-prognosis IVF patients. Reprod Biomed Online 2005; 11: 219-25.