

세포질내 정자주입술 시행시 난자의 상태에 따른 수정률과 배아의 발생양상

임천규 · 전진현 · 송상진 · 김정욱 · 강인수*

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 불임연구실 · *산부인과

Correlation of Oocyte Quality with Fertilization and Embryonic Development in Intracytoplasmic Sperm Injection Treatment

Chun-Kyu Lim, Jin-Hyun Jun, Sang-Jin Song, Jeong-Wook Kim and Inn-Soo Kang*

*Infertility Research Laboratory and Department of OB/GYN**,

College of Medicine, Sungkyunkwan University,

Samsung Cheil Hospital & Women's Healthcare Center, Seoul, Korea

요 약 : 세포질내 정자주입술은 불임치료에 도입된 이후 남성불임 극복에 성공적으로 이용되고 있다. 세포질내 정자주입술 시행 후 수정률, 난할률과 발생된 배아의 상태는 여러 가지 요인에 의해 영향을 받으며, 난자의 상태에 따라 영향을 받는 지에 대해서 아직까지는 논란이 많다. 본 연구에서는 세포질내 정자주입술의 결과가 난자의 상태에 따라 영향을 받는 지를 알아보기 위하여 세포질내 정자주입술을 시행한 44례에서 전과정을 현미경에 부착된 CCD 카메라를 통하여 녹화하였다. 그리고 각각의 난자에 대하여 세포질내 함유물의 존재 여부, 위란강의 넓이, 위란강내 세포질 잔기의 존재 여부, 난자의 세포막의 탄력성을 관찰, 기록하여 ICSI 시행 후 수정률과 발생된 배아의 상태를 비교, 관찰하였다. 결과를 살펴보면 수정률은 세포질내 함유물의 존재 여부, 위란강의 넓이, 위란강내 세포질 잔기의 존재 여부에 따라서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 난자의 세포막의 탄력성의 차이에 따른 퇴화율은 주입미세관이 들어가면서 난자의 세포막이 찢리는 경우가 17.7%, 난자의 세포질을 흡입하여 난자의 세포막이 찢린 경우가 1.6%로 유의한 차이 ($P < 0.001$)를 나타내었다. 발생된 배아의 상태는 각각의 경우에 대해서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 원인별 난자의 상태는, 여성요인 환자와 남성요인 환자에서 세포질내 함유물을 갖는 난자의 비율은 각각 48.4%, 25.1% ($P < 0.001$), 위란강이 넓은 난자의 비율은 각각 35.2%, 19.0% ($P < 0.001$), 위란강내 세포질 잔기가 존재하는 난자의 비율은 각각 53.3%, 38.4% ($P < 0.05$)로 여성요인 환자에서 유의하게 높았다. 결론적으로 세포질내 정자주입술 후 수정률과 발생된 배아의 발생률은 광학현미경하에서 관찰한 난자의 상태와 상관관계가 없는 것으로 사료되며, 세포질내 정자주입술 후 난자의 퇴화율은 난자 세포막의 탄력성과 상관관계가 있는 것으로 생각된다.

ABSTRACT : Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has been widely used to treat couples with infertility due to severely impaired sperm characteristics and for whom conventional *in-vitro* fertilization (IVF) had failed. The extent to which the morphology of the oocyte at the light microscopy level is related to the results of ICSI is controversial. In this study, oocytes from 44 patients were reviewed. The ICSI procedure was recorded through CCD camera. The oocytes were divided into five groups according to the presence of cytoplasmic inclusions, the width of perivitelline space (PVS), the presence of cell debris in PVS, the status of first polar body and the flexibility of oolemma. The results showed that the fertilization rate and embryonic development were not associated with the morphological criteria of oocyte. The degeneration rate of oocytes after ICSI was significantly higher ($P < 0.001$) in the oocytes whose membranes were broken at the moment of insertion (17.7%) than the oocytes whose membranes were broken by aspiration of cytoplasm (1.6%). More oocytes with cytoplasmic inclusions (48.4% vs. 25.1%, $P < 0.001$), wide PVS (35.2% vs. 19.0%, $P < 0.001$), or cell debris in PVS (53.3% vs. 38.4%, $P < 0.05$) were observed in patients with female factor infertility compared to patients with male factor infertility. These results suggest that the fertilization rate and embryonic development after ICSI are not correlated with oocyte morphology based on the presence of cytoplasmic inclusions, size of PVS, the presence of cell debris in PVS and the status of polar body. And the degeneration rate of oocytes after ICSI was associated with the flexibility of oolemma.

Key words : Intracytoplasmic sperm injection (ICSI), Cytoplasmic inclusion, Cell debris, *In vitro* fertilization (IVF)

서 론

세포질내 정자주입술 (ICSI)이 인간의 체외수정 및 배아 이식술에 도입된 이후 (Palermo et al., 1993; Trounson & Wood, 1993; Redgment et al., 1994; Silber, 1994; Van Steirteghem et al., 1994) 세포질내 정자주입술은 운동성 정자의 수가 부족하여 일반적인 체외수정술을 시행할 수 없는 남성불임환자와 체외수정방법에 의하여 수정이 이루어지지 않거나 수정률이 20% 미만인 환자들의 치료에 널리 이용되고 있다.

세포질내 정자주입술 시행 후 수정의 실패는 대부분 난자가 활성화되지 않기 때문이며 (Sausa & Tesarik, 1994; Flaherty et al., 1995), 또한 아직까지는 많은 논쟁이 있으나 그 결과가 난자의 상태에 따라 영향을 받는다는 결과들이 보고되고 있다 (Alikani et al., 1995; Daya et al., 1995; De Sutter et al., 1996; Gabrielson et al., 1996; Xia P.; 1997). 최근에는 일반적인 체외수정시술시 수정률이 낮은 환자에서는 세포질내 정자주입술을 시행할지라도, 수정률, 난할률, 임신률이 낮다는 보고가 있다 (Gabrielson et al., 1996). Daya 등은 (1995) 세포질내 정자주입술의 결과를 난자의 형태로써 예견할 수 있다고 보고하였다. 또한 세포질내 정자주입술의 결과는 난자의 형태에 영향을 받지 않지만 기형인 난자로부터 유래된 배아를 이식받은 여성에서 임신 초기에 유산률이 높은 것으로 보아 기형인 난자로부터 유래된 배아는 착상과 그 이후의 발생능력이 떨어지는 것으로 보인다는 보고도 있다 (Alikani et al., 1995). 반면 세포질내 정자주입술의 결과와 난자의 형태 사이에는 상관관계가 없다는 보고도 있어, De Sutter 등 (1996)은 난자의 형태와 세포질내 정자주입술 시행 후 수정률과 난자의 상태 사이에는 상관관계가 없고, 기형난자의 회수로 체외수정이 반복적으로 실패하는 환자에서 세포질내 정자주입술이 적당한 치료법이 될 수 있다고 보고하였다.

체외수정을 시행하는 환자들에서 얻어지는 난자의 10~15%에서 수정과 초기 배아발생의 실패와 관련된 난자의 기형이 관찰된다 (Van Blerkom, 1990). 이러한 기형의 난자내에는 과립, 액포, refractile bodies, 다른 세포질내 함유물 등을 관찰할 수 있으며, 제 1 극체, 위란강, 투명대와 세포질에 색소가 침착된 난자 그리고 형태가 구형이 아닌 난자들과 세포질의 구성이 균질하지 않은 난자들도 관찰된다. 일부 난자는 두 가지 이상의 이상요인을 동시에 가지고 있는 경우도 있어 난자의 형태와 그 발생 사이의 상관관계를 규정하기 어려운

경우도 있다. Xia (1997)는 세포질내 정자주입술을 시행할 때 제 1 극체, 위란강 (perivitelline space)이 정상이고, 난자내에 함유물을 갖지 않는 난자가 그렇지 않은 난자에 비하여 유의하게 높은 수정률을 보였으며, 더 좋은 상태의 배아를 얻을 수 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 난자의 상태와 세포질내 정자주입술 결과 사이에 상관관계가 있는 지를 알아보기 위하여 난자내 함유물의 존재여부, 위란강의 넓이, 위란강내 세포질 잔기의 존재여부, 제 1 극체의 상태와 난자의 세포막의 탄력성에 따른 수정률, 발생률, 그리고 임신률의 차이를 알아보고자 했다.

재료 및 방법

1. 대 상

본 원에서 세포질내 정자주입술을 시행한 44례를 대상으로 하였다. 연구대상은 다음과 이유로 ICSI programme에 참여하였다: i) 이전 IVF cycle에서 낮은 수정률 (<20%)을 보인 경우 (17례); ii) 전체 사정액내에 운동성 정자의 수가 500,000 미만인 경우 (12례); iii) 무정자증으로 미세수술적 부고환 정자흡입술 (microsurgical epididymal sperm aspiration; MESA) 또는 고환조직 정자채취술 (testicular tissue sperm extraction; TESE)을 시행한 경우 (15례).

2. 과배란 유도과 난자의 준비

과배란은 gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonist (Superfact, Serono, USA), human menopausal gonadotrophins (hMG)와 human follicular stimulating hormone (hFSH)을 사용하여 유도하였다. Gonadotrophin 투여 후 3일째부터 초음파로 난포의 크기를 매일 관찰하고, 혈액내 17β -estradiol (E_2)의 농도를 2일 간격으로 측정하였다. 그리하여 최소한 2개 이상의 난포가 18mm 이상 되고, E_2 농도가 500 pg/ml이 되었을 때 human chorionic gonadotrophins (hCG)를 10,000 IU 주사하였다. hCG를 주사한 후 34시간이 되었을 때, 질식초음파를 이용하여 난자를 채취하였다.

채취된 난자는 10% synthetic serum substitute (SSS; Irvine Sci. Santa Ana, CA, USA)가 첨가된 human tubal fluid medium (HTFM; Irvine Sci. Santa Ana, CA, USA)에 넣어, 37°C, 5% CO_2 , 95% 공기중 배양기 (Queue 2210, Queue Systems Inc.)에서 3~4시간 배양하였다. 3~4시간 배양후 0.1% hyaluronidase (Sigma, H-3506)가 첨가된 modified T6 배양액을 처리하여 난구세

포를 제거하였다. 난구세포를 제거한 난자는 10% SSS가 첨가된 HTFM에서 1~2시간 정도 배양한 후, 세포질내 정자 주입술을 시행하기 직전 난자의 성숙도를 확인하여, 제 1극체가 방출된 제 2감수분열 중기의 성숙 난자에 세포질내 정자 주입술을 시행하였다.

3. 정자의 준비

정액을 채취한 후 37°C hot plate에서 30분간 액화시킨 다음, CASA (computer assisted semen analyser, Cryo Resources Ltd., Cellsoft 2000)를 이용하여 정자의 수, 운동성 등을 판정하였다. 정액의 상태에 따라서 각각 다른 방법으로 준비되었다. 정액검사가 정상임에도 이전 IVF cycle (s)에서 20% 미만의 수정률을 보인 경우는 100, 90, 80, 70, 60% Percoll gradient를 사용하여 380 g에서 30분간 원심분리 (Vision Scientific Co. Ltd., VS-6000CF)를 통하여

운동성이 좋은 정자를 회수하였다. 회수된 정자는 0.4% bovine serum albumin (BSA, Gibco, 11018-025)이 첨가된 Ham's F-10 배양액으로 원심분리를 통하여 2회 세척한 후 3% BSA가 첨가된 HTFM 배양액으로 세척하여 준비하였다. 정액검사 결과 전체 사정액 내에 운동성 정자의 수가 500,000 미만인 희소정자증인 경우와 MESA를 통해 채취된 부교환 정자는 0.4% BSA가 첨가된 Ham's F-10 배양액으로 2회 세척하거나, 세척한 후 swim-up 방법으로 운동성이 좋은 정자를 회수한 후 3% BSA가 첨가된 HTFM 배양액으로 세척하여 준비하였다. 교환정자는 교환조직의 세정관을 소독된 두 개의 핀셋을 사용하여 짜낸 다음 세척하여 준비하였다.

4. 세포질내 정자주입술과 난자의 상태 관찰

세포질내 정자주입술은 CCD 카메라가 연결된 도립현미경 (Nikon, Diaphot 300) 하에서, 200배 배율에서 시행하였

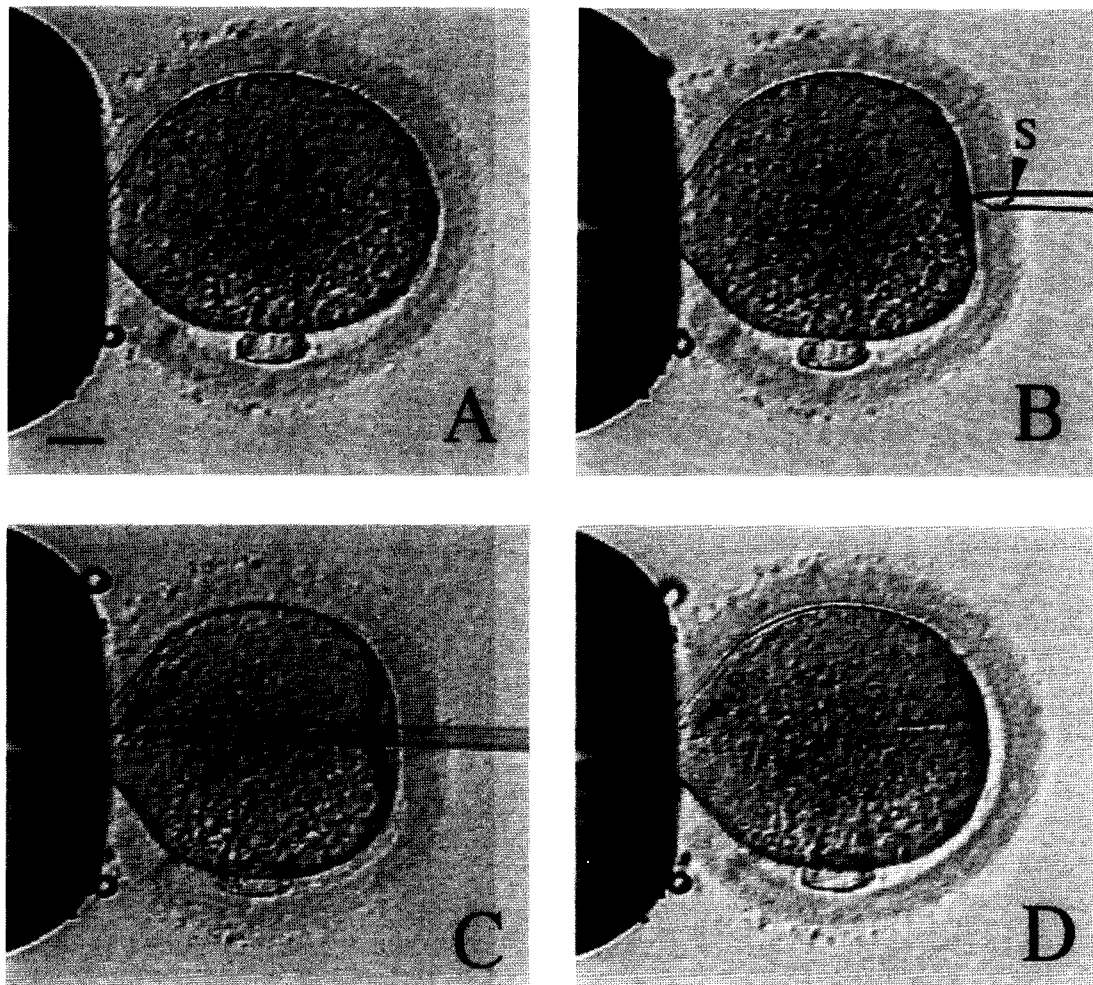


Fig. 1. Normal oocyte and ICSI procedure. The oocyte had no cytoplasmic inclusion in ooplasm and cell debris in perivitelline space. The oocyte showed normal size perivitelline space and intact polar body. The oocyte was held firmly by holding pipette (A). The injection pipette was inserted through the zona pellucida (B) and into the ooplasm (C). After injection of spermatozoon, the injection pipette was withdrawn (D). S. spermatozoon, Scale bar = 20 μm.

다 (Fig. 1). 세포질내 정자주입술에 사용된 주입미세관 (injection pipette)의 내경은 5~6 μm , 외경은 7~8 μm 인 것을 사용하였고, 고정미세관 (holding pipette)은 내경은 15~20 μm , 외경은 70~100 μm 로 미세관 (Sigma, P-2174)을 손으로 뽑아 microforge (Narishige, MF-83)로 만들어서 사용하였다. 세포질내 정자주입술을 시행하면서 전과정을 video tape에 녹화하였고, 세포질내 정자주입술이 끝난 후 난자의 상태를 관찰하였다. 난자의 상태는 난자내 함유물의 존재 유무, 제1극체의 상태, 위란강의 형태, 위란강내 세포질 잔기의 함유 여부 그리고 난자의 세포막의 탄력성에 따라 분류하였다. 난자내 직경 5 μm 이상 되는 과립, 액포 등을 갖는 난자를 함유물을 갖는 난자로, 그렇지 않는 난자를 함유물을 갖지 않는 난자로 구분하였다. 제1극체가 정상인 경우와 절편화된 경우의 난자로 구분하였고, 위란강은 정상과 넓은 난자, 위란강내 세포질 잔기를 함유하는 난자와 그렇지 않은

난자로 구분하였다 (Fig. 2). 그리고 난자의 세포막의 탄력성은 미세주입관이 들어간 후 난자의 세포질을 흡입을 하지 않았는데 난자의 세포막이 뚫린 경우와 난자의 세포질을 흡입하여 난자의 세포막이 뚫렸을 경우로 구분하였다. 세포질내 정자주입술 후 10% SSS가 첨가된 HTFM 배양액에 넣어 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 95% 공기중 배양기에 넣어 배양하였다. 세포질내 정자주입술 후 16~18 시간에 수정과 퇴화를 관찰하였다. 수정을 확인한 후 계속 배양하면서 배아의 발생상태를 세포질내 정자주입술 후 64시간에 관찰하였다. 발생된 배아의 상태는 Steer 등 (1992)의 방법을 변형하여, 할구의 수, 크기와 투명대내 절편의 양에 따라서 아래와 같이 구분하였다.

Grade I : 균일한 크기의 할구와 절편이 없는 배아, 5점
Grade I-1: 균일한 크기의 할구와 절편이 20% 미만인 배아, 4점

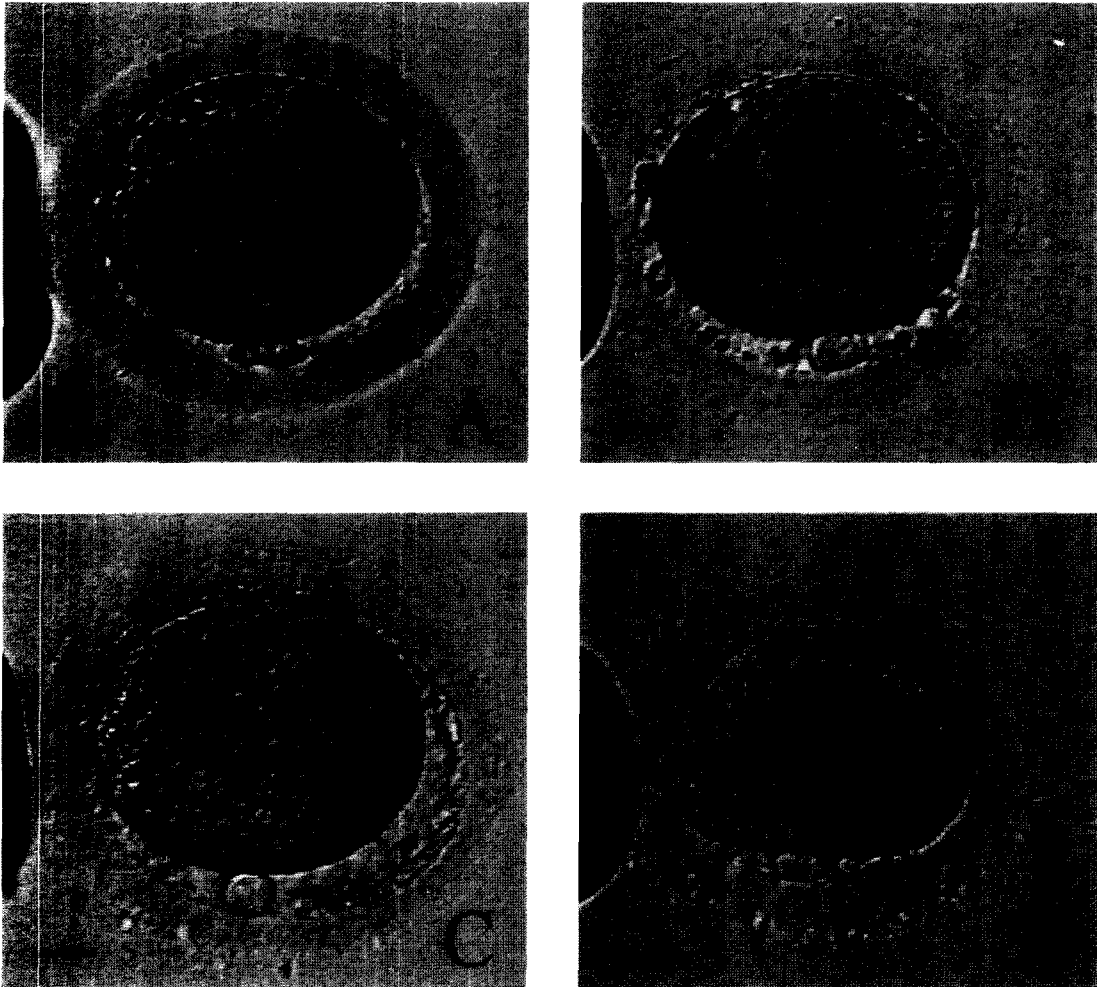


Fig. 2. Criteria for abnormal oocyte classification. Oocyte with cytoplasmic inclusion (A), Oocyte with cell debris in PVS (B), Oocyte with large perivitelline space (C), Oocyte with fragmented polar body (D), D, cell debris, I, cytoplasmic inclusion, PB, the first polar body, PVS, perivitelline space, Scale bar = 20 μm .

- Grade II : 불균일한 크기의 할구와 질편이 없는 배아, 3점
- Grade II-1 : 불균일한 크기의 할구와 질편이 20% 미만인 배아, 2점
- Grade III : 질편이 50% 이상인 배아, 1점

위의 배아 상태에 따라 각각 5, 4, 3, 2, 1의 점수를 부여하고 여기에 배아의 할구수를 곱하여 embryonic score를 구하여 배아의 상태를 구분하였다. 발생된 배아중에서 8세포기 grade I에서 I-1 등 상태가 양호한 배아는 3개, 배아의 발생이 느린 6세포기 이하의 배아이거나, grade II에서 III 등 상태가 비교적 좋지않은 배아는 4개에서 5개의 배아를 환자의 자궁내에 이식하여 주었고, 남은 배아는 동결보존하였다. 임신 여부는 배아 이식 13일 후에 혈청내 β -hCG의 양으로 확인하였다.

5. 통계학적 유의성 검정

각 실험값들의 통계학적 유의성 검정은 Abstat (rel. 6. 54, Anderson-Bell Co.)의 χ^2 test를 이용하였으며, P값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 세포질내 정자주입술의 결과

총 44주기의 환자로부터 502개 (11.4±5.7개/주기)의 난자를 채취하였다. 이 중에서 성숙된 415개 (9.4±5.0개/주기)의

난자에 세포질내 정자주입술을 시행하였다. 415개의 난자 중에서 268개의 난자에서 2개의 전핵이 확인되어 64.6%의 수정률을 보였다. 13개의 난자가 1개의 전핵을 형성하였고 (3.1%), 7개의 난자가 3개 이상의 전핵을 형성하였다 (1.7%). 세포질내 정자주입술 후 22개의 난자가 퇴화되었다 (3%). 정상적으로 수정된 268개의 수정란 중에서 87개의 수정란은 전핵시기에서 동결보존하였고 (32.5%), 나머지 181개의 수정란중에서 179개의 수정란은 난할을 진행하였고(98.9%), 1개의 수정란은 전핵단계에서 발생이 중단되었고 (0.6%), 1개의 수정란은 발생단계에서 퇴화되었다 (0.6%). 44주기의 환자 중 전핵단계에서 모두 동결보존한 1주기의 환자를 제외한 43주기의 환자에서 159개 (3.6±1.3개/주기)의 배아를 이식하였다. β -hCG 검사결과 배아이식을 시행한 43주기 중에서 13주기 (30%)에서 임신이 확인되었다 (Table 1).

2. 난자의 상태에 따른 수정률

난자의 상태를 세포질내 함유물의 존재 여부, 위란강의 넓이, 위란강내 세포질 잔기의 존재 여부, 제 1 극체의 상태, 난자의 세포막의 탄력성에 따라 구분하여 각각의 수정률을 관찰하였다. 수정 확인시 2개의 전핵과 2개의 극체를 가지고 있는 경우를 정상적인 수정으로 판정하였다.

난자의 상태에 따른 수정률을 살펴보면, 세포질내 함유물의 존재 여부, 위란강내 세포질 잔기의 존재 여부, 위란강의 넓이, 제 1 극체의 상태에 따라서 수정률과 퇴화율에는 유의한 차이가 없었다. 난자의 세포막의 탄력성에 따른 퇴화율을 비교하였을 때, 미세주입관을 주입하면서 난자의 세포

Table 1. Overall outcome of ICSI treatments in this study

No. of cycles	44
Total no. of retrieved oocytes	502 (11.4±5.7/cycle)
Total no. of injected oocytes	415 (9.4±5.0/cycle)
Observation of fertilization at 18 hours after ICSI	
No. of 1 PN ^a	13 (3.1%)
No. of 2 PN	268 /415 (64.6%)
No. of 3 PN	7 (1.7%)
No. of degenerated oocytes	22 (5.3%)
No. of cryopreserved zygotes	87 /268 (32.5%)
Observation of development at 64 hours after ICSI	
No. of cleaved embryos	179 (98.9%)
No. of degenerated embryo	1 (0.6%)
No. of arrested(PN) embryo	1 (0.6%)
Total no. of transferred embryo	159 (3.6±1.3/cycle)
Total no. of ET cycles	43
Total no. of positive β -hCG cycles	13 (30%)

^a Pronucleus.

막이 뚫린 군이 (17.7%), 세포질을 흡입했을 때 난자의 세포 (P<0.001) (Table 2).
막이 뚫린 군 (1.6%)에 비하여 퇴화율이 유의하게 높았다

Table 2. Fertilization rate based on oocyte quality in ICSI treatment

Oocyte quality	No. of Injected oocytes	Fertilization			
		1 PN ^a (%)	2 PN (%)	3 PN (%)	Deg. ^b (%)
Oocytes without cytoplasmic inclusion	281	7 (2.5)	186 (66.2)	4 (1.4)	16 (5.7)
Oocytes with cytoplasmic inclusion	134	6 (4.5)	82 (61.2)	3 (2.2)	6 (4.5)
Oocytes without cell debris in PVS ^c	242	6 (2.5)	149 (61.6)	5 (2.1)	12 (5.0)
Oocytes with cell debris in PVS	173	7 (4.0)	119 (68.8)	2 (1.3)	10 (5.8)
Oocytes with normal PVS	318	11 (3.5)	206 (64.8)	4 (1.3)	13 (4.1)
Oocytes with large PVS	97	2 (2.1)	59 (60.8)	3 (3.1)	9 (9.3)
Oocytes with normal polar body	293	7 (2.4)	188 (64.2)	5 (1.7)	19 (6.5)
Oocytes with fragmented polar body	122	6 (4.9)	80 (65.6)	2 (1.6)	3 (2.5)
Oocytes whose membrane was broken by aspiration of cytoplasm	313	12 (3.8)	206 (65.8)	5 (1.6)	5 (1.6)*
Oocytes whose membrane was broken at the moment of injection	96	1 (1.0)	58 (60.4)	2 (2.1)	17 (17.7)*

^a Pronucleus, ^b Degenerated oocytes, ^c Perivitelline space.

* p<0.001

Table 3. Embryo development based on oocyte quality in ICSI treatment

Oocyte quality	No. of observed embryos	Mean E. S. ^a (mean±SD)	Embryonic score (%)			
			1~10	11~20	21~30	31~40
Oocytes without cytoplasmic inclusion	126	24.4 ± 11.6	15 (11.9)	37 (29.4)	27 (21.4)	47 (37.3)
Oocytes with cytoplasmic inclusion	53	22.1 ± 10.4	8 (15.1)	23 (43.4)	9 (17.0)	13 (24.5)
Oocytes without cell debris in PVS	98	23.4 ± 10.9	12 (12.2)	33 (33.7)	23 (23.5)	30 (30.6)
Oocytes with cell debris in PVS ^b	81	24.4 ± 11.8	11 (13.6)	27 (33.3)	13 (16.0)	30 (37.0)
Oocytes with normal PVS	139	23.8 ± 11.7	21 (15.1)	42 (30.2)	27 (19.4)	49 (35.3)
Oocytes with large PVS	40	23.8 ± 9.9	2 (5.0)	18 (45.0)	9 (22.5)	11 (27.5)
Oocytes with normal polar body	128	24.4 ± 10.5	11 (8.6)*	47 (37.3)	27 (21.1)	43 (33.6)
Oocytes with fragmented polar body	51	22.5 ± 13.0	12 (23.5)*	13 (25.5)	9 (17.6)	17 (33.3)
Oocytes whose membrane was broken by aspiration	136	24.9 ± 11.4	21 (15.4)	46 (33.8)	25 (18.4)	44 (32.4)
Oocytes whose membrane was broken at the moment of insertion	41	25.9 ± 10.8	2 (4.9)	13 (31.7)	11 (26.8)	15 (36.6)

^a E. S.; Mean embryonic score at 64 hours after ICSI, ^b Perivitelline space,

* p<0.05

3. 세포질내 정자주입술 시행 후 64시간에 난자의 상태에 따른 발생된 배아의 상태

난자의 상태를 위에서 설명한 기준으로 나누어서, 세포질내 정자주입술 시행 후 64시간에 배아의 발생 단계와 배아의 상태를 관찰하였다. 발생상태에 따라서 embryonic score를 구하였다. Embryonic score는 배아의 등급에 따라서 각각 G I은 5점, G I-1은 4점, G II는 3점, G II-1은 2점, G III는 1점을 부여하고, 여기에 활구수를 곱하여 구하였다. 그리고 embryonic score를 10점을 단위로 하여 나누어서 각 구간별 배아의 비율을 비교하였다.

위와 같은 기준으로 난자의 상태를 나누어서 배아의 발생을 비교하였을 때, 세포질내 함유물의 존재 여부, 위란강내 세포질 잔기의 존재 여부, 위란강의 넓이, 난자의 세포막의 탄력성에 따라서 발생된 배아에서 관찰된 embryonic score는 유의한 차이를 보이지 않았다. 그리고 제 1 극체가 절편화된 난자에서 발생된 배아는 제 1 극체가 정상인 난자에서 발생된 배아에 비해 embryonic score가 1~10인 구간에서 유의하게 높은 비율로 관찰되었다 ($P < 0.05$) (Table 3).

4. 여성요인과 남성요인 불임환자의 난자상태의 비교

여성요인과 남성요인 불임환자에서 얻어진 난자의 차이를 알아보기 위하여, 원인을 알 수 없는 2례를 제외하고 여성요인과 남성요인 불임환자로 분류하여 세포질내 함유물을 갖는 난자, 위란강의 넓이와 위란강내 세포질 잔기의 존재 여부, 제 1 극체의 상태를 비교하였다. 세포질내 함유물을 갖는 난자는 여성요인 불임환자에서 122개의 난자 중에서 59개 (48.4%)였고, 남성요인 불임환자에서는 279개의 난자 중에서 70개 (25.1%)로 유의한 차이를 나타내었다 ($P < 0.001$). 위란강이 넓은 난자는 여성요인 불임환자에서는 122개 중 43개 (35.3%), 남성요인 불임환자에서는 279개 중 53개 (19.0%)로 유의한 차이를 나타내었고 ($P < 0.001$), 위란강내 세포질 잔기가 존재하는 난자는 각각 122개 중 65개 (53.3%)와 279개 중 107개 (38.4%)로 역시 유의한 차이를 나타내었다 ($P < 0.05$). 제 1 극체가 절편화된 난자는 각각

122개 중 32개 (26.2%)와 279개 중 89개 (31.9%)로 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Table 4).

고 찰

본 연구에서는 세포질내 정자주입술을 시행할 때, 광학현미경 하에서 관찰되는 난자의 상태에 따라 수정률, 배아의 발생을 비교하고, 상관관계를 확인하고자 하였다. 그러나 본 연구에서 관찰한 세포질내 함유물의 존재 여부, 위란강의 넓이, 위란강내 세포질 잔기의 존재 여부, 제 1 극체의 상태, 난자의 세포막의 탄력성에 따라 비교, 관찰하였을 때 수정률과 발생된 배아상태는 서로 상관관계가 없는 것으로 나타났다.

1997년 Xia는 세포질내 정자주입술을 시행할 때, 정상인 제 1 극체와 위란강을 갖고, 세포질내 함유물을 갖지 않는 난자가 그렇지 않은 난자에 비하여 수정률과 배아의 상태가 유의하게 좋아, 제 1 극체, 위란강의 상태, 세포질내 함유물의 존재 여부가 수정률과 수정 후 배아의 발생상태와 유의한 상관관계를 갖는다고 보고하였다. 반면, 세포질내 정자주입술을 시행할 때 난자의 형태가 수정률, 초기 배아의 발생, positive β -hCG로 본 임신율에는 영향을 주지 않지만, 기형인 난자에서 얻어진 배아만을 이식한 환자에서 임상적 임신율과 착상률이 낮은 것으로 보아, 이러한 배아들은 정상적으로 착상이 잘 되지 않는 것으로 보인다는 보고도 있다 (Alikani et al., 1995). 또한 세포질내 정자주입술을 시행할 때, 난자의 수정률과 수정 후 배아의 상태는 1개 또는 2개의 비정상적인 형태상 특성에 영향을 받지 않고, 단지 refractile body만이 수정의 실패와 관련이 있다는 보고도 있다 (De Sutter et al., 1996). 본 연구에서는 임신률과 착상률을 비교하지는 않아 배아의 착상능력의 차이를 확인할 수는 없었으나, 앞의 연구들에서와 같이 난자의 상태와 수정, 초기 배아발생 사이에는 상관관계가 없는 것으로 보인다. 이러한 결과는 광학현미경을 통해 관찰, 확인한 난자의 상태는 실제적인 난자의 상태와 차이가 있을 수 있음을 보여주는 것으로 사료된다.

그리고 여성요인의 불임환자에서 얻어진 난자가 남성요인의 불임환자에서 얻어진 난자보다 유의하게 더 높은 비율로

Table 4. Comparison of oocyte quality between female and male factor infertility

	Total oocytes	Number of oocytes with			
		cytoplasmic inclusion (%)	wide PVS ^a (%)	cell debris in PVS (%)	fragmented polar body
Female factor (n=15)	122	59 (48.4)**	43 (35.2)**	65 (53.3)*	32 (26.2)
Male factor (n=27)	279	70 (25.1)**	53 (19.0)**	107 (38.4)*	89 (31.9)

^a Perivitelline space.

** $p < 0.001$, * $p < 0.05$

세포질내 함유물을 갖고 있으며, 35세 이상의 환자에서 얻어진 난자가 35세 미만의 환자에서 얻어진 난자보다 유의하게 더 높은 비율로 세포질내 함유물을 갖는다는 보고와 (Xia, 1997) 마찬가지로 본 연구에서도 같은 결과를 확인하였다 (Table 4). 그러나 연령에 따라서는 35세 이상의 여성과 35세 미만의 여성에서 유의한 차이를 보이지는 않았다. 여성요인 불임환자의 생식기관내 환경이 남성요인 불임환자의 환경보다 좋지 않기 때문에 이러한 차이를 나타내는 것으로 사료된다.

세포질내 정자주입술을 시행시 난자의 세포막은 난자의 세포막의 탄력성과 미세주입관의 날카로운 정도에 따라서 다른 방식으로 찢린다. 난자의 세포막이 찢리는 형태 중에서, 미세주입관을 주입하자마자 난자의 세포막이 찢리는 난자는 그렇지 않은 난자보다 크기가 서로 다른 2개의 전핵을 형성하거나, 비정상적으로 수정되거나 ($\geq 3PN$), 또는 퇴화되는 비율이 더 높다는 보고가 있었다 (Nagy et al., 1995, 1998). 본 연구에서는 난자의 세포막이 찢리는 형태에 따라서 형성되는 전핵의 크기는 관찰하지는 않았으나, 위에서와 같이 미세주입관을 주입하자마자 찢리는 난자에서 퇴화되는 난자의 비율이 그렇지 않은 난자보다 유의하게 높은 것을 관찰할 수 있었다 ($P < 0.001$). 이것은 광학현미경 하에서 확인할 수는 없으나 내재적인 문제를 갖고 있어 난자의 상태가 좋지 않기 때문에 난자의 세포막이 쉽게 찢리고, 미세주입관에 의한 자극에 약하기 때문인 것으로 사료된다.

결론적으로 광학현미경 하에서 관찰한 난자내 함유물의 존재 여부, 위란강의 넓이, 위란강내 세포질 잔기의 존재 여부, 제 1극체의 상태에 따라 난자의 상태를 구분했을 때, 세포질내 정자주입술 시행후 수정률과 발생된 배아의 상태는 난자의 상태에 영향을 받지 않는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 미세주입관을 주입할 때 난자의 세포막이 찢리는 경우 그렇지 않은 경우에 비해서 퇴화되는 난자의 비율이 높았으며 여성요인의 불임환자에서 남성요인의 불임환자에서보다 세포질내 함유물을 갖는 난자, 위란강이 넓은 난자, 위란강내 세포질 잔기를 함유한 난자의 비율이 높았다.

인용문헌

- Alikani M, Palermo G, Alder A, Bertoli M, Blake M, Cohen J (1995) Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. *Zygote* 3:283-288.
- Daya S, Gunby J, Casper R (1995) Oocyte morphology as a predictor of pregnancy for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). In: The 51st Annual Clinical Meeting, The Society of Obstetricians and Gynecologists of Canada, Calgary, Alberta, Canada, Abstr. 013-REI, pp 47.
- De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M (1996) Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 11:595-597.
- Gabrielsen A, Petersen K, Mikkelsen AL, Lindenberg S (1996) Intracytoplasmic sperm injection does not overcome an oocyte defect in previous fertilization failure with conventional *in-vitro* fertilization and normal spermatozoa. *Hum Reprod* 11:1963-1965.
- Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Matthews CD (1995) Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 10:2623-2629.
- Nagy ZP, Liu J, Bocken G, Joris H, Bocken G, Desmet B, Van Ranst H, Vankelecom A, Devroey P, Van Steirteghem AC (1995) The influence the site of sperm deposition and mode of breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates. *Hum Reprod* 12:3171-3177.
- Nagy ZP, Janssenswillen C, Janssenswillen R, Janssens R, De Vos A, Staessen C, Van de Valde H, Van Steirteghem AC (1998) Timing of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or *in-vitro* fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 13:1606-1612.
- Palermo G, Joris H, Derde MP (1993) Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 59:826-836.
- Redgment CJ, Yang D, Tsigotis M (1994) Experience with assisted fertilization in severe male factor infertility and unexplained failed fertilization *in vitro*. *Hum Reprod* 9:680-689.
- Sausa M, Tesarik J (1994) Ultrastructural analysis of fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12:2374-2380.

- Silber SJ (1994) A modern view of male infertility. *Reprod Fertil Dev* 6:93-103
- Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG (1992) The cumulative embryo score : a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an *in-vitro* fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod* 7:117-119.
- Trounson AO, Wood C (1993) IVF and related technology. The present and the future. *Med J Aust* 158:853-857.
- Van Steirteghem A, Liu J, Joris H (1994) Assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic injection. *Reprod Fertil Dev* 6:85-89.
- Van Blerkom J (1990) Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microsc Techn* 16:324-346.
- Xia P (1997) Intracytoplasmic sperm injection : correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod* 12:1750-1755.