

소 체외성숙 난자에 ICSI에 의한 수정율의 향상에 관한 연구

정진호·김상근[†]
충남대학교 수의과대학

Studies on the Improvement of Fertilization and Development Rates Using ICSI with *In Vitro* Matured Bovine Oocytes

Chung, J. H. and S. K. Kim

College of Veterinary Medicine Chungnam National University

ABSTRACT

This study was carried out to investigate on the improvement of fertilizing and developing ability of *in vitro* matured oocytes from sperm density, motility and PVP(polyvinylpyrrolidone), HA(hyaluronic acid) concentrations, sperm capacitation and intact, free-zona of bovine oocytes obtained by intracytoplasmic sperm injection(ICSI).

1. The fertilization and cleavage rates of bovine oocytes obtained by ICSI treated 0.01, 0.02, 0.03, 0.05% of PVP concentrations were 72.7~90.9% and 38.5~54.5%, respectively. and these values of 0.02% addition of PVP were higher than other concentrations of PVP.
2. The fertilization and cleavage rates of bovine oocytes obtained by ICSI treated 0.01, 0.02% HA and 0.02% PVP + HA concentrations were 72.7%, 40.9% and 81.8%, 54.5% and 83.3%, 37.5%, respectively. and these values of 0.02% addition of PVP + HA were lowe than other concentrations of HA.
3. The fertilization and cleavage rates of bovine oocytes obtained by ICSI treated fresh and frozen sperm were 93.3%, 85.7% and 60.0%, 46.7%, respectively. and these values of fresh sperm injection were higher than frozen sperm.
4. The fertilization and cleavage rates of bovine oocytes obtained by ICSI capacitated sperm of heparin, BFF and His methods were 86.7%, 78.9%, 65.0% and 61.9%, 52.6%, 50.0%, respectively.
5. The fertilization and cleavage rates of zona-intact and zona-free bovine oocytes obtained by ICSI were 84.2%, 78.3% and 57.9%, 34.8%, respectively.
6. The fertilization and cleavage rates of bovine oocytes obtained by IVF or ICSI were 63.3~64.6%, 88.2~90.0% and 26.7~29.2%, 52.9~67.5%, respectively. This ICSI method improved high fertilization rates of bovine oocytes.

(Key words : *In vitro* matured oocytes, ICSI, Fertilization, Cleavage rates)

난자의 세포질내 단일정자 주입(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)에 관한 연구는 불임증 해결

I. 서론

[†] Corresponding author : College of Vet. Med., Chungnam National University, Taejon, 305-764, Korea, E-mail : kskkim@hanbat.cnu.ac.kr

을 위해 인간을 대상으로 주로 연구되어 왔다(Bar Hava 등, 1977; Barros 등, 1997; Gordon 등, 1997; Holden 등, 1977; Hoover 등, 1997; Jimenez 등, 1997; Novero 등, 1997; Turcker 등, 1996).

국민경제의 발전과 더불어 애완동물의 사육수가 점차 늘어나면서 종축에 대한 선호도가 높아짐에 따라 우수한 유전능력을 보유하면서도 고가인 개나 고양이의 수입이 늘어나고 있다. 일반적인 소형견의 경우 고영양 사료로 사육하면서도 운동부족으로 인해 불임 또는 번식장애율이 대단히 많아 이에 대한 예방과 적절한 대책마련이 절실한 실정이라 하겠다.

Trounson 등(1994)은 사람난자의 세포질내 정자 주입에 의해 평균 34%의 수태율을 나타냈다고 보고하면서 체외성숙 난자의 수정을 향상방안으로써 이 방법을 소개하였다. Allan과 Cotman(1997)은 needle puncture에 의한 정세관내 정자를 회수하여 동결하고 이를 이용하여 ICSI를 통해 수정에 성공하였다고 보고하였으며, Knezevich 등(1995)은 4~11 mm의 난포로부터 회수한 6개의 미숙난자를 회수하여 46~50 시간 배양한 난자와 황체에 Gn-RH agonist HMG를 처리후 36시간에 HCG를 주사하여 회수한 21개의 난자를 Mezonezo's B₂ 배양액으로 2~6시간 배양한 난자에 각각 세포질내 정자를 주입후 수정율을 조사하였는 바, 79.4% (100/126)와 90.9%(30/33)로서 자극시킨 난자에서 높은 수정율을 얻었으며 polyspermy율은 유의한 차이를 나타내지 않았다고 보고하였다.

Lacham Kaplan과 Trounson(1995)은 mouse에 있어서 ICSI전에 정자를 Ca inophore로 처리하여 침체반응을 유기(acrosome-free 정자율 28~58%)한 intact oocytes의 진행형성율은 60%(59~62%)였으며, 진행형성 난자는 수정후 이식하였을 때 배반포까지 발생되었다고 보고하였다. Motoishi 등(1996)은 난자의 ICSI시 정자의 micropipette내 흡입시 PVP(polyvinylpyrrolidone)를 함유한 배양액내 난자에 정자주입시 정상수정, 발생을 및 세포수에 있어서 해를 주지 않았으며, 난자의 ICSI시 동물이나 사람에게 있어서 배 발생이나 배 세포질에 있어서

나쁜 영향을 주지 않았다고 보고하였다.

한편, Catt와 Rhodes (1995)는 주요 가축의 체외 성숙 난자에 대해 정자 주입을 시험하고 이것을 사람의 것과 비교하였는데, 양, 소, 돼지 난자에 정자 주입 전후에 외인적으로 활성화시키지 않은채 수정과 발생 여부를 시험하였을 때 돼지는 배 발생 및 수정시에 온도에 민감하고, 양은 정자 존재 여부에 관계없이 주입후 활성화되는 경향이 있다고 보고하였다. Tsi 등(2000)은 사람 정자를 이용하여 ICSI법으로 수정시킬 때 PVP 사용 또는 비사용시 수정율은 57.63%와 84.43%로서 PVP-비사용이 유의하게 높았다고 하였으며, Dumoulin 등(2000)은 사람 정자를 이용하여 IVF와 ICSI법으로 수정시킨 후 배양하였을 때 배반포로의 발생율은 31.8%와 23.0%로서 유의하게($p < 0.001$) IVF법이 높게 나타났다고 하였다.

Martin(2000)은 돼지 난자를 대상으로 ICSI법으로 수정후 48시간에 69%가 생존하였고, 38%가 배반포로 발생하였고, 1두의 수란돈에 이식하여 3마리의 산자가 출산하였다고 하였다. 또한, Ahmadi와 Bongso(1996)은 햄스타 난자를 이용하여 사람의 정자를 ICSI법에 의해 수정시키는 방법으로 수정능력을 검정할 수 있다고 보고하였다. 그러나 가축난자의 세포질내 단일정자의 주입에 관한 연구와, 난자의 세포질에 정자주입시 정자수, 활력 및 PVP 농도 등이 수정율에 미치는 영향에 관한 보고는 접할 수 없었다. 특히, 소형 개나 고양이 등 고가의 애완동물과 젖소는 영양가가 높은 사료로 사육하면서도 운동량이 적어서 비만이 되고 이로 인해 수태가 잘 안되는 불임증에 가까운 개체가 많아지고 있어 이의 해결이 요구되고 있다.

이에, 본 연구는 고가이면서 저정자증 또는 불임축의 불임해결과 수태율 증진에 적용할 목적으로, PVP, HA(hyaluronic acid)의 농도, 신선 및 동결정자, 정자의 농도, 활력, 정자의 수정능 획득 처리법 및 난자의 투명대 부착, 미부착별로 현미조작에 의해 난자의 세포질내 단일정자를 주입했을 때 수정율 및 체외발생율을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 회수

도살 한우의 난소를 적출하여, 100 IU/ml의 penicillin G와, 100 µg/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮긴 다음 난소난포로부터 배양액이 들어있는 18 G 주사기로 난포액을 흡입하여 실험현미경(20~40×)하에서 난포란을 회수하였다.

2. 난포란의 배양

회수한 난포란은 10%(v/v)의 FCS(Sigma, USA)와 1 µg/ml의 FSH (Sigma, USA), 2 IU/ml의 HCG (Sigma, USA), 1 µg/ml의 β-estradiol(Sigma, USA), 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 µg/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-199(Whittaker, USA) 배양액으로 배양하였다.

3. 난자의 체외성숙

난포란의 체외성숙은 배양액 50 µl의 drop을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 배양 2~3시간전에 CO₂ 배양기내(5% CO₂, 95% air, 38.5°C)에서 5~6시간 평형시킨 후 drop내에 5개의 난포란을 주입하여 24~30시간 성숙배양하였다.

4. 난자의 전처리

난자의 전처리는 난자를 0.03%의 pronase(Sigman, U.S.A.)를 처리하여 투명대를 연화시켜 pipetting으로 투명대를 제거한 난자를 배양하면서 시험에 이용하였다.

5. 정자의 전처리

정액은 신선 및 동결정액을 이용하여, heparin법은 시험관내에서 BO액 1 ml에 용해한 정액 0.2 ml를 혼합하여 CO₂ 배양기에서 swim-up 처리후, 상층액을 배양액으로 1,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 세척하고 정자괴를 동량의 100 µg/ml의 heparin(Sigma, U.S.A.)과 희석하여 15분간 전배양에 의해, BFF(bovine follicular fluids)법은 1~20 mm의 난포로부터 채취한 난포액을 600 rpm으로

10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 56°C에서 30분간 비동화처리후 여과 멸균하여 4시간 배양에 의해, His(high ionic strength)법은 2 ml의 His액에 0.1 ml의 정액을 희석하여 5분간 배양후 300 rpm으로 5분간 원심분리후 배양액에 희석하여 5분간 전배양에 의해 수정능획득을 유지하였다.

6. IVF(In vitro fertilization)

체외성숙이 끝난 난포란을 45 µl의 배양액 소적에 5개의 난포란과 수정능획득 유지 정자 부유액 2 µl(1~5×10⁶ml)을 주입하고 mineral oil로 피복한 다음 6~7시간의 매정으로 수정시켰다.

7. PVP액 준비

Micropipette내에 정자의 장진을 용이하게 하기 위해 시험관내에 PVP(Sigma, U.S.A.) 0.1 g과 3차 증류수 1 ml를 넣어 vortex mixer로 용해시킨 후 0.2 µm filter syringe로 여과한 다음 냉장 보관하면서 사용 전날부터 전배양한 PVP액을 이용하였다.

8. HA액의 준비

0.06g의 HA(Sigma, U.S.A.)를 배양액 3 ml에 첨가하여 vortex mixer로 용해하고 0.2 µm filter syringe로 여과한 후 냉장 보관하면서 사용 전날로부터 전배양한 HA액을 이용하였다.

9. ICSI

체외성숙 난자의 세포질내 정자의 주입은 micromanipulator(Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 도립현미경 stage위 petri dish내에 사용 전날 preincubation한 PVP액 drop중에 수정능획득 정자를 넣어 운동성을 저하시킨 다음 micropipette에 정자를 장진시켜 보정용 pipette으로 흡인 고정한 체외성숙난자내에 현미조작에 의해 주입하였다(Fig. 1, 2).

10. 수정율 및 체외발생율

IVF 및 ICSI후 초기배를 배양액으로 3회 세척후 10% FCS + TCM-199 배양액으로 배양하면서 배의 발생상태를 관찰하거나, Schilling(1982)법에

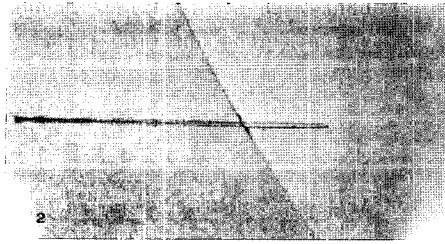


Fig. 1. Single sperm absorbed in micropipettes.

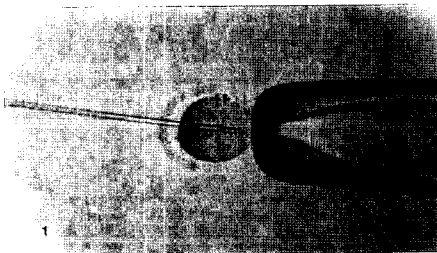


Fig. 2. Oocytes microinjected single sperm into cytoplasm.

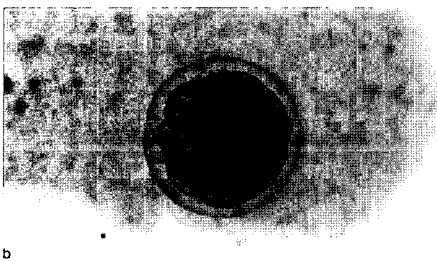


Fig. 3. Mulae embryos obtained by ICSI matured oocytes *in vitro*.

준하여 FDA(fluorescence diacetate) test에 의해 수정율과 체외발생율을 판정하였다(Fig. 3).

11. 통계학적 분석

반복실험을 통하여 얻어진 결과는 분산분석에 의해 평균과 오차(Mean \pm SD)를 구하였으며, 처리간의 차이를 평가하기 위하여 Duncan의 다중검증을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. PVP농도별 수정율 및 분할율

소 난자의 ICSI시 정자의 micropipette흡입시 PVP 농도별로 흡입하여 세포질내 주입후 배양하였을 때 수정율과 분할율은 Table 1과 같다.

소 난자의 ICSI시 PVP 농도를 0.01, 0.02, 0.03, 0.05%별로 처리한 정자를 micropipette내에 흡입하여 세포질내 주입하였을 때 수정율은 72.7~90.9%였으며 분할율은 38.5~54.5%로서 0.02% 농도에서 비교적 높은 수정율과 분할율을 나타냈다. 특히, micropipette에 정자를 장진할 때 PVP 액의 이용은 활력을 가진 단일정자를 흡입하는 것이 용이해지고 또한 다정자침입의 폐해를 막을 수 있는 좋은 방법으로 생각되었다. 이러한 결과는 Motoishi 등(1996)이 ICSI시 정자의 micropipette내 흡입시 PVP를 함유한 배양액내 난자에 정자주입시 정상수정, 발생율 및 세포수에 있어서 해를 주지 않

Table 1. Results of fertilization and cleavage rates of bovine oocytes obtained by ICSI treated various PVP concentration

Concentration of PVP(%)*	No. of oocytes			
	Injected	Cultured	Fertilized(%)	Cleaved(%)
0.01	22	22	16(72.7)	10(45.5)
0.02 ^a	22	22	20(90.9)	12(54.5)
0.03	24	24	20(83.3)	10(41.7)
0.05 ^b	26	25	20(76.9)	10(38.5)

* PVP : polyvinylpyrrolidone.

** Values with different superscripts within column were significantly different(p<0.05).

았으며, ICSI는 동물이나 사람에 있어서 배 발생이나 배 세포 질에 있어서 나쁜 영향을 주지 않았다는 보고와 일치하였다. 그러나, Tsi 등(2000)은 사람 정자를 이용하여 ICSI법으로 수정시킬 때 PVP 사용 또는 비사용시 수정율은 57.63%와 84.43%로서 PVP-비사용이 유의하게 높았다고 한 보고와는 상반된 결과였다.

2. HA 농도별 수정율 및 분할율

소 난자의 ICSI시 정자의 micropipette 흡입시 HA 농도별로 함유한 배양액으로 흡입하여 세포질내 주입후 배양하였을 때 수정율과 분할율은 Table 2와 같다.

소 난자의 ICSI시 HA 농도를 0.01, 0.02%, 0.02%의 PVP + HA 별로 micropipette내에 흡입하여 세포질내 주입하였을 때 수정율은 각각 72.7%, 81.8%였으며 분할율은 각각 40.9%, 54.5%였으며, 0.02% PVP + HA군에서 83.3%와 37.5%로서 HA 처리군에 비해 낮게 나타났다. 이러한 결과는 HA 농도별 수정율과 분할율에 대한 보고를 접할 수 없어 정확하게 비교할 수는 없지만 HA는 수정시 난구 세포를 유리시키고 분산시켜 수정을 원활하게 해 주고 PVP는 micropipettes에 정자를 장착할 때 편리하게 해주는 장점이 있지만 PVP의 유해문제에 대해서는 명확하게 구명된 바가 없는 실정이다 (Moon 등, 2000).

3. 신선, 동결정자별 수정율 및 분할율

소 난자의 ICSI시 신선 및 동결정자를 이용하여 ICSI법으로 수정하여 배양하였을 때 수정율 및 분

Table 3. Results of fertilization and cleavage rates of bovine oocytes obtained by ICSI treated fresh and frozen sperm

Types of sperm	No. of oocytes			
	Injected	Cultured	Fertilized (%)	Cleaved (%)
Fresh	30	30	28(93.3)	18(60.0)
Frozen	30	30	26(86.7)	14(46.7)

할율은 Table 3과 같다.

소 난자의 ICSI시 신선 및 동결정자를 이용하여 ICSI법으로 수정후 배양하였을 때 수정율과 분할율은 각각 93.3%, 86.7% 및 60.0%, 46.7%로서 신선정자를 이용하였을 때가 동결정자를 이용했을 때보다 높은 수정율과 분할율을 나타냈다. 이러한 결과는 신선 및 동결정자를 이용하여 ICSI에 의한 수정율과 분할율에 대한 보고를 접할 수 없어 정확하게 비교할 수 없었다. 그러나 Yoo 등(1998)은 체외수정시 신선정자를 이용한 체외수정이 동결정자를 이용할 때보다 높은 체외수정율과 분할율을 나타낸다고 하였다.

4. 정자의 수정능획득 처리별 수정율 및 분할율

소 난자의 수정시 정자의 수정능획득 처리별 IVF 및 ICSI후 배양하였을 때 수정율 및 분할율은 Table 4와 같다.

소 난자의 수정시 정자의 수정능획득 처리별 수정율과 분할율은 heparin, BFF 및 His법으로 수정능획득 처리후 IVF 및 ICSI법으로 수정시켰을 때

Table 2. Results of fertilization and cleavage rates of bovine oocytes obtained by ICSI treated various HA concentration

Concentration of HA(%)*	No. of oocytes			
	Injected	Cultured	Fertilized(%)	Cleaved(%)
0.01	22	22	16(72.7)	9(40.9)
0.02	22	22	18(81.8)	12(54.5)
0.02 PVP + HA	24	24	20(83.3)	9(37.5)

* HA : hyaluronic acid.

Table 4. Results of fertilization and cleavage rates of bovine oocytes obtained by IVF or ICSI treated various sperm capacitaion

Method of capacitation	No. of oocytes examined	No. of oocytes(IVF)		No. of oocytes(ICSI)	
		Fertil.(%)	Clea.(%)	Fertil.(%)	Clea.(%)
Heparin	21	13(61.9)	5(23.8)	18(85.7)	13(61.9)
BFF	19	10(52.6)	3(15.8)	15(78.9)	10(52.6)
His	20	9(45.0)	2(10.0)	13(65.0)	10(50.0)

수정율은 각각 61.9%, 52.6%, 45.0%와 85.7%, 78.9%, 65.0%였으며, 분할율은 각각 23.8%, 15.8%, 10.0%와 61.9%, 52.6%, 50.0%로서, 정자 수정능 획득 처리별 수정시 heparin 처리법과 IVF에 비해 ICSI법에서 높은 수정율과 분할율을 나타냈다. 이러한 결과는, 소 난포란의 체외수정에 비해 정자의 heparin 처리가 체외수정율과 분할율이 높게 나타났다고 보고한 Trounson 등(1994)의 보고와 일치하였다.

한편, Lacham Kaplan과 Trounson(1995)은 mouse에 있어서 ICSI전에 정자를 Ca inophore로 처리하여 침체반응을 유기(acrosome-free 정자율 28~58%)한 intact oocytes의 전핵형성율은 60%(59~62%)였으며, 전핵형성 난자는 수정후 이식하였을 때 배반포까지 발생되었다고 보고하였다. Knezevich 등(1995)은 6개의 미숙 난자를 회수하여 46~50시간 배양한 난자와 황체기에 Gn-RH agonist HMG를 처리후 36시간에 HCG를 투여하여 회수한 21개의 난자를 2~6시간 배양한 난자에 각각 세포질내 정자를 주입하였을 때 수정율은 90.9%로서 자궁난자의 79.4%에 비해 높았으며, 다정자침입율은 유의한 차이를 나타내지 않았다고 보고하였다.

5. 난자의 투명대 부착과 미부착별 수정율 및 분할율

소 난자의 수정시 투명대 부착과 미부착별로 IVF 및 ICSI후 배양하였을 때 수정율 및 분할율은 Table 5와 같다.

소 난자의 수정시 투명대의 부착과 미부착별로 IVF 및 ICSI법으로 수정시켰을 때 수정율은 각각 63.2%, 47.8%와 84.2%, 78.3%였으며 분할율은 각각 15.8%, 8.7%와 57.9%, 34.8%였다. 정자의 활력별 수정시 IVF에 비해 ICSI법에서 높은 수정율과 분할율을 나타냈다. 이러한 결과는 소 배반포를 intact-zona군과 free-zona군으로 나누어 ICSI를 실시했을 때 생존율은 87.5%(14/16)와 75.0%(12/16)의 생존율($p < 0.05$)을 나타냈다고 한 Keskinetepe와 Bracckett (2000)의 결과와는 상당한 차이가 있었다. 한편, Martin(2000)은 돼지 난자를 대상으로 ICSI법으로 수정후 48시간에 69%가 생존하였고, 38%가 배반포로 발생하였고, 1두의 수란돈에 이식하여 3마리의 산자가 출산하였다고 하였다.

6. IVF 및 ICSI별 수정율 및 분할율

소 난자의 체외수정과 ICSI시의 수정율 및 체외 발생율을 비교하기 위하여 체외성숙 난자를 각각 체외수정과 ICSI법에 의해 수정시켰을 때 수정율 및 분할율은 Table 6과 같다.

소 체외성숙 난자와 수정능 획득 정자를 체외수

Table 5. Results of fertilization and cleavage rates of intact and free-zona bovine oocytes obtained by IVF or ICSI

Culture of oocytes	No. of oocytes examined	No. of oocytes(IVF)		No. of oocytes(ICSI)	
		Fertil.(%)	Clea.(%)	Fertil.(%)	Clea.(%)
Intact-zona	19	12(63.2)	3(15.8)	16(84.2)	11(57.9)
Free-zona	23	11(47.8)	2(8.7)	18(78.3)	8(34.8)

Table 6. Comparison of *in vitro* fertilization and cleavage rates of bovine oocytes obtained by IVF or ICSI

Methods of fertilization		No. of oocytes		
		Examined	Fertilized(%)	Developed(%)*
IVF	I	60	38(63.3)	16(26.7)
	II	65	42(64.6)	19(29.2)
ICSI	I	34	30(88.2)	18(52.9)
	II	40	36(90.0)	27(67.5)

*: Blastocysts developed *in vitro*.

정한 경우와 체외성숙 난자에 ICSI법에 의해 수정시켰을 때 각각 수정율과 체외발생율은 63.3~64.6%와 88.2~90.0%였으며, 분할율은 26.7~29.2%와 52.9~67.5%로서 ICSI법으로 수정시켰을 때 수정율이 크게 향상되었다. ICSI법은 고가의 가자재와 숙련된 기술을 필요로 하는 단점이 있지만 저정자증 또는 불임증을 나타내는 동물의 수태율 증진과 불임해결에 적절하게 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

IV. 적 요

본 연구는 저정자증 또는 불임축의 수태율 증진과 불임해결에 적용할 목적으로, 일차적으로 소 정자의 PVP, HA의 농도, 신선 및 동결정자, 정자의 농도, 활력, 정자의 수정능획득법 및 난자의 투명대 부착과 미부착별로 현미조작에 의해 난자의 세포질내 단일정자의 주입했을 때 수정율 및 체외발생율을 조사하였다.

1. 소 난자의 ICSI시 PVP 농도를 0.01, 0.02, 0.03, 0.05%별로 처리한 정자를 micropipette내에 흡입하여 세포질내 주입하였을 때 수정율과 분할율은 각각 72.7~90.9% 및 38.5~54.5%로서 0.02% 농도에서 비교적 높은 수정율과 분할율을 나타냈다.
2. 소 난자의 ICSI시 HA농도를 0.01, 0.02%, 0.02%의 PVP + HA별로 micropipette내에 흡입하여 세포질내 주입하였을 때 수정율과 분할율은 각각 72.7%와 81.8% 및 45.5%와 54.5% 및 83.3%

와 37.5%였다.

3. 소 난자에 신선 및 동결정자를 이용하여 ICSI법으로 수정시 수정율은 각각 93.3%, 86.7%였으며, 분할율은 60.0%, 46.7%로서 신선정자를 이용하였을 때가 동결정자를 이용했을 때보다 높은 수정율과 분할율을 나타냈다.
4. Heparin, BFF 및 His법으로 수정능획득 처리한 정자로 IVF 및 ICSI시 수정율은 각각 61.9%, 52.6%, 45.0% 및 85.7%, 78.9%, 65.0%였으며, 분할율은 각각 23.8%, 15.8%, 10.0% 및 61.9%, 52.6%, 50.0%로서, 수정능획득 처리에 있어서 heparin법이 다른 수정능획득 처리법에 높은 수정율과 분할율을 나타냈다.
5. 투명대의 부착과 미부착별 난자로 IVF 및 ICSI법으로 수정시 수정율은 각각 63.2%, 47.8%와 84.2%, 78.3%였으며 분할율은 각각 15.8%, 8.7%와 57.9%, 34.8%였다.
6. 소 체외성숙 난자에 IVF법과 ICSI법으로 수정시켰을 때 수정율은 각각 63.3%, 64.6%와 88.2~90.0%였으며, 분할율은 각각 26.7%, 29.2%와 52.9%, 67.5%로서 ICSI법으로 수정시켰을 때 수정율과 분할율이 크게 향상되었다.

V. 인용문헌

1. Ahmadi, A. and Bongso, A. 1996. Intracytoplasmic injection of human sperm into the hamster oocyte(hamster ICSI assay) as a test for fertilizing capacity of the male-factor sperm.

- J. Assist Reprod. Genet. 13(8):647-651.
2. Allan, J. A. and Cotman, A. S. 1997. A new method for freezing testicular biopsy sperm: three pregnancies with sperm extracted from cryopreserved sections of seminiferous tubule. *Fertil. Steril.* 68(4):741-744.
 3. Bar Hava, I., Ashkenazi, J., Shelef, M., Schwartz, A., Brengauz, M., Feldberg, D., Orvieto, R. and Ben Rael, Z. 1977. Morphology and clinical outcome of embryos after *in vitro* fertilization are superior to those after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 68(4): 653-657.
 4. Barros, A., Sousa, M., Oliveira, C., Silva, J., Almeida, V. and Beires, J. 1997. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection with totally immotile sperm recovered from the ejaculate. *Fertil. Steril.* 67(6):1091-1094.
 5. Catt, J. W. and Rhodes, S. L. 1995. Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reprod. Fertil. Dev.* 7(2):161-166.
 6. Dumoulin, J. C., Coonen, E., Bras, M., van Wissen, L. C., Ignoul-Vanvuchelen, R., Bergers-Jansen, J. M., Derhaag, J. G., Geraedts, J. P. and Evers, J. L. 2000. Comparison of *in-vitro* development of embryos originating from either conventional *in-vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 15(2): 402-409.
 7. Gordon, A. C., Harrison, R. F., McMahon, A. and Fawzy, M. 1997. Establishing an intracytoplasmic injection(ICSI) programme for the treatment of male factor infertility in Ireland. *Ir. J. Med. Sci.* 166(2): 65-69.
 8. Holden, C. A., Fuscaldò, G. F., Jackson, P., Cato, A., Southwick, G. J., Hauser, R., Temple Smith, P. D. and McLachlan, R. I. 1977. Frozen -thawed epididymal spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 67(1):81-87.
 9. Hoover, L., Baker, A., Check, J. H., Lurie, D. and Summers, D. 1997. Clinical outcome of cryopreserved human pronuclear stage embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 67(4):621-624.
 10. Jimenez, C., Grizard, G., Pouly, J. L. and Boucher, D. 1997. Birth after combination of cryopreservation of sperm recovered from urine and intracytoplasmic sperm injection in a case of complete retrograde ejaculation. *Fertil. Steril.* 68(3):542-544.
 11. Kanezovich, K. M., Russell, J. B., Dickson, J. A., Fabian, K. F. and Cunningham, K. J. 1995. High fertilization rates using intracytoplasmic sperm injection with unstimulated *in vitro* matured oocytes. A.S.R.M. Meeting 121-124.
 12. Keskinetepe, L. and Bracckett, B. G. 2000. Cryopreservation of bovine blastocysts obtained by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 53(5):1041-1052.
 13. Lacham Kaplan, O. and Trounson, A. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in mice : increased fertilization and development to term after induction of the acrosome reaction. *Hum. Reprod.* 10(10):2642-2649.
 14. Martin, M. J. 2000. Development of *in vivo*-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 63(1): 109-112.
 15. Moon, J. H., Heo, Y. S., Yoon, S. H., Jeong, J. H., Park, S. P. and Lim, J. H. 2000. Effect of hyaluronic acid(HA) as a substitute for polyvinyl-pyrrolidone(PVP) on ICSI outcome. *Fert. and Steril.* 74(3):163.
 16. Motoishi, M., Koto, K., Tomita, K., Ookutsu, S. and Nakanishi, Y. 1996. Examination of the safety of intracytoplasmic injection procedures by using bovine zygotes. *Hum. Reprod.* 11(3): 618-620.

17. Novero, V., Camus, M., Tourmaye, H., Smitz, J., Verheyen, G., Joris, H., Derde, M. P., Van Steirteghem, A. C. and Devroey, P. 1997. Relationship between serum follicle stimulating hormone in the male and standard sperm parameters, and the results of intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 12(1):59-63.
 18. Palermo, G. D., Cohen, J. and Rosenwaks, Z. 1996. Intracytoplasmic sperm injection : a powerful tool to overcome fertilization failure. *Fertil. Steril.* 65(5):899-908.
 19. Palermo, G. D., Cohen, J., Alikami, M., Adler, A. and Rosenwaks, Z. 1995. Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection(ICSI). *Reprod. Fertil.* 7(2):211-218.
 20. Polcz, T. E., Olive, D. L. and Jones, E. E. 1997. Improving the intracytoplasmic sperm injection technique by transmembrane electric potential monitoring. *Fertil. Steril.* 68(4):735-738.
 21. Ruiz, A., Remohj, Y., Minguez, Y., Guanes, P. P., Sim, C. and Pellicer, A. 1997. The role of *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection in couples with unexplained infertility after failed intrauterine insemination. *Fertil. Steril.* 68(1):171-173.
 22. Schilling, E., Niemann, H and Schmidt, D. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology* 15:245-248.
 23. Staessen, C. and Van Steirteghem, A. C. 1997. The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional *in-vitro* fertilization. *Hum. Reprod.* 12(2):321-327.
 24. Trounson, A., Wood, C. and Kausche, A. 1994. *In vitro* maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *J. of Fert. and Steril.* 82(2):353-362.
 25. Tsi, M. Y., Huang, F. J., Kung, F. T., Lin, Y. C., Chang, S. Y., Wu, J. F. and Chang, H. W. 2000. Influence of polyvinylpyrrolidone on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *J. Reprod. Med.* 45(2):115-120.
 26. Turcker, M. J., Morton, P. C., Wright, G., Ingargiola, P. E., Sweitzer, C. L., Mitchell, C. W., Leef, D. E. and Massey, J. B. 1996. Enhancement of outcome from intracytoplasmic sperm injection does co-culture or assisted hatching improve implantation rates. *Hum. Reprod.* 11 (11):2434-2437.
 27. Yoo, S. S., Kim, Y. S. Lee, B. K. and Kim S. K. 1998. Studies on the improvement of fertilization rates using intracytoplasmic sperm injection with *in vitro* matured oocytes. *Korean J. Anim. Reprod.* 22(3):213-219.
- (접수일자 : 2001. 6. 15. / 채택일자 : 2001. 7. 12.)