햄스터 난자에 대한 정자 미세주입법(Intracytoplasmic Sperm I njection) 과 Partial Zona Dissection 후 수정법의 비교 연구

전남대학교 의과대학 산부인과학교실

이여일 권영숙 박현정

Comparison of Intracytoplasmic Sperm Injection and Partial Zona Dissection followed by Insemination in Hamster Oocytes

Yu-Il Lee, Young-Sook Kwon, Hyun-Jeong Park

Department of Obstetrics and Gynecology, Chonnam National University Medical School, Kwangju, Korea, 501-190

*주관책임자: 이여일, 전남대학교 의과대학 산부인과학교실, 광주시 동구 학1동 8번지 501-190

Tel: 062-220-6371,6376, Fax:062-227-1637, E-mail: leeyi@chonnam.ac.kr

*본 연구는 1999년도 전남대학병원 임상연구소 연구비(CUHRZ U-99036) 지원에 의해 이루워진 것임

Objectives: This study was to investigate the fertilization rate after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) or partial zona dissection (PZD) of human and hamster sperm into hamster oocyte in in vitro fertilization (IVF). In addition, the possibility of clinical application was evaluated by the comparison of usefulness and difference of these method.

Materials and Methods: Hamster immature oocytes were obtained from oviducts superovulated by PMSG and hCG, and hamster sperms were obtained from epididymis. The freezed human sperms were thawed before use. Fertilization were confirmed by two pronuclei, one pronucleus, swollen sperm head or/and two polar bodies at 7-8 hour after ICSI or PZD.

Results: The fertilization rates after ICSI and PZD of human sperm to hamster oocyte were 3.6%, 64.2%, 73.6%, and 55.6% for negative control, positive control, ICSI, and PZD respectively, suggesting that ICSI only showed improved fertilization rate ($p<0.01$). The fertilization rates after ICSI and PZD of hamster sperm to hamster oocyte were 11.1%, 51.2%, 39.6%, and 72.7% for negative control, positive control, ICSI, and PZD respectively, suggesting that PZD only showed improved fertilization rate ($p<0.01$). PZD showed significantly higher fertilization rate than ICSI ($p<0.05$).

Conclusions: As for the fertilization rate by ICSI and PZD using hamster oocyte in IVF, ICSI technique was considered to be more useful for human sperm and PZD technique for hamster sperm. Therefore, ICSI technique was considered more appropriate for experimental application using human sperm and hamster oocyte.

Key words :ICSI, PZD, Fertilization rate, Human sperm, Hamster sperm.

남성요인에 의한 불임증 및 반복적인 체외수정 실패 환자의 치료는 최근까지도 고식적인 체외수정시술로는 임신 성공이 매우 어려운 분야였다. 그렇지만 동물실험을 통해 축적된 미세보조수정술[1](microassisted fertilization)을 바탕으로 Uehara 와 Yanagimachi등[2]이 인간정자를 미수정 햄스터 난자 내에 직접 주입하여 수정에 성공한 이래 연구가 시작되었다. 미세보조수정술의 방법에는 첫째, 난자의 투명대를 인공적으로 찢어 열려 있는 상태를 만들어 수정시키는 partial zona dissection (PZD)[3] 둘째, 투명대 밑에 정자를 넣어주는 subzonal sperm insertion (SUZI)[4-6] 셋째, 정자를 난자의 세포질내에 직접 주입하는 intracytoplasmic sperm injection (ICSI)이 있는데[7] 그동안 동물실험으로 소[8], 토끼[9]에서 ICSI를 흰쥐[10]에서 PZD와 ICSI를 시행하여 수정을 확인하였고, 생쥐[11]와 양[12]에서는 ICSI를 통해 수정 및 배발달 그리고 번식하는데 성공하였다. 영장류에서도 Lanzendorf등[13]이 고릴라 난자에서 PZD에 의한 수정을 보고하였고, Hewitson[14]과 Sutovsky[15]등은 원숭이에서 ICSI를, 그리고 Ongnuki등[16]은 cynomolgus 원숭이에 ICSI와 PZD를 시행하여 수정됨을 관찰하였다. 인간에서는 SUZI로 Ng등[4]에 의해, PZD로 Malter와 Cohen[3]에 의해 그리고 최근 ICSI로는 Palermo등[17] 에 의해 임신 성공 예가 보고되고 있어 이들 미세보조수정술이 동물에서 뿐만 아니라 불임증 환자에 있어서도 좋은 결과를 보여, 현재 미세보조수정술은 보조 생식술의 하나로써 남성요인에 의한 불임증 및 반복적인 체외수정 실패 환자에 각광을 받고 있다.

인간의 미세보조수정술에서 SUZI는 PZD에 비해 투명대의 절개 부위가 작기때문에 위란강의 오염 및 조기 부화에 대한 위험도가 낮은 편이고 넣어 주는 정자수도 조절할 수 있는 반면 첨체반응이 유발되어야 만이 수정에 성공할 수 있는 단점이 있다[18,19]. 그렇지만 PZD는 SUZI에 비해 임신율은 낮지만 경미한 남성불임에 더 효과적이며 수정시 정자 농도를 재평가해 볼 수도 있고 수정후 배아의 분절율이 낮기 때문에 계속 사용되고 있으며 최근에는 미세보조수정술 보다는 보조부화술로써 더 널리 사용되고 있다[19-23]. 또한, PZD와 SUZI 공히 시술 자체의 특성 때문에 다정자증이 자주 유발되고, ICSI는 난자의 세포질에 손상을 주거나 정자 자체의 염색체 이상 때문에 수정에 실패하기도 하지만 심한 희소 무력 정자증, 기형정자증 그리고 폐쇄성 무정자증등에도 사용할 수 있기 때문에 흔히 이용된다[24]. 따라서 이러한 시술방법의 문제점을 보완하고 체계화하기 위해서는 동물실험을 통한 실험모델의 정립이 필요하다.

본 연구는 생쥐난자에 비해 실험 후 퇴행율이 낮고 인간정자의 침투능력을 실험하는데 가장 널리 사용되고 있는 햄스터난자를 실험 재료로 하여 인간정자와 햄스터정자를 이종간, 동종간에서 ICSI와 PZD를 시행한 후 수정율을 비교 조사함으로써 이들 방법들이 실제로 유용한지의 여부와 이 두 방법간의 차이를 비교 분석하여 임상적인 적용 가능성을 타진하고자 시도하였다.

재료 및 방법

(1) 실험군의 분류

난자에 0.1% trysin-EDTA (GibcoBRL, USA)를 처리하여 투명대층을 제거하고 수정하거나 난자 배양용액에 정자를 일정량 점적하여 수정한 군을 양성 대조군, 난자에 정자를 직접 주입하지 않고 미세바늘로 찔러서 물리적 자극만 준 군을 음성대조군으로 하고, ICSI 나 PZD를 수행한 군을 실험군으로 분류하였다

(2) 햄스터 난자의 준비

생후 6-8주된 암컷 햄스터에 25 IU PMSG를 주사한지 55-56 시간째 25 IU hCG를 복강 주사하여 과배란 유도를 시행하였다. hCG 투여 15-16시간 후 경추탈골법으로 햄스터를 희생시키고 난관만을 절제한 다음 칼슘이 제거되고 10% SSS가 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) 기본용액이 담긴 배양접시로 옮겼다. 해부현미경하에서 난관의 팽대부를 주사바늘로 찢고 난자-난구 복합체 (oocyte-cumulus cell complex)를 회수하였다. 회수한 난자-난구 복합체는 0.1% hyaluronidase가 포함된 기본용액에서 난구세포 (cumulus cell)를 제거하고, 정상적인 형태의 난자만을 선별하여 난자의 자발적 활성을 억제하기위해 기본용액에서 ICSI 시행 전까지 배양하였다.

(3) 인간정자의 준비

수음으로 채취된 정액을 상온에서 30분간 액화시키고 WHO 기준(1992)에 따라 정액검사를 시행하여 정상정자로 판정된 것만을 냉동보관해 두었다가 실험 당일날 해동하여 실험에 사용하였다. 해동된 정자는 Ham's F-10에 0.4% 소혈청이 첨가된 배양액으로 2회 원심분리 한 후 상층액을 제거하고 정자괴에 배양액 0.3 ㎖를 첨가하여 5% CO_2 배양기에 30분-1시간 동안 배양한 후 부유액을 실험에 사용하였다.

(4) 햄스터 정자의 준비

생후 8-10주된 수컷 햄스터의 정소 상체미부만을 적출하여 정자 부유용 배양액 (Ham's F-10) 소량 (0.4ml)이 들어있는 배양접시 내의 mineral oil (Sigma, USA)에 정소 상체 미부를 넣은 다음 해부현미경하에서 19게이지 바늘로 정소상체 미부를 절개하여 누출된 정자를 소량의 배양액으로 유도하여 정자 부유액을 준비하여 실험에 사용하였다.

정자의 수정능 획득을 위하여 정자 부유액을 37℃, 5% CO_2 배양기에서 1.5-2시간 동안 전배

양 하였다.

(5) ICSI

도립현미경 (Diaphot 300, Nikon, Japan)에 장착된 1쌍의 미세난자조작기 (NT-88, Narishige, Japan)를 이용하였으며, holding pipette은 외경과 내경이 각각 100-120 ㎛, 15-20 ㎛가 되게 만들고, injection pipette은 외경과 내경이 각각 8-9 ㎛, 4-5 ㎛ 인 것을 사용하였다. 준비된 운동성 정자를 oil이 덮인 배양접시 내의 10% polyvinylpyrolidone (PVP, Sigma)용액 소적에 넣어 운동성을 감소시키고, injection pipette을 이용하여 정자의 중편부 (midpiece)에 물리적인 힘을 가하여 비동화 (immobilization) 시켰다. 비동화된 정자를 꼬리 부위부터 injection pipette내로 흡입하고 준비된 햄스터 난자를 holding pipette을 이용하여 제 1 극체가 6시 또는 12시 방향이 되도록 고정한 후 injection pipette을 난자의 정 중앙인 3시에서 9시 방향으로 통과시켜 정자를 주입하였다. 정자주입시 injection pipette으로 난자의 세포질을 흡입하여 난황막 (oolemma)이 정확히 뚫렸음을 확인하고, 이 후 PVP용액이 난자 내로 들어가지 않도록 조심스럽게 정자와 흡입된 난자의 세포질을 주입하였다. 정자주입이 완료된 후 oil이 피복된 20 ㎕ human tubal fluid (HTF)용액 소적 마다 한 개씩의 난자를 넣어 5% CO_2 배양기내에서 배양하였다.

(6) PZD

Malter와 Cohen(1989)이 고안한 방법을 약간 수정하여 난자 고정 pipette으로 난자를 고정한 후 끝이 섬세한 dissection용 미세바늘을 난자의 극체로부터 멀리하여 투명대에 집어넣어 통과시킨 후 고정 pipette에서 난자를 유리시켜 고정 pipette 아래에 위치하게 한 다음 dissection용 바늘과의 사이에서 마찰을 시켜 부분적으로 투명대를 절개시켰다.

(7) Insemination

양성대조군과 PZD한 난자를 HTF 배양액 소적 (0.4 ㎖)에 15-20개씩 넣은 다음 정자 농도를 각각 10^5/㎖가 되도록 조정하고 5% CO_2 배양기내에서 6-7시간 동안 배양하여 수정을 유도한 후 수정여부를 판정하였다 (Figure 1-4).

(8) 수정확인

실험군과 대조군에서 실험 시행 1시간, 3시간, 그리고 7시간 후 난자를 관찰하여 퇴행여부를 조사하였고, 온전한 난자만을 회수하여 슬라이드 위에 옮겨 cover glass를 덮었다. 슬라이드를 고정액 (methanol:acetic acid=3:1)에 넣어 24시간 이상 고정시킨 후 0.25% acetic

lacmoid로 염색하여 도립현미경 ×40, ×200 배율하에서 주입된 정자의 상태를 관찰하였다. 이때 정자의 두부가 부풀었거나(head decondensation) 남성전핵 (male pronucleus)이 보일 경우 또는 2개의 전핵과 2개의 극체가 확인된 경우를 수정된 것으로 간주하였다 (Figure 1-4).

(9) 통계학적 검정

통계학적 분석방법으로는 X^2-test를 사용하였고, p 값이 0.05미만인 것을 유의한 것으로 판정하였다.

결과

1) 햄스터 난자와 인간정자를 이용한 ICSI와 PZD 후 수정율의 비교

ICSI와 PZD 방법으로 햄스터난자와 인간 정자의 수정을 유도한 결과는 Table 1.에서 처럼 2PN 형성율에 있어서는 ICSI와 PZD에서 각각 26.4%(24/91), 16.7%(9/54)으로 ICSI가 PZD에 비해 의의있게 높았으며($p<0.001$), 남성 전핵 만의 1PN 형성율에 있어서는 양성대조군, ICSI, PZD에서 각각 40%(48/120), 25.3%(23/91), 20.4%(11/54)로 양성대조군이 ICSI와 PZD에 비해 유의하게 높았고($p<0.001$). 정자의 두부 팽대 현상은 ICSI와 PZD를 수행한 실험군에서만 각각 20.9%(19/91), 13%(7/54) 두부 팽대율을 나타냈다. 전체적으로 양성대조군에서는 총 120개 난자 중에 77개(64.2%)가, ICSI에서는 총 91개중 67개(73.6%)가, PZD에서는 54개중 30개(55.6%)가 활성화 되어 이중에서 ICSI가 가장 유의하게 높은 수정율을 보였다($p<0.001$).

2) 햄스터 난자와 햄스터정자를 이용한 ICSI와 PZD 후 수정율의 비교

ICSI와 PZD 방법으로 햄스터난자와 햄스터정자의 수정을 유도한 결과는 Table 2.에서 처럼 2PN 형성율에 있어서는 양성대조군, ICSI, PZD에서 각각 21.3%(17/80), 7.5%(4/53), 40.9%(27/66)로 PZD군이 의의있게 높았으며($p<0.001$), 1PN 형성율에 있어서는 양성대조군, ICSI , PZD에서 각각 22.5%(18/80), 9.4%(5/53), 18.2%(12/66)로 양성대조군이 다소 높았다. 정자 두부 팽대율은 양성대조군, ICSI , PZD에서 각각 5.0%(4/80), 18.9%(10/53), 13.6%(9/66)로 ICSI를 수행한 실험군에서 다소 높았다. 전체적으로 양성대조군에서는 총 80개 난자 중에 41개(51.2%)가, ICSI에서는 총 53개중 21개(39.6%)가, PZD에서는 66개중 48개(72.7%)가 활성화 되어 이중에서 PZD가 가장 유의하게 높은 수정율을 보였다($p<0.001$, $p<0.05$).

고찰

1988년 이후 그동안 치유가 어려웠던 정자의 결함에 의한 남성요인의 불임환자에 대한 치료적 접근으로 난자와 정자의 미세조작을 이용한 다양한 미세보조수정술이 이용되기 시작하였고 이에 따라 보조생식술은 점차 발전을 거듭하게 되었다.[25,26] 맨 처음 미세보조수정술로서 PZD가 개발되었고,[20,23,27] 뒤이어 난자의 난황막 주위 공간 (perivetelline space)에 정자를 넣어주는 SUZI가 사용되었으며,[4,6,17,26,28] 마침내 정자를 난자의 세포질내에 직접 주입하는 ICSI 시술이 도입되어 임신성공 예가 점차 증가됨에 따라 최근 남성 불임의 치료에 대한 획기적인 방법으로 대두되고 있다.[17,29]

인간 이외의 다른 동물에서도 소[8]와 토끼[9]에서 ICSI를, 흰쥐[10]에서 PZD와 ICSI를 시행하여 수정을 확인하였고, 생쥐[11]와 양[12]에서는 ICSI를 통해 체외수정 및 번식에 성공하였다. 영장류에서는 Lanzendorf등[13]이 고릴라 난자에서 PZD에 의해 수정됨을 보고하였고, Hewitson[14]과 Sutovsky등[15]은 원숭이에서 ICSI를, 그리고 Ongnuki등[16]은 cynomolgus 원숭이에 ICSI와 PZD를 시행하여 수정됨을 관찰하였다.

이처럼 미세보조수정술은 인간 뿐만 아니라 여러종의 포유류에서 시행되고 있으나 그 결과 또한 다양하게 보고되고 있어 실험모델의 정립이 요구되어지고 있다. 본 연구에서는 실험수행 후 생쥐난자에 비해 퇴행율이 낮고 인간정자의 침투능력을 실험하는데 가장 널리 이용되고 있는 햄스터난자를 실험 재료로 사용하여 이종간 및 동종간에서 ICSI와 PZD를 시행하였다. 본 실험에서는 이종실험동물을 이용한 미세보조수정술에 있어서 ICSI가 대조군이나 PZD군 보다 유의하게 높은 수정율을 보여 Shibahara등[30]의 보고와 일치하진 않았지만 정상적인 정자를 이용하여 ICSI한 군의 비교에 있어서는 정자의 질적요인에 따라 수정율에 다소 차이가 있음을 보고하였던 점에서 결과는 제시하지 않았지만 본 연구 중의 경험과 유사한 경향을 보여 정상 정자 일수록 수정율이 높음을 간접 확인할 수 있었으며, ICSI 후 수정율이 74.7% 라고 보고한 류등[31]의 결과와도 유사하였다. 그러나 본 연구의 동종실험동물을 이용한 미세보조수정술에 있어서는 72.7%의 수정율을 나타냈던 PZD가 39.6% 수정율을 나타냈던 ICSI에 비해 유의하게 우수한 결과를 보였지만, 생쥐에서 PZD후 88.7%의 수정율을 보고하였던 김등[32]의 결과 보다는 다소 저조하였는데 이는, 종간 및 배양조건의 차이에서 비롯된 것으로 사료된다. 햄스터정자의 수정율에 있어서 본 연구에서는 양성 대조군이 51.2% ICSI군이 39.6%로 Goud등[33]의 대조군과 ICSI군에서 얻은 55.5%, 34.7% 의 수정율과 비슷한 양상을 나타냈고 실험동물로 양을 사용하였던 Gomez 등[12]이 보고하였던 62%, 30.6% 각각의 수정율 또한 본 실험 결과와 유사하였다. 이때 햄스터 난자에서 양성대조군에 비해 ICSI군에서의 낮은 수정율은 햄스터정자의 특수한 형태로 인해 난자 퇴행율이 상대적으로 증가한 것에 기인하지 않나 의심된다.

인간의 미세보조수정술에서 PZD는 고식적 체외수정술로 수정에 실패하거나 수정율이 낮은 불임 부부에 대한 대체 방안의 치료로써 적용되 왔으나[34] 기대할만한 수정율 및 임신 성적을 내지 못하고 다정자증이 빈번히 발생하여 문제점으로 지적되고 있다. 본 연구에서도 PZD와 ICSI 후 다정자증 발생율이 15:1로 나타나 PZD에서의 발생빈도가 높았다. 또 한편으로 ICSI는 최근에 부고환 이나 고환에서 직접 채취된 정자로도 수정과 임신에 이르게하여 무정자증등에 의한 남성 불임환자에 있어 치료대상을 확대해 가고 있다.[35] 그렇지만 ICSI는 수정율이 시술후 60-70% 정도로 상당수의 난자 손상에 의해 아직도 고식적인 정자 점적에 의한 체외수정 (insemination)에 비해 낮고 ,[29,36] 명확치 않은 원인으로 인해 전핵 수에 있어서 비정상을 보이며, 가끔 수정에 실패하거나 극히 저조한 수정율을 나타내기도 한다.[37] 그래서 이러한 저조한 수정율 및 수정실패의 원인을 밝혀내기 위해 전자 현미경적인 관찰과 분자생물학적인 규명이 요구되기도 한다. 수정실패의 정자 원인 규명을 위해 가장 바람직한 재료로 ICSI 시행후 수정에 실패한 난자를 분석하는 방법이 있겠으나, 이는 사용할 수 있는 인간 난자 수의 제한과 주입되는 정자의 특성을 비교하는데 임상 과 윤리적인 측면에서 많은 제한과 어려움이 뒤따르고 있어 인간난자 대신 햄스터나 생쥐와 같은 실험동물의 난자를 이용한 모델의 정립이 필요할 것으로 보인다.

햄스터 난자에 인간정자와 햄스터 정자를 각각 ICSI나 PZD한 후 수정율을 조사하고 두 방법간의 차이를 비교한 본 연구의 성적을 요약하면 햄스터난자에 인간정자를 ICSI하거나 PZD한 결과 수정율이 음성대조군, 양성대조군, ICSI군, PZD군에서 3.6%, 64.2%, 73.6%, 55.6%로 ICSI군 만이 양성대조군에 비해 유의하게 높은 수정율을 나타냈고 ($p<0.01$), 햄스터난자에 햄스터 정자를 ICSI하거나 PZD한 실험에서는 수정율이 음성대조군, 양성대조군, ICSI군, PZD군에서 11.1%, 51.2%, 39.6%, 72.7%로 PZD군 만이 양성대조군에 비해 유의하게 높은 수정율을 나타냈으나($p<0.01$) ICSI군은 양성대조군과 유의한 차이가 없었으며, PZD군이 ICSI군에 비해 유의하게 우수한 수정율을 보였다 ($p<0.05$). 결론적으로 햄스터난자를 이용한 ICSI와 PZD방법의 체외수정에 있어서 인간정자로는 ICSI가, 햄스터정자로는 PZD방법이 더 유용할 것으로 사료되며, 햄스터 난자를 이용한 인간 정자로의 미세보조수정술에 대한 실험 모델로는 ICSI 방법이 타당할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Hiramoto Y. Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. Exp Cell Res 1962;27:416-426.

2. Uehra T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. Biol Reprod 1976;15:467-470.

3. Malter HE, Gohen J. partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. Fertil. Steril 1989;51:139-148.

4. Ng SC, Bongso A, Ratnam SS, Sathananthan H, Chan CL, Wong PC, et al. Pregnancy after transfer of sperm under zona. Lancet 1988;ii:790.

5. Mann J. Full term development of mouse eggs fertilized by a spermatozoon microinjected under the zona pellucida. Biol Reprod 1989;38:1077-1083.

6. Fishel S, Timson J, Lisi F, Rinaldi L. Evaluation of 225 patients undergoing subzonal insemination for the procurement of fertilization in vitro. Fertil Steril 1992;57:840-849.

7. Lanzendorf SE, Maloney MD, Veeck LL, Slusser J, Hodgen GE, Rosenwaks Z. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. Fertil Steril 1988;49:835-842.

8. Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. Vet Rec 1990;127:517-520.

9. Sato K, Kaneta H. Development of rabbit embryos from eggs injected microsurgically with sperm cells. In: Iizuka R, Semm K, Mettler L et al. editer. Human Reproduction. Excerpta Medica, Amsterdam: New York; 1988.

10. Dozortsev D, Wakaima T, Ermilov A, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the rat. Zygote 1998;6(2):143-147.

11. Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. Biol Reprod 1995;52:709-720.

12. Gomez MC, Catt JW, Evans G, Maxwell WM. Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. Theriogenology 1998;49(6):1143-1154.

13. Lanzendorf SE, Holmgren WJ, Schaffer N. In vitro fertilization and gamete micromanipulation in the lowland gorilla. J Assist Reprod 1992;9:358-364.
14. Hewitson LC, Simerly CR, Tengowski MW. Microtubule and chromatin configurations during rhesus intracytoplasmic sperm injection: successes and failures. Biol Reprod 1996;55:271-280.
15. Sutovsky P, Hewitson L, Simerly CR. Intracytoplasmic sperm injection for Rhesus monkey fertilization results in unusual chromatin, cytoskeletal, and membrane events, but eventually leads to pronuclear development and sperm aster assembly. Hum Reprod 1996;11:1703-1712.
16. Ogonuki N, Sankai T, Cho F, Sato K, Yoshikawa Y. Comparison of two methods of assisted fertilization in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis): intracytoplasmic sperm injection and partial zona dissection followed by insemination. Hum Reprod 1998;13:2555-2560.
17. Palermo G, Joris H, Devroey P. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992;340:17-18.
18. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In Knobil E, et al.(eds), The Physiology of Reproduction. Raven Press, New York, USA, 1988 pp. 135-185.
19. Tarin JJ. Subzonal insemination, partial zona dissection or intracytoplasmic sperm injection? An easy decision? Hum Reprod 1995;10:165-170.
20. Cohen J, Alikani M, Malter HE. Partial zona dissection of subzonal sperm insertion: microsurgical fertilization alternatives based on evaluation of sperm and embryo morphology. Fertil Steril 1991;56:696-706.
21. Tucker MJ, Bishop FM, Cohen J, Wiker SR, Wright G. Routine application of partial zona dissection for male factor infertility. Hum Reprod 1991;6:676-681.
22. Payne D, McLaughlin KJ, Depypere HT, Kirby CA, Warnes GM, Matthews CD. Experimence with zona drilling and zona cutting to improve fertilization rates of human oocytes in vitro. Hum Reprod 1991;6:423-431.
23. Cohen J, Alikant M, Trowbridge J. Implantation engancement by selective assisted hatching using zona drilling of embryos with poor prognosis. Hum Repod 1992b;7:685-691.
24. Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z. Lissens W, Van Steirteghem A. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective

approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deference. Fertil Steril 1994;61:1045-1051.
25. Cohen J, Malter HE, Fehilly C. Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. Lancet 1988;2:162.
26. Fishel S, Antinort S, Jackson P, Jhonson J, Rinaldi L. Presentation of six pregnancies established by sub-zonal insemination(SUZI). Hum Reprod 1991;6:124-130.
27. Cohen J. A review of clinical microsurgical fertilization. In: Cohen J, Malter HE, Talansky BE, Glifo J. eds: Micromanipulation of human gametes and embryos. New York: Raven Press. 1992:163-190.
28. Wolf JP, Bucot B, Kunstmann JM. Influence of sperm parameters on outcome of subzonal insemination in the case of previous IVF failure. Hum Reprod 1992;7:1407-1413.
29. Palermo G, Joris H, Derde MP, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem AC. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1993;59:826-835.
30. Shibahara H, Mitsuo M, Inoue M, Hasegawa A, Shigeta M, Koyama K. Relationship between human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection and the zona-free hamster egg penetration test. Hum Reprod 1998;13:1928-1932.
31. 류범용, 김희선, 오선경, 서창석, 김석현, 최영민, 등. 햄스터 난자를 이용한 인간정자의 미세주 입법에 관한 연구. 대한불임학회잡지 1996;23:115-120.
32. 김해중, 이정재, 김탁, 김영태, 김선행, 구병삼. 생쥐 미수정란을 이용한 Partial Zona disection 과 Zona Drilling의 수정율 및 배발달율에 관한 연구. 대한불임학회잡지 1993;20:237-242.
33. Gaud PT, Goud AP, Rybouchkin AV, De Shtter P, Dhont M. Chromatindecondensation, pronucleus formation, metaphase entry and chromosome complements of human spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection into hamster oocytes. Hum Reprod 1998;13:1336-1345.
34. Cohen J, Malter H, Wright G, Kort H, Massey J, Mitchell D. Partial zona dissection of human oocytes when failure of zona pellucida penetration is anticipated. Hum Reprod 1989;4:435-442.
35. Silber SJ, Nagy Z, Lju J, Tournaye H, Lissens W, Ferec C, et al. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injenction: the

genetic implications for male infertility. Hum Reprod 1995;10:2031-2043.
36. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, et al. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Reprod of a second series of 300 consecutive treatment cycles. Hum Reprod 1993;8:1055-1060.
37. Payne D, Flaherty SP, Jeffrey R, Warnes GM, Matthews CD. Successful treatment of severe male factor infertility in 100 consecutive cycles using intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Hum Reprod 1994;9:2051-2057.

Table 1. Pronucleus formation rate in hamster oocytes following ICSI and PZD with human spermatozoa.

Group	No. of oocytes	No. of oocyte survived (%)	No. of oocyte fertilized (%)						
			2PN	1PN	Swollen sperm head	MIII	Total activation	MII	DG
Control (negative)	56	55(98.2)	0(0)	0(0)	0(0)	2(3.6)	2(3.6)	53(96.4)	3(5.6)
Control (positive)	120	120(100)	29(24.2)	48(40.0)*	0(0)	0(0)	77(64.2)*	43(35.8)	0(0)
ICSI	96	91(94.8)	24(26.4)*	23(25.3)*	19(20.9)	1(1.1)	67(73.6)*	25(27.5)	4(4.2)
PZD	59	54(91.5)	9(16.7)*	11(20.4)*	7(13.0)	3(5.6)	30(55.6)	24(44.4)	5(8.5)

2PN; oocytes had two pronuclei and two polar bodies.
1PN; oocytes had one pronuclei and two polar bodies.
MIII; oocytes had two polar bodies without pronucleus formation.
MII; oocytes had one polar body. DG; degeneration
* $p<0.001$

Table 2. Pronucleus formation rate in hamster oocytes following ICSI and PZD with hamster spermatozoa.

Group	No. of oocytes	No. of oocyte survived (%)	No. of oocyte fertilized (%)						
			2PN	1PN	Swollen sperm head	MIII	Total activation	MII	DG
Control (negative)	30	27(90)	1(3.7)	1(3.7)	0(0)	1(3.7)	3(11.1)	24(88.9)	3(10)
Control (positive)	86	80(93.0)	17(21.3)	18(22.5)	4(5.0)	2(2.5)	41(51.2)[a]	41(51.3)	6(7)
ICSI	71	53(74.7)	4(7.5)*	5(9.4)	10(18.9)	2(3.8)	21(39.6)[b]	32(60.4)	18(25.3)
PZD	67	66(98.5)	27(40.9)*	12(18.2)	9(13.6)	0(0)	48(72.7)[c]	18(27.3)	1(1.5)

*$p<0.001$, [a,c] $p<0.001$, [b,c] $p<0.05$

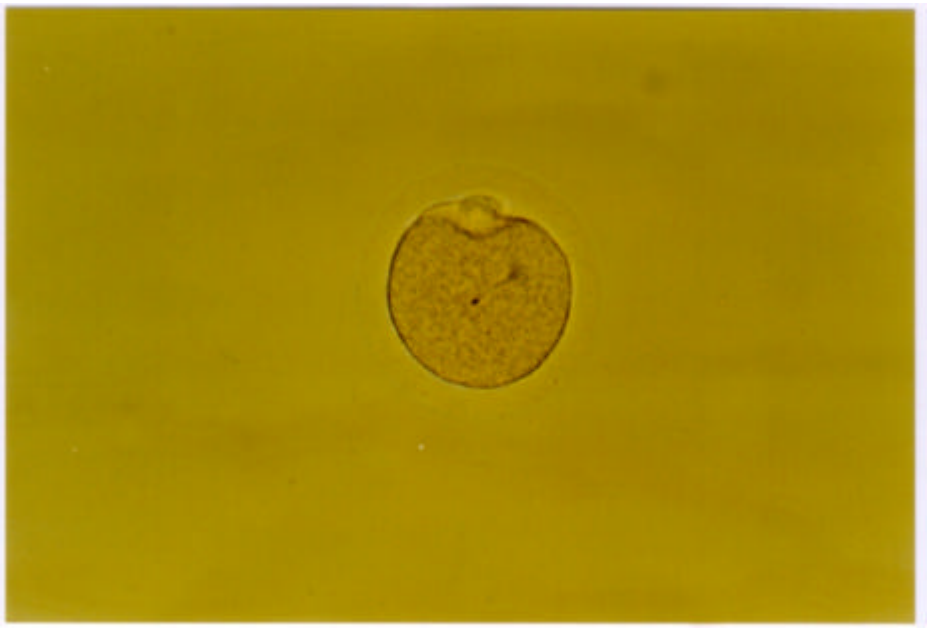

Fig. 1. A human sperm nucleus in early stage of swelling, 1 hour after ICSI. X 200

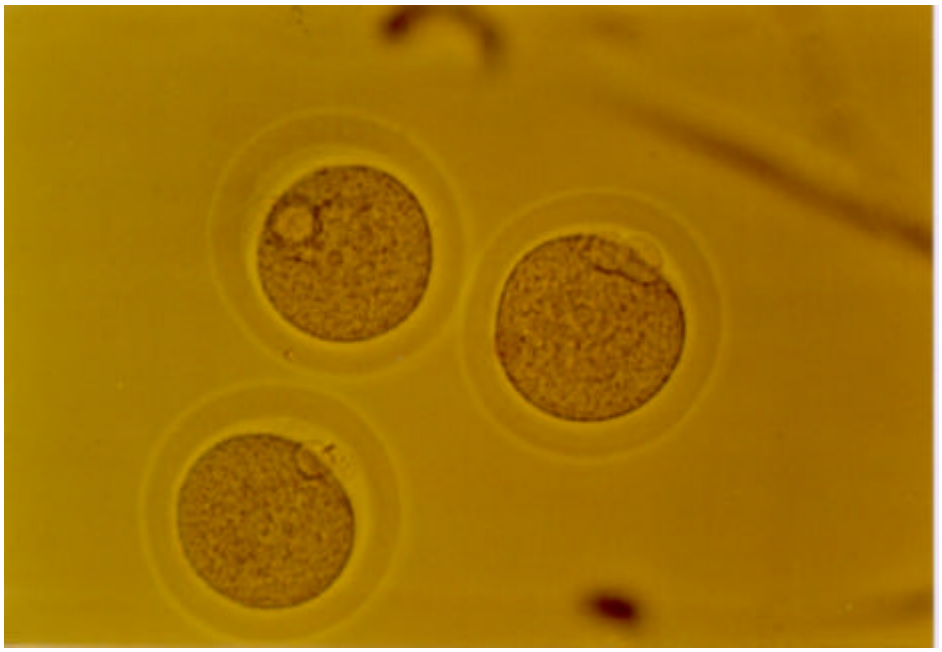

Fig. 2. Hamster eggs with 1 pronucleus(male pronucleus) , 7 hour after ICSI . X200

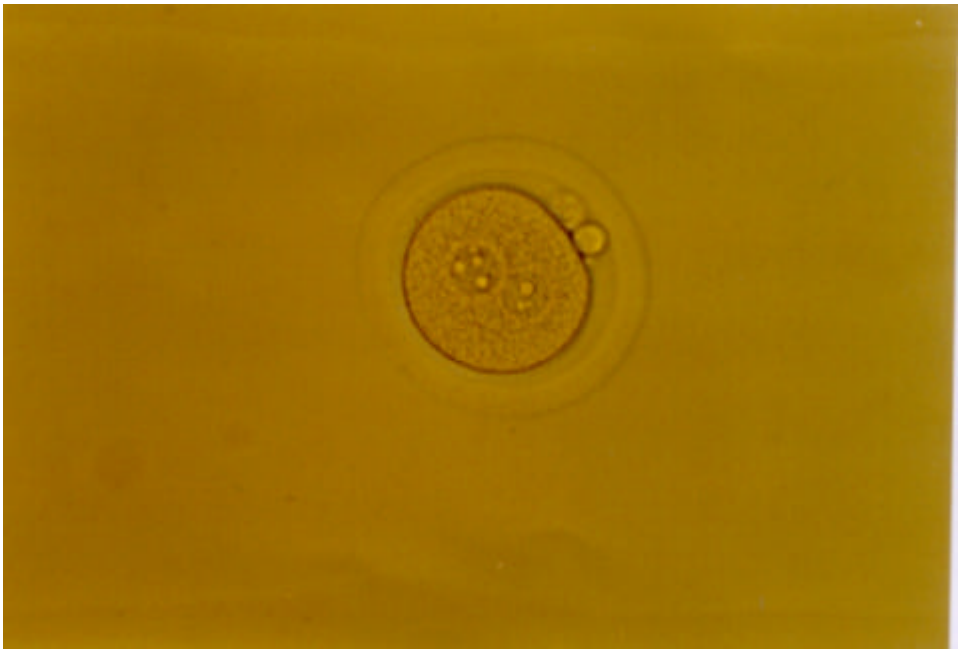

Fig. 3. A hamster egg with 2 pronucleus, 7 hour after ICSI. X200

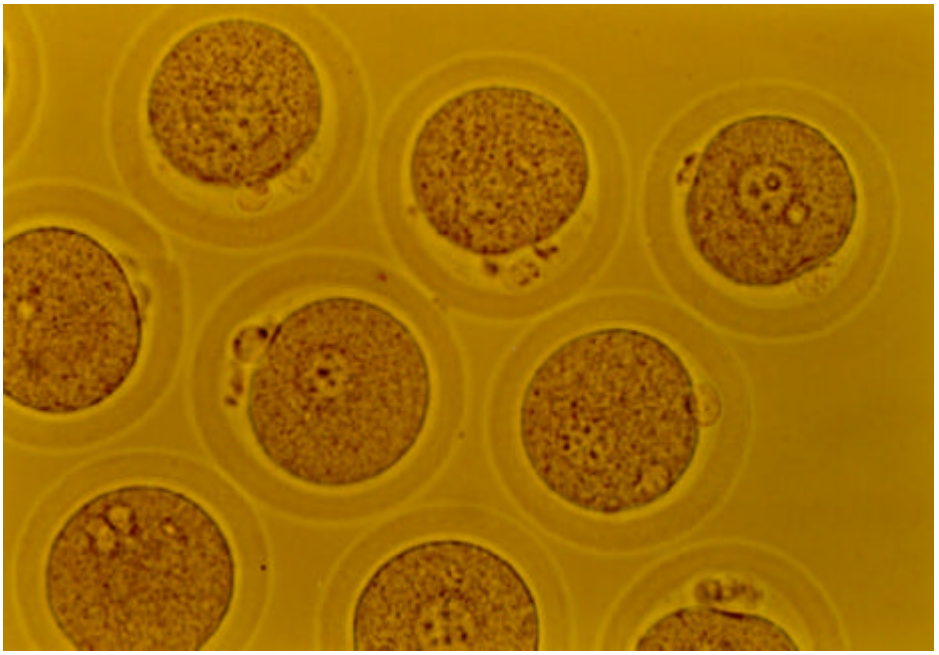

Fig. 4. Hamster eggs with 1PN, 7 hour after ICSI. X200