大韓不妊學會誌: 第29卷 第4號 2002
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 29, No. 4, 2002, 12

유전질환 및 염색체 이상의 예방을 위한 착상전 유전진단의 결과

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 산부인과, 불임연구실[1], 유전학 연구실[2]

김진영 · 임천규[1] · 송인옥 · 유근재 · 양광문 · 한국선 · 허 걸 · 송지홍
전진현[1] · 민동미[1] · 박소연[2] · 전종영 · 궁미경 · 강인수

Outcome of Preimplantation Genetic Diagnosis for Chromosome Aneuploidy and Genetic Disease

Jin Yeong Kim, Chun Kyu Lim[1], In Ok Song, Keun Jai Yoo, Kwang Moon Yang, Kuk Sun Han, Kuol Hur, Ji Hong Song, Jin Hyun Jun[1], Dong Mi Min[1], So Yeon Park[2], Jong Young Jun, Mi Kyoung Koong, Inn Soo Kang

Department of Obstetrics and Gynecology, Laboratory of Reproductive Biology and Infertility[1], Laboratory of Genetics[2], Samsung Cheil Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine

Objectives: Chromosome aneuploidy is associated with recurrent abortion and congenital anomaly and genetic diseases occur repeatedly in the specific families. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) can prevent aneuploidy or genetic disease by selecting normal embryos before implantation and is an alternative to prenatal diagnosis. The aim of this study is to assess the outcome of PGD cycles by using FISH or PCR, and to determine the clinical usefulness and values in patients with risk of chromosomal aneuploidy or genetic disease.

Materials and Methods: From 1995 to Apr. 2001, a total of 108 PGD cycles in 65 patients with poor reproductive outcome were analyzed. The indications of PGD were translocation (n=49), inversion (n=2), aneuploidy screening (n=7), Duchenne muscular dystrophy (n=5) and spinal muscular atrophy (n=2). PGD was applied due to the history of recurrent abortion, previous birth of affected child or risk of aneuploidy related to sex chromosome aneuploidy or old age. Blastomere biopsy was performed in 6~10 cell stage embryo after IVF with ICSI. In the single blastomere, chromosome aneuploidy was diagnosed by using FISH and PCR was performed for the diagnosis of exon deletion in DMD or SMA.

Results: The FISH or PCR amplification was successful in 94.3% of biopsied blastomeres. The rate of transferable balanced embryos was 24.0% in the chromosome translocation and inversion, 57.1% for the DMD and SMA, and 28.8% for the aneuploidy screening. Overall hCG positive rate per transfer was 17.8% (18/101) and clinical pregnancy rate was 13.9% (14/101) (11 term pregnancy, 3 abortion, and 4 biochemical pregnancy). The clinical pregnancy rate of translocation and inversion was 12.9% (11/85) and abortion rate was 27.3% (3/11). In the DMD and SMA, the clinical pregnancy rate was 33.3% (3/9) and all delivered at term. The PGD results were confirmed by amniocentesis and were

주관책임자: 강인수, 우) 100-380 Department of Obstetrics and Gynecology, Samsung Cheil Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine, Mook Jung-Dong 1-19, Chung-Ku, Seoul, Korea
Tel: (02) 2000-7581, Fax: (02) 2000-7790, e-mail: ikang6@users.unitel.co.kr

correct. When the embryos developed to compaction or morula, the pregnancy rate was higher (32%) than that of the cases without compaction (7.2%, p<0.01).

Conclusions: PGD by using FISH or PCR is useful to get n ormal pregnancy by reducing spontaneous abortion associated with chromosome aneuploidy in the patients with structural chromosome aberration or risk of aneuploidy and can prevent genetic disease prior to implantation.

Key Words: PGD, Chromosome aneuploidy, Genetic disease, FISH, PCR

착상전 유전진단 (PGD: preimplantation genetic diagnosis)은 착상전의 배아에서 유전적인 분석을 할 수 있는 새로운 기법으로서, 염색체 이상 또는 유전질환의 유전 위험이 있는 가계에서 정상 염색체 및 유전질환에 이환되지 않은 건강한 임신을 할 수 있는 방법으로 알려져 있다. 그 방법은 체외수정시술과 미세조작술로 수정된 배아에서 분열중인 상태의 할구세포를 1~2개 분리하여, 염색체 진단 또는 유전진단을 한 후 정상적인 배아를 이식하게 된다. 기존의 산전진단이 그 결과에 따라 임신 종료를 결정하는데 비하여, 착상전 유전진단은 착상전의 배아에서 진단을 하여 정상적 배아만을 이식하여 임신하도록 함으로써, 정신적, 육체적인 고통이 수반되는 임신 종료를 피하고, 유전질환이나 염색체 이상 환아의 출생을 예방할 수 있는 방법이다. 최초의 착상전 유전진단은 X-연관 유전질환이 있는 가계에서 이환되지 않은 여아를 진단해내기 위해 수정된 배아의 1개의 할구로부터 PCR (중합효소연쇄반응, polymerase chain reaction)을 통한 유전진단을 시행함으로써 이루어졌으며,[1] 현재까지 점차 다양한 단일 유전자 질환에서 착상전 유전진단이 보고되고 있다.[2]

또한 염색체 이상이 있거나 고령 등으로 염색체 이수성의 위험이 높은 경우에서도 착상전 유전진단을 통해 염색체 이상의 출생을 예방하고 임신 유지율을 향상시킬 수 있고,[3,4] 상호 전좌나 로벗슨 전좌 등 염색체의 구조적 이상에서도 염색체적으로 불균형한 배우자 (unbalanced gamete)가 생성되기 때문에 염색체 이수성과 관련된 습관성 유산이나 기형을 초래할 위험이 높아, 이런 경우에도 할구 또는 난자의 극체에서 FISH 기법 (형광직접보합법, Fluorescent in situ hybridization)을 이용한 착상전 유전진단으로 정상 염색체를 갖는 배아를 이식함으로써 유산율을 감소시킬 수 있다.[5,6] 단일 유전자 질환 중 듀센 유형 근이양증 (DMD: Duchenne Muscular Dystrophy)는 치명적인 X-연관 유전질환 중 가장 흔한 질환으로 3500 남아 출생 당 1명의 발생 빈도를 보이고 치료가 불가능하여 대개 20세 이전에 사망하게 되므로 이환아의 출산의 예방이 필요하다. X-연관 열성 질환이며, dystrophin 유전자의 exon 일부 결실이 관련되므로, 착상전 유전진단의 적용에 있어 정상 여아를 진단해내거나,[7] 그 가계에서 알려진 exon 결실에 대한 PCR 기법으로 진단할 수 있다.[7~9]

척수성 근위축증 (SMA: Spinal Muscular Atrophy)도 듀센 유형 근이양증 다음으로 흔한 근육질환으로 상염색체 열성 유전이며 1/10000의 빈도로 나타나고, 보인자는 1/50의 빈도로 나타난다. 대칭적인 근육 약화를 나타내고 염색체 5q13 부위의 이상과 관련되어 있으며 SMN 유전자 (Spinal Motor Neuron gene)의 이상을 진단함으로써 착상전 유전진단이 가능하다.[10] 최근 FISH나 PCR 등의 분자생물학적 기법의 발전으로 1개의 할구세포에서의 유전진단이 더 간편하고 정확해져,[11,12] 다양한 단일 유전자 질환의 진단과 염색체 이상의 스크리닝 등에 착상전 유전진단이 적용되고 있다.

본원에서는 1995년부터 X-연관 유전질환에서의 착상전 유전진단을 시작으로, X-연관 유전질환인 듀센 유형 근이양증, 상염색체 열성 질환인 척수성 근위축증 등의 단일 유전자 질환과 습관성 유산을 동반하는 염색체의 숫적, 구조적 이상의 예에서 착상전 유전진단을 시행하여 왔으며, 이에 그 시행 결과를 분석하고 그 효용성과 임상적 가치에 대하여 고찰해 보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1995년부터 2001년 4월까지 착상전 유전진단을 시행했던 총 65예의 환자에서 108 체외수정 주기를

Table 1. Reasons for PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis)

	N
RSA	43
RSA+affected baby or TOP	4
Affected baby	7
TOP due to anomaly	5
Aneuploidy screening	6
Total	65

RSA : recurrent spontaneous abortion,
TOP : termination of pregnancy

Table 2. Indications for PGD

	N	Cycles
Reciprocal translocation	39	69
Male	20	
Female	19	
Robertsonian translocation	10	19
Male	0	
Female	10	
Inversion	2	3
DMD	5	7
SMA	2	2
Aneuploidy screening	7	8
Old age	3	
Sex chromosome mosaic	4	
Total	65	108

대상으로 하였다. 환자들이 착상전 유전진단을 하게 된 동기는 습관성 유산이 43예로 가장 많았고, 이전에 염색체 이상, 선천기형이나 유전질환에 이환된 환아가 있는 경우가 7예, 이 두 가지가 복합된 경우가 4예, 선천기형으로 임신 종료를 경험한 경우가 5예, 부부의 성염색체 모자이크나 고령, 반복적 착상 실패로 인한 염색체 이수성의 진단 목적이 6예였다 (Table 1). 적응증별로 보면 염색체 상호 전좌가 39예, 69주기, 로벗슨 전좌가 10예, 19주기, 염색체 역위 (염색체 9, 6의 pericentric inversion) 2예, 3주기, 염색체 이수성 진단 목적이 7예, 8주기였으며, 듀센 유형 근이양증 5예, 7주기, 척수성 근위축증 2예, 2주기였다 (Table 2).

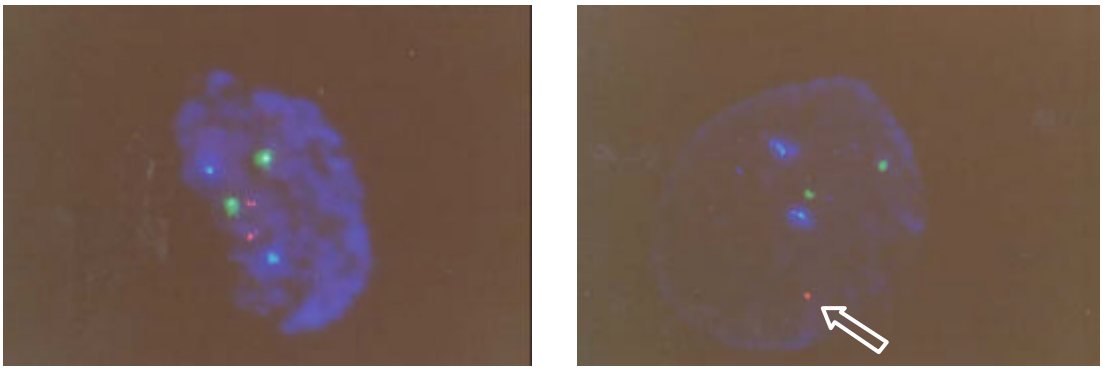
이들에서 체외수정시술 후 배아의 할구를 이용하였으며, 염색체 전좌 및 역위에서는 telomeric probe와 centromeric probe (CEP: chromosome enumeration probe)를 이용한 FISH 기법을 이용하여 진단하였고 (Figure 1), 근이양증 및 척수성 근위축증에서는 PCR을 이용하여 exon deletion을 진단함으로써 착상전 유전진단을 시행하였다.

2. FISH probe를 이용한 말초혈액 림프구 (peripheral lymphocyte)의 중기 염색체 분석

기존의 보고된 방법을 이용하였으며,[13] 보인자의 혈액 5 ml를 heparin이 포함된 시험관에 채취하여 이 혈액 300 ?l를 20% fetal bovine serum (FBS, Gibco)과 20 ?g/ml phytohemaglutinin (PHA, Gibco)이 첨가된 Ham's F-10 배양액에 넣어, 37℃, 5% CO, 95% 공기중 배양기에서 배양하였다. 72시간 배양 후 10 ?g/ml colcemid (Gibco) 용액 100 ul를 첨가한 후 50분간 배양하였다. 배양 후 저장액인 0.075 M KCl (Sigma) 용액 5 ml을 30분간 처리하였다. 그 후 -20°C에 보관된 고정액 (Carnoy's solution, methanol : acetic acid= 3 : 1)으로 고정한 다음, 4℃에 준비해둔 slide glass에 림프구의 간기와 중기 염색체의 spread를 만들었다. 준비한 림프구 spread에서 FISH를 시행하여 사용된 probe가 진단에 적합한지 그 효율성을 조사하였다.

3. 난자의 채취 및 수정

과배란 유도는 Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonist (Superfact, Serono, USA)와 human follicular stimulating hormone (Metrodin, Serono, USA), human menopausal gonadotropin (Pergonal, Serono, USA)를 이용한 황체기 중간 장기 요법을 이용하였다. 초음파로 난포의 크기를 관찰하여 최소한 18 mm 이상의 난포가 2개 이상, estradiol 농도가 500 pg/ml이 되었을 때 human chorionic gonadotropin (hCG) 10,000 IU를 주사하였고, hCG 주사 후 36시간에 질식 초음파를 이용하여 난자 채취를 하였다. 채취된 난자는 10% synthetic serum substitue (SSS; Irvine Sci, Sant Ana, CA, USA)가 첨가된 HTFM 배양액에 넣어 37°C, 5%



A B

Figure 1. FISH signal in balanced and unbalanced embryo of translocation. **(A)** balanced embryo of patients with 46,XX,t(14;18)(q11.2;q21.2). Two green signals for chromosome 10 (CEP 10), 2 orange signals for chromosome 14q (TelVysion 14q) and 2 aqua signals for chromosome 18 (CEP 18). **(B)** unbalanced embryo of patient with 46,XY,t (7;16)(q22;q22). Two green signals for chromosome 7 (CEP 7), 1 orange signal (white arrow) for chromosome 16 (TelVysion 16q) and 2 aqua signals for chromosome 18 (CEP 18).

CO_2, 95% 공기중 배양기에서 3~4시간 배양하였다. 배양 후 성숙된 난자에서 세포질내 정자주입술 (ICSI, Intracytoplasmic Sperm Injection)을 시행하였으며, 16~18시간 후에 수정을 확인하였다.

4. 할구의 분리와 핵의 준비

수정이 확인된 수정란을 48시간 배양한 후 6~10세포기에 1~2개의 할구를 분리하였다. 배아를 Ca^{2+}, Mg^{2+}가 들어 있지 않은 Modified Tyrode (T6) 배양액에서 10분간 처리한 후 내경 20 ?m의 pipette과 acidified Tyrode 용액으로, 투명대의 일부를 제거하였다. 투명대 제거 후 동일한 pipette으로 핵이 뚜렷한 할구를 분리하였다. 할구의 분리 후에 할구에서 핵을 관찰할 수 없거나 할구의 핵이 2개 이상 관찰되었을 경우에는 한 개의 할구를 더 분리하였다. 할구가 분리된 배아는 T6 배양액으로 세척한 후 10% SSS가 첨가된 HTFM 배양액에서 배양하였다. 분리해낸 할구는 0.6% bovine serum albumin (Gibco)이 첨가된 0.5% trisodium citrate (Sigma) 저장액에 5분간 처리하였다. Slide glass 위에 저장액 소적을 만들고 할구를 옮겼다. 현미경하에서 할구의 세포막이 터지는 것과 할구 핵의 위치를 확인하였다. 저장액이 완전히 증발하도록 공기중에서 건조시킨 후 현미경하에서 관찰하면서 -20°C에 보관했던 고정액을 떨어뜨려 세포질을 제거하면서 할구의 핵을 고정하였다. 할구의 세포질이 완전히 제거되면 고정액을 완전히 건조시킨 후, 70, 85, 100% ethyl alcohol을 각각 2분씩 처리하여 탈수시켰다.

5. 할구세포에서 FISH의 시행과 결과 확인

FISH probe는 각 염색체 이상에 따라 특이 telomeric probe과 다른 염색체에 대한 centromeric probe를 사용하였다. Aneuploidy screening의 경우에는 염색체 13,16,18,21,X,Y에 대한 probe를 이용하였다. Probe 혼합액을 12 mm 원형 cover glass (Fisher Scientific)에 넣고, 할구의 핵이 준비된 Slide glass에 올려 놓고 rubber cement로 밀봉하였다. 75°C hot plate에서 5분간 denaturation시킨 후 humidified chamber에서 6~16시간 동안 hybridization시켰다. Hybridization 후 사용된 probe의 특성에 따라서, 50% formamide/2X SSC, 2X SSC, 2X SSC/0.1% NP-40 buffer에서 각각 10분, 10분, 5분씩 세척하여, 잔여 probe를 제거하였다. 세척 후 125 ng/ml DAPI가 첨가된 antifade mounting solution (Vysis)으로 mounting 하고 형광현미경 (Optiphot-2, Nikon)으로 FISH signal을 확인하였다. 결과 확인시 2개 이상의 signal이 근접해 있을 경우에 2 signal의 거리가 signal 크기의 2배 이상이면 2개의 signal로, 2배 이하이면 한 개의 signal로 판정하였다.[14] 정상으로 판정된 배아를 난자 채취 4일째에 자궁내 이식하였다.

Table 3. Results of PGD cycles

	Reciprocal trasnlocation	Robertsonian translocation	Inversion	DMD	SMA	Aneuploidy screening
No. of patients	39	10	2	5	2	7
No. of cycles	69	19	3	7	2	8
No. of transfer	65	18	2	7	2	7
No. of oocytes	1173	269	61	140	45	161
No. of fertilized oocytes	804	148	49	94	27	113
No. of successfully biopsied embryos	732	146	31	81	19	87
No. of diagnosed embryos	697	142	31	67	17	80
Rate of normal embryos (%)	23.0%	24.6%	45.2%	59.7%	47.1%	28.8%
Mean No. of ET*	2.3±0.2	1.9±0.3	4.5±0.5	3.4±0.7	4.0±0.0	3.3±0.5
Positive hCG	11	3	1	2	1	0
Clinical PR (%)						
per cycle	11.6% (8/69)	10.5% (2/19)	33.3% (1/3)	28.6% (2/7)	50.0% (1/2)	0
per ET	12.3% (8/65)	11.1% (2/18)	50.0% (1/2)	28.6% (2/7)	50.0% (1/2)	0
per patient	20.5% (8/39)	20.0% (2/10)	50.0% (1/2)	40.0% (2/5)	50.0% (1/2)	0

*: mean±SE, ET : embryo transfer, PR : pregnancy rate

6. 듀센 유형 근이양증 및 척수성 근위축증 환자에서 PCR의 시행

기존의 보고된 방법을 이용하였다.[15,16] 핵이 존재하는 할구 하나를 분리하여 세척한 후 미리 준비된 증류수 10 ㎕와 mineral oil 50 ㎕가 덮인 PCR 튜브에 넣고 -70℃에서 동결 융해 과정을 3회 반복 후 표준 대조군으로 할구가 포함되지 않은 배지만을 튜브에 넣고 실험을 병행하였다. 미량의 DNA의 증폭을 위해 PEP (primer extension preamplification)을 시행하였다. PEP 혼합 용액을 첨가한 후 Taq polymerase (5 U/㎕ Perkin Elmer Cetus)를 넣어 혼합액이 잘 섞이도록 짧게 원심분리하였으며, PCR은 92℃에서 30초, 37℃에서 90초, 55℃에서 3분의 조건으로 45회 반복 증폭시켰다.

1) 듀센 유형 근이양증

PEP-PCR 산물 5 ㎕씩을 template로 하여 목적에 따른 특이 유전자에 대한 증폭을 시행하였다. Dystrophin 유전자 exon 46, 47의 결실로 밝혀진 가계에서 이들에 대한 primer와 Y 염색체 특이 부위에 대한 primer (DYZ3)를 이용하여 PCR을 시행하였다.[16,17]

2) SMA

SMN gene의 exon 7, 8에 대한 PCR을 시행한 후 각 exon에 절단 부위를 갖는 *Dra*I, *Dde*I 제한효소를 처리하였다. 0.8% agarose gel상 전기영동을 시행하여 exon의 결실을 확인하여 진단하였다.[15]

결 과

착상전 유전진단의 임상적 결과는 Table 3과 같다. 총 1235개의 수정란을 얻어 이중 1116개에서 할구 생검을 시도하여 1096개의 배아에서 성공적으로 할구의 생검이 가능했으며, 이중 94.3%인 1034개의 배아에서 FISH signal이나 PCR을 이용한 유전자 부위 증폭을 얻어 진단이 가능하였고 (Figure 1), 62개의 배아에서는 (5.6%) 진단에 실패하였다. 진단이 가능했던 생검된 할구 중 정상 할구의 비율은 각각 염색체 상호 전좌에서 23.0%, 로벗슨 전좌에서는 24.6%, 역위에서는 45.2%였으며, 듀센 유형 근이양증과 척수성 근위축증에서는 각각 59.7%, 47.1%로, 염색체 전좌에서는 특히 비정상 배아율이 높은 것을 알 수 있었다. 총 14주기에서 임상적 임신이 이

Table 4. Confirmation of pregnancy outcome of PGD

Patients	Confirmation with amniocentesis	Outcome
Reciprocal translocation		
46,XY,t(1;2)(q31;p23)		Biochemical
46,XX,t(2;22)(q14.3;q13)	46,XY,t(2;22) (q14.2;q13.3)	Term
46,XY,t(6;11)(q23;p13)		Biochemical
46,XY,t(Y;15)(q12;p11)	NA	Abortion (anembryonic pregnancy)
46,XX,t(12;19)(q12;p11)	46,XX,t(12;19) (q12;q13.3)	Term
46,XX,t(5;15)(q22;q26)	46,XX	Term
46,XY,t(7;16)(q22;q22)	45,XO*	Abortion
46,XY,t(6;7)(q25.2;q21.3)	46,XX	Term
46,XX,t(12;13)(q21.2;q32)		Biochemical
46,XY,t(9;17)(q21;p11.2)	46,XY	Term
46,XX,t(11;22)(q23;q11)	47,XX,+der(22)t(11;22)(q23;q11)**	Abortion
Robertsonian translocation		
45,XX,der(13;14)(q10;q10)	45,XX,der(13;14)	Term
45,XX,der(13;14)(q10;q10)	45,XX,der(13;14) (q10;q10)	Term
45,XX,der(15;21)(q10;q10)		Biochemical
Inversion		
46,XX,inv(9)(p11q13)†	46,XX	Term
DMD	46,XX, normal for DMD	Term
DMD	46,XX, normal for DMD	Term
SMA	46,XX, normal for SMA	Term

DMD : Duchenne Muscular Dystrophy, SMA : Spinal Muscular Atrophy (diagnosed by PCR for exon 7, 8 of SMN), NA : not available, * : karyotyping in abortus, ** : misdiagnosis, possibly due to 3 : 1 segregation, † : RSA more than 3 times

Table 5. Outcome of PGD according to the embryo development at transfer

	Compaction or morula	No compaction
Cycles	25	83
ET cycles	24	77
Positive hCG	9	9
Clinical pregnancy	8	6
Clinical PR (%)/ET	33.3%* (8/24)	7.8% (6/77)

* : $p<0.01$

루어졌으며, 11예에서 만삭 분만을 하였고, 3예는 유산이 되어 전체적으로 이식 주기당 임상적 임신율은 13.9% (14/101)였다. 각 적응증별 이식 주기당 임상적 임신율을 살펴보면 각각 상호 전좌에서 12.3%, 로벗슨 전좌에서 11.1%, 역위에서 50.0%였고, 근이양증에서 28.6%와 척수성 근위축증에서 50.0%를 나타내었다. 염색체 이수성 진단을 위해 시도된 예에서는 정상 배아율 28.8%였으나 임신은 되지 않았다. 각 예에서 임신의 결과와 산전진단상 확인된 결과는 Table 4와 같다. 유산된 3예를 살펴보면 1예에서 47,XX,+der(22)t(11;22)(q23;q11)로 불균형 전좌가 있었고, 1예에서는 전좌 부위와 관련 없는 성염색체 이수성이었으며 (45,XO), 1예에서는 무배아성 임신 (anembryonic pregnancy)으로 유산 산물의 염색체검사는 얻지 못하였다. 또한 할구 생검 후 배아발달에

있어 compaction이나 morula로 진행이 된 경우에는 임신율이 33.3%로 compaction을 보이지 않았던 경우의 임신율 7.8% 보다 유의하게 높은 임신율을 나타내었다 ($p<0.01$, Table 5).

고 찰

유전질환이 있는 가계에서 질환의 유전을 예방할 수 있는 방법으로 착상전 유전진단이 개발된 이후, 현재까지 많은 단일 유전자 질환과 염색체 이상에서 착상전 유전진단을 통해 정상 임신에 성공하고 있다. 지금까지 시행된 단일 유전자 질환으로는 cystic fibrosis, 유전적인 피부질환, sickle cell anemia, Tay-Sachs Disease, hemophilia, Marfan 증후군, 듀센 유형 근이양증, 취약 X 증후군 (Fragile X syndrome), Charcot-Marie-Tooth syndrome, ?-thalassemia, myotonic dystrophy, Lesch Nyhan 증후군, Huntington's disease 등이 있으며 점차 진단 가능한 질환이 증가되고 있다.[2]

또한 착상전 유전진단의 적응증도 점차 확대되어, 염색체 이상과 관련된 습관성 유산 및 염색체 이수성의 확률이 높은 고령 임신에서 착상전 유전진단을 적용하여 유산율의 감소와 임신 유지율을 향상시킬 수 있다.[4] 고령에서는 난자의 aneuploidy rate이 43%로 유전적 검사가 필요하다고 보고된 바 있다.[18] 습관성 유산에서 염색체 이상의 빈도는 대개 5~6% 정도로 보고되고 있으며, 이는 일반인에서 보다 30배 정도 높은 빈도로 이중 상호 전좌가 많고, 로벗슨 전좌와 그 외 성염색체 이수성과 모자이크, 역위 등이 나타난다.[19] 염색체의 전좌에서는 감수분열시 불균형한 배우자가 생성되므로 습관성 유산이 일어나거나 선천기형이 나타날 수 있으며,[20] 이들에서 자연임신 주기에는 자연유산율이 95%에 달한다.[5] 염색체 역위도 수태능력저하나 습관성 유산에서 빈도가 증가되어 나타나 관련성이 있을 것으로 생각되며, 심한 염색체 이상 및 기형을 동반한 염색체 역위에서 착상전 유전진단을 시행하여 정상아의 출산이 보고된 바도 있다.[21] 9번 염색체의 pericentric inversion은 정상변이로 생각하지만 수태능력저하나 유산과의 관련성은 논란의 여지가 있다.[22] 본 연구에서는 3회 이상의 습관성 자연유산을 경험한 예에 대해서만 제한적으로 착상전 유전진단을 시행하였다.

듀센 유형 근이양증은 치명적인 X-연관 열성 질환으로 dystrophin 유전자 (Xq21)의 돌연변이가 관련되는데 결실, 중복, point mutation이 나타날 수있으며, 이 유전자의 exon의 결실에 대한 PCR로 진단을 할 수 있다.[23] 따라서 sexing이나, 특정 가계에서 진단된 유전자 deletion을 할구세포에서 PCR 방법으로 진단함으로써 착상전 유전진단을 시행할 수 있다.[7~9,16] 척수성 근위축도 DMD 다음으로 흔한 근육질환으로 상염색체 열성 유전이며, 척수의 전각세포 (Anterior horn cell)의 degeneration으로 대칭적인 근육 약화를 나타내는데, 임상적으로 3 type으로 구분된다.[24] Type I은 생후 6개월 이전에 발병하는 가장 심한 형태이고 type II는 중간 형태로 18개월 이전에 발병하며 수명은 단축되며, type III는 가장 경미한 형태로 늦게 발병한다. 모든 경우에서 염색체 5q13 부위의 이상과 연관되어 있으며, candidate gene으로 SMN (Survival motor neuron) gene이 알려져 있고, 90~98%에서 exon 7의 homozygous deletion이 나타나며 대개 exon 8에도 함께 이환된다. 따라서 이 SMN gene (telomeric)의 exon 7, 8 부위의 결실을 진단함으로써 착상전 유전진단이 가능하며,[10,12] 본 연구에서도 exon 7, 8의 결실을 진단하는 방법으로 착상전 유전진단을 시행하였고, 산전진단과 출생 후 유전진단으로 확진하였다.

본 연구 결과에서 알 수 있듯이 착상전 유전진단으로 DMD나 SMA 같은 치명적인 유전질환에서 정상아의 임신이 가능하였고, 염색체 이상으로 인한 습관성 유산에서도 정상적으로 임신을 유지할 수 있었다. 대상 환자들 중 4예에서만 건강한 아이를 갖고 있었으며, 그러나 이들도 이후 습관성 유산을 나타내었고, 나머지는 모두 습관성 유산을 보이거나 유전질환, 염색체 이상이나 선천기형에 이환된 환아를 갖고 있어, 임신을 기피하거나 포기하는 상태로 착상전 유전진단의 필요성이 절실하였다. 또한, 습관성 유산의 경우 대부분 산전진단을 할 수 있는 시기까지 임신이 유지되지 않으므로 반복적인 유산과 소파수술을 하게 되어 추후 불임을 초래할 수도 있어 이러한 경우들에서 착상전 유전진단은 매우 가치가 있는 유일한 치료 방법으로 생각된다.

착상전 유전진단의 과정은 체외수정시술과 미세조작술, 분열중인 상태의 할구세포의 생검 또는 난자내 극체의 분리, 단일 세포에서의 유전진단의 과정을 포함하게 되며 각각의 과정이 최적화되어야 성공적인 결과를 얻을 수 있다. 착상전 유전진단의 성공과 관련된 인자들로서는 Cummulus-oocyte complex가 9개 이상이 되어야 한다고 보고되기도 하였으며,[25] 배아의 분할률 (cleavage rate)과 quality가 관련되며 임신이 되었던 대부분의 예는 정상 배아율이 50% 이상이 되었던 경우라고 보고된 바도 있다.[6] 본 연구에서 진단된 배아 중 정상 배아율은 듀센 유형 근이양증이나 척수성 근위축증, 역위에서 40~50% 정도로 상호 전좌의 23.0%, 로벗슨 전좌의 24.6% 보다 높았으며, 전좌에서 이처럼 낮은 정상 배아율을 보면 이 환자들에서 정상 임신의 확률이 낮을 것임을 예측할 수 있다. 임신율은 상호 전좌에서 12.3%, 로벗슨 전좌에서 11.1%를 보였고, 듀센 유형 근이양증에서 28.6%, 척수성 근위축증에서 50.0%의 임신율을 보여 역시 단일 유전자 질환에서 임신율이 높게 나타났다.

또한 배아의 할구 생검 후 이식 당시 배아의 상태에 있어서 morula나 할구들의 compaction이 있었던 경우에서의 임신율은 33.3%로 compaction이 없었던 경우보다 의미있게 높은 것으로 나타나 (33.3% vs. 7.8%, $p<0.01$), 배아의 발달 정도와 quality가 성공에 영향을 주는 중요한 요인으로 생각될 수 있으며, 본 연구에서는 착상전 유전진단의 초기 확립 시기의 예들이 많이 포함되어 있어 임신율이 낮게 나타난 경향이 있으나, 배아의 질과 발달 상태의 호전에 따라 임신율은 향상되는 것으로 생각된다.

전좌에서 보인자의 성별별로 보면 로벗슨 전좌에서는 10예 모두가 여성 보인자로 빈도가 높았고, 상호 전좌에서는 남녀가 유사하였으며, 보인자가 여성인 경우와 남성인 경우 임상적 임신율은 19%와 15.4%로 차이는 보이지 않았다. 고령과 반복적인 착상 실패 등으로, 염색체 이수성의 진단 목적으로 착상전 유전진단을 했던 예들에서는 임신이 되지 않아 임신율 향상의 효과를 거두지 못하였는데, 이는 대상 예가 적고 다른 불임 인자들의 복합적 요인으로 생각된다.

착상전 유전진단의 문제점으로는 배아의 염색체 모자이시즘이 있을 수 있다는 점과, 기술적으로 단일 세포에서의 유전진단이 가장 어려운 부분이다. FISH의 경우 signal의 판독이 애매한 경우가 있을 수 있고, PCR의 경우 증폭 실패나 특정 allele이 증폭되지 않는 allele drop out (ADO)이 있을 수 있다. 따라서 적용할 수 있는 질환이 제한되며 진단의 오류가 발생하기도 한다. 염색체 전좌에서 정확한 정상 배아를 가려내기 위해서 각각의 부위에 대한 특이 FISH probe를 이용하기도 하였는데, 이는 비효율적이며 혼돈된 분할 과정을 (chaotic cleavage) 보이는 경우가 많아 진단의 성공률이 낮다는 보고도 있다.[26,27] 이러한 단점의 극복을 위해 난자의 극체에서 진단을 시행하기도 하며, 최근에는 telomeric probe 등을 이용하여 효율적으로 FISH를 시행할 수 있고,[14] multiplex-fluorescent PCR 등 PCR 기법 및 polymorphic marker를 이용하여 예민도를 높이고 ADO rate을 줄일 수 있다. 또한 포괄적으로 염색체를 분석할 수 있는 CGH (comparative genomic hybridization) 등의 분자생물학적 기법의 발전으로 적용 가능한 질환이 증가되고 더 포괄적인 방법으로 정확도를 높이고 있다.[28] 본 연구에서도 유산이 되었던 3예 중 1예에서 진단 오류가 있었으나, 이 경우는 3 : 1 segregation mode로 분열되었을 가능성이 있으며, 사용된 FISH probe (11번 CEP, 22번 telomeric probe)로는 판독할 수 없는 한계점이 있었으며, 환자의 절단점에 적절한 LSI (locus specific identifier)가 없었다. 1예에서는 전좌와 관련 없는 성염색체 이상으로 터너 증후군이었다. 그 외 임신된 예에서는 양수검사를 이용한 산전검사로 확인한 결과 모두 일치하여 진단의 정확성을 확인할 수 있었다.

앞으로 진단 기법의 발달로 진단 오류도 더욱 감소될 것이나, 배아의 염색체 모자이시즘의 가능성과 진단의 target이 되는 염색체 이외의 다른 이상이 있을 가능성에 대하여 시술 전 충분한 상담이 필요하며, 임신이 된 후에는 반드시 산전진단으로 확진을 하는 것이 바람직할 것으로 생각된다. 또한 더욱 포괄적으로 염색체 이상을 진단할 수 있는 CGH 등의 유전진단 기법을 착상전 유전진단에 적용할 수 있도록 기술의 개발 및 발전이 필요할 것이다.

결론적으로 FISH나 PCR 기법을 이용한 착상전 유전진단은 유전질환이 있는 가계에서 유전질환의

이환아의 출생을 예방하고, 염색체 구조적 이상과 관련된 습관성 유산에서 유산율을 줄이면서 정상 임신율을 높일 수 있는 매우 유용한 방법으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Edlhanty JD, Winston RM, Tuddenham EG. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. Lancet 1989; 18: 347-9.
2. ESHERE PGD Consortium steering committee. ESHERE Preimplantation genetic diagnosis (PGD) Consortium: data collection II (May 2000). Hum Reprod 2000; 15(2): 2673-83.
3. Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimiplantation embryos. Hum Reprod 1993; 8: 2185.
4. Munne 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.
5. Munne S, Morrison L, Fung J, Marquez C, Weier U, Bahce M, et al. J Assist Reprod Genet 1998; 15: 290-6.
6. Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L, Cohen J. Outcom of preimplantation genetic diagnosis of translocations. Fertil Steril 2000; 73(6): 1209-17.
7. Coonen E, Dumoulin JC, Dreesen JC, Bras M, Evers JL, Geraedts JP. Clinical application of FISH for sex determination of embryos in preimplantation diagnosis of X-linked diseases. J Assist Reprod Genet 1996; 13: 133-6.
8. Hussey ND, Dongguk H, Froiland DA, Hussey DJ, Haan EA, Metthews CD, et al. Analysis of five Duchenne muscular dystrophy exons and gender determination using conventional duplex polymerase chain reaction on single cells. Mol Hum Reprod 1999; 5: 1089-94.
9. Kristjansson K, Chong SS, Van den Veyver IB, Subramanian S, Snabes MC, Hughs MR. Preimplantation single cell analysis of dystrophin gene deletions using whole genome amplification. Nature Genet 1994; 6: 19-23.
10. Dreesen JC, Bras M, de Die-Smulders C, Dumoulin JC, Cobben JM, Evers JL. Preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy. Mol Hum Reprod 1998; 4: 881-5.
11. Blake D, Tan SL, Ao A. Assessment of multiplex fluorescent PCR for screening single cells for trisomy 21 and single gene defects. Mol Hum Reprod 1999; 5: 1166-75.
12. Moutou C, Gardes N, Rongieres C, Ohl J, Bettahar K, Wittemer C, et al. Allele-specific amplification for preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy. Prenat Dign 2001; 21: 498-503.
13. 임천규, 한미현, 전진현, 송견지, 김정욱, 박소연 등. 균형 전좌 또는 Robertsonian 전좌 보인자의 체외수정 및 배아이식술에서 형광직접보합법을 이용한 착상전 유전자 진단의 임상적 적용. 대한산부회지 2000; 43(7): 1147-53.
14. Munne S, Marquez C, Magli C, Morton P, Morrison L. Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes X,Y,13,16,18 and 21. Mol Hum Reprod 1998; 4: 863-70.
15. Choi SK, Cho EH, Kim JW, Park SY, Kim YM, Ryu HM et al. Prenatal diagnosis of the spinal muscular atrophy type I using genetic information from archival slides and paraffin embedded tissues. J Med Gen 1998; 2(2): 53-7.
16. 최수경, 이은호, 이호준, 전진현, 강인수, 백은찬, 등. 근이양증 가계에서의 PEP-PCR을 이용한 착상전 유전자 진단. 대한불임학회잡지 1996; 23 (1): 109-14.
17. 최수경, 김진우, 조은희, 박소연, 류현미, 강인수 등. 단일 태아세포에서의 PEP-PCR을 이용한 성의 결정과 Dystrophin 유전자 분석. 대한불임학회잡지 1997; 24(1): 51-6.
18. Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S,

Wolf G, White M, et al. Prevention of age-related aneuploidies by Polar body testing of oocytes. J Assist Reprod Genet 1999; 16: 165-9.
19. Fryns JP, Klczkowska A, Kubien E, Petit P, Van den Berghe H. Cytogenetic survey in couples with recurrent fetal wastage. Hum Genet 1984; 65(4): 336-54.
20. Shaffer LG, Spikes AS, Macha M, Dunn R. Identification of a subtle chromosomal translocation in a family with recurrent miscarriage and a child with multiple congenital anomalies. A case report. J Reprod Med 1996; 41(5): 367-71.
21. Iwarsson E, Ahrlund L, Inzunza J, Rosenlund B, Fridstrom M, Hillensjo T, et al. Preimplantation genetic diagnosis of a large pericentric inversion of chromosome 5. Mol Hum Reprod 1998; 4(7): 719-23.
22. Teo SH, Tan M, Knight L, Yeo SH, Ng I. Pericentric inversion 9-incidence and clinical significance. Ann Acad Med Singapore 1995; 24(2): 302-4.
23. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Hum Genet 1990; 86(1): 45-8.
24. Pearn J. Classification of spinal muscular atrophies. Lancet 1980; 1: 919-22.
25. Vandervorst M, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, De Vos A, Van de Velde H, et al. Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulus-oocyte complexes. Hum Reprod 1998; 13: 3169-76.
26. Wells D, Sherlock JK. Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification. Prenat Diagn 1998; 18: 1389-401.
27. Harper JC, Coonen E, Handyside AH, Winston RM, Hopman AH, Delhanty JD. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal monospermic preimlantation human embryos. Prenat Diagn 1995; 15: 41-9.
28. Voullaire L, Wilton L, Slater H, Williamson R. Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. Prenat Diagn 1999; 19(9): 846-51.