

정자 직접 주입법 (ICSI) 이후에 수정에 실패한 인간 난자에 대한 염색체 분석

포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소

손원영 · 박성은 · 정형민 · 엄기봉 · 고정재 · 윤태기 · 차광열

Chromosomal Analysis of the Human Oocytes Failed to Fertilize following Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)

W.Y. Son, S.E. Park, H.M. Chung, K.B. Oum, J.J. Ko, T.K. Yoon and K.Y. Cha

*Infertility Medical Center, CHA General Hospital, Seoul, 135-081, Korea,
College of Medicine, Pochon CHA University*

= Abstract =

Despite the direct placement of sperm within the oocyte, fertilization failure still occurs after ICSI. This study was accomplished to analyze the chromosomes in oocytes failed to fertilize after ICSI comparing to oocytes failed to fertilize by conventional in vitro insemination. Seventy-four ICSI cycles and 122 conventional IVF cycles were included in analysis. Included unfertilized oocytes were from 74 patients (mean age = 32.7 ± 3.7). Ninety-three oocytes were informative and 83 oocytes were legible for cytogenetic analysis. Sixty-two oocytes out of 83 (74.7%) had normal chromosomes, while 15 (18.1%) were hypoploidy, 6 (7.2%) were hyperploidy. Eighteen oocytes out of 93 (17.6%) were premature chromosome condensation (PCC). Two hundred ninety-four unfertilized oocytes after conventional insemination were subjected to chromosomal analysis and 180 oocytes were legible for analysis. One hundred thirty-two oocytes out of 180 (73.3%) were normal, while 22 (12.2%) were hypoploidy, 20 (11.1%) were hyperploidy, and 6 (3.3%) were polyploidy. Twenty-two oocytes (12.2%) were PCC. There was no difference in chromosomes between oocytes that failed to fertilize after ICSI or conventional insemination. High PCC rates in fertilization-failed oocytes suggest that oocytes maturity is another important factor in achieving successful fertilization.

서 론

최근에 IVF시술 방법을 사용하여 회수한 난자, 접합자, 그리고 배아에 대한 세포유전학적인 분석이 가능하여 졌으며 이에따라 인간의 생식세포가 다른 포유동물에 비하여 높은 비율의 염색체 이상이 있다고 보고되고 있다 (Martin 등, 1986;

Plachot 등, 1986). 이러한 세포유전학적 분석방법은 수정에 실패한 인간 난자에 대한 원인을 규명할 수 있을뿐만 아니라 수정의 기작을 이해하는데 도움을 줄 수 있다. 다양한 정자 처리 방법을 통하여 체외수정을 유도할 수 있으나 심각한 남성불임의 경우 세포질내 정자주입법 (ICSI)이 통용되고 있다. 이러한 미세조작 기법은 남성불임을 해결하는데 결정적인 역할을 하고 있으며

* 본 논문의 요지는 1996년 11. 2 - 11. 6, 미국, 보스톤에서 열린 제 52차 "American society for reproductive medicine" 학회에서 발표되었음.

정상 ICSI의 경우 정자를 주입한 난자의 약 60~70%정도의 수정율을 보인다. 그러나 경우에 따라 어떤 환자들에서는 여전히 낮은 수정율을 보여주고 있다. 이러한 이유에 대해서는 정상적인 수정과정 동안에는 첨체 반응으로 세포막이 제거된 정자핵이 난자의 세포질로 들어가 thiol-reducing agents같이 난자의 세포질내 요소들과 직접 접촉하여 sperm-oocyte결합이 이루어지는데 반해 (Schimiady 등, 1996) ICSI의 경우는 정자핵만이 아니라 세포막에 싸여있는 전체 정자세포가 난자의 세포질내로 노출하게 되어 ICSI시행 후 난자의 세포질내로 유입된 정자세포들의 행동은 정상적인 수정 방법의 그것과는 다르다고 할 수 있겠다. 이에 본 연구는 ICSI 및 IVF시행 후에 수정이 이루어지지 않은 metaphase II (MII) 난자를 이용하여 세포유전학적인 분석을 통하여 상기 두 방법의 기술시 수정의 실패에 대한 원인을 규명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 수정에 실패한 난자의 준비

1995년 1월부터 10월까지 차병원 여성의학 연구소에서 IVF program 122명, ICSI program을 시행한 74명의 불임환자로부터 회수한 난자들중 수정에 실패한 난자들을 본 실험에 공시하였다. 환자들의 평균나이는 IVF환자의 경우 32.7±3.0세, ICSI환자의 경우 32.7±3.7세 이었다. 환자들의 과배란 유도를 위해서는 FSH/HMG 또는 GnRHa/FSH/HMG를 사용하였다. HCG 주입 36시간후에 transvaginal method로 난자를 난포로부터 회수하였다. 회수된 난자는 배우자의 정자로 IVF cycle인 경우 conventional 수정, ICSI cycle인 경우 정자를 직접 주입하여 수정을 유도하였으며 수정 후 16~18시간째에 수정유무를 확인하고 2개의 전핵을 보이는 난자는 20% 인간 성숙난포액이 함유된 TCM-199 배양액에서 배발생을 유도하였다. 수정 약 40~60시간 후에 난할이 된 배아들을 자궁으로 이식 시켰다. 수정 후 40시간까지 전핵이 보이지 않는 제1극체가 있는 성숙 난자들을 본 실험에 공시하여 세포유전학적인 분석을 실시하였다.

2. 난자의 염색체 준비

Tarkowski (1966)의 air-drying 방법을 변형하여

난자의 염색체를 준비하였다. 난자를 0.9% sodium-citrate 저장용액에서 15분간 침지한 후 난자를 작은 점적으로 이물질을 제거한 slide에 올려 놓고 2단계로 염색체를 고정하였다. 먼저 고정액 I (메탄올: 빙초산: 증류수 = 5: 1: 4)을 난자가 있는 작은 점적에 부가하여 약 1분동안 난자의 투명대를 제거한후 고정액 II (메탄올: 빙초산 = 3: 1)를 천천히 난자가 있는 점적에 부가하여 염색체를 고정시켰다. 그 slide를 공기중에서 말린 후 5% Giemsa 용액에 15분동안 침지시킨 후 난자의 염색체를 관찰 하였다. Slide 위에서 염색체의 준비동안 염색체 분실의 가능성이 있으므로 심하게 퍼져있는 hypoploidy 세포들은 분석에서 제외시켰다.

3. 통계적인 분석

실험결과에 대한 유의성 여부는 χ^2 검정을 이용하였으며, 표준 오차율은 SEM으로 나타내었다.

결 과

1. 수정에 실패한 인간 난자에서의 염색체 이상

본 실험의 결과는 Table 1에 요약하였다. 염색체 준비를 위하여 IVF cycle과 ICSI cycle에서 사용한 총 429개의 Metaphase II 난자들중 273개 (65.2%)의 난자를 성공적으로 분석할 수 있었다. IVF cycle에서 294개의 난자들중 180개 (61.2%)의 난자가 분석이 가능하였다. Karyotype이 가능했던 난자 180개중 132개가 정상적인 haploidy (73.3%)이었고, hypoploidy난자는 22개 (12.2%),

Table 1. Cytological analysis of unfertilized MII human oocytes from conventional IVF and ICSI

	Conventional IVF	ICSI
No. of MII oocytes	294	135
No. of oocytes analyzed	180 (61.2%)	93 (68.9%)
No. of oocytes analyzed	180 (100%)	93 (100%)
No. of oocytes karyotyped	180 (100%)	83 (100%)
Normal Haploidy (n=23)	132 (73%)	62 (74.7%)
Abnomal Chromosome	48 (26.7%)	21 (25.3%)
Aneuploidy	42 (23.3%)	21 (25.3%)
Hypoploidy	22 (12.2%)	15 (18.1%)
Hyperploidy	20 (11.1%)	6 (7.2%)
Diploidy	6 (3.3%)	-
PCC	22/180	18/93
	(12.2%)	(17.6%)

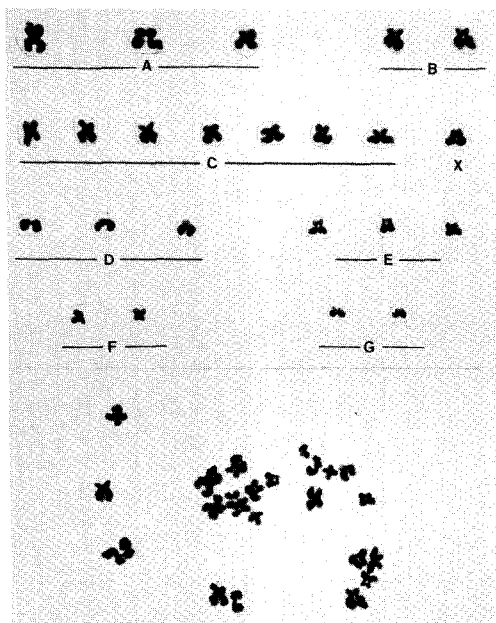


Fig. 1. Normal metaphase II showing 23, X chromosome complement.

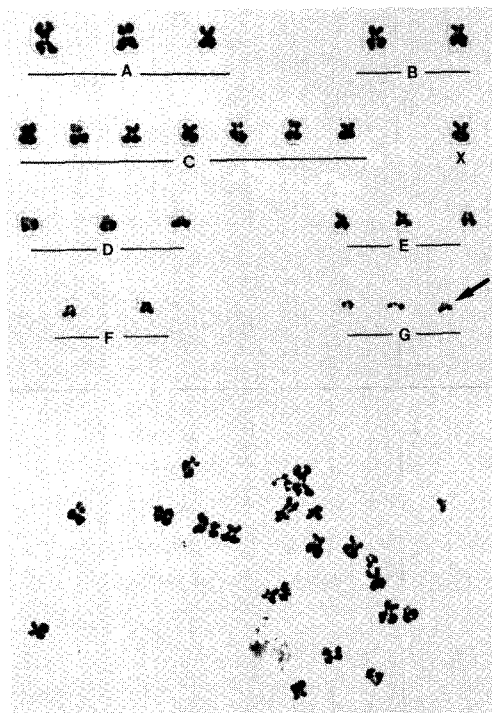


Fig. 3. Hyperploidy metaphase II showing 24, X, +G chromosome complement.

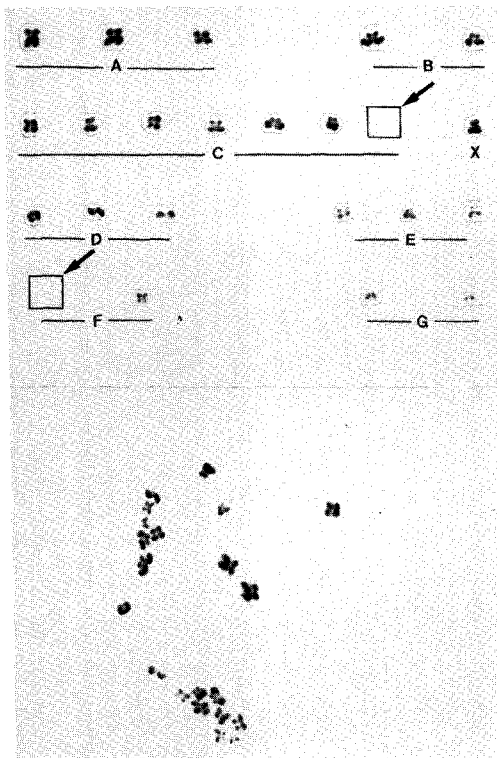


Fig. 2. Hypoploidy metaphase II showing 21, X, -C, -F chromosome complement.

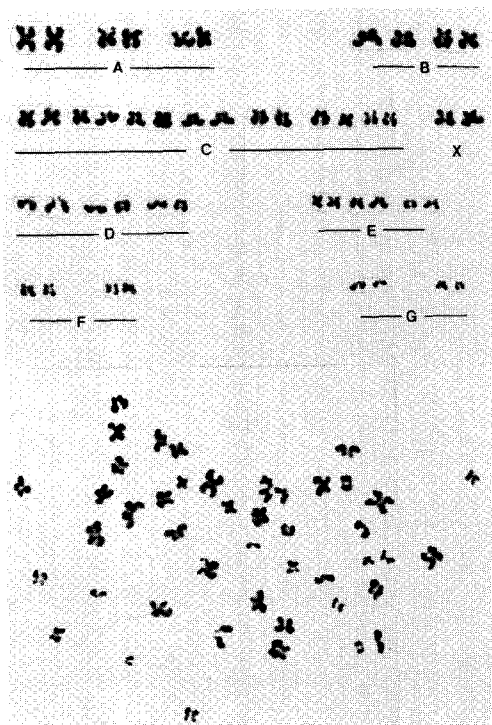


Fig. 4. Diploidy metaphase II showing 46, XX chromosome complement.

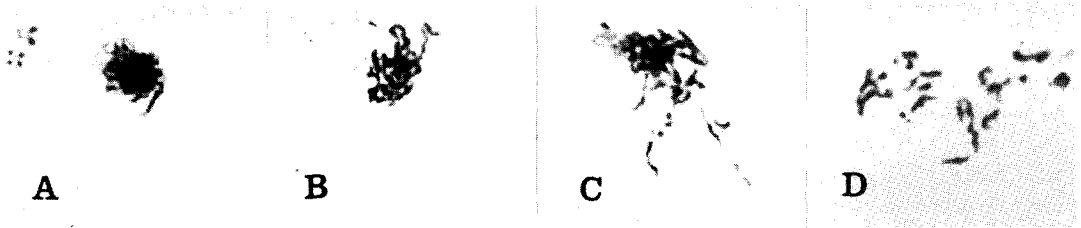


Fig. 5. Premature chromosome condensation (PCC) of human sperm nucleus in: A-B early; C mid; and D late prophase.

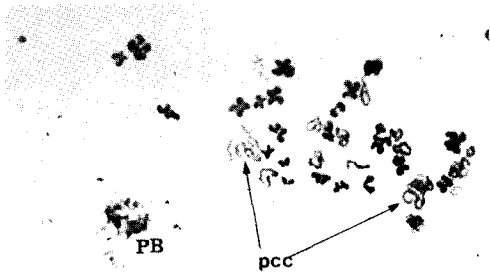


Fig. 6. A human oocyte penetrated by spermatozoa: random mixing of maternal MII chromosomes and a PCC of human sperm nucleus.

그림 6은 난자의 MII 염색체와 섞여 있는 정자의 PCC를 보여준다.

고 찰

체외수정 기술의 발달로 인해 인간 난자에서 직접적인 염색체 이상을 관찰하는 것이 가능하여졌으나 IVF 프로그램에 있어서 정상적인 난자는 환자에게 이식을 시켜야하기 때문에 염색체 이상에 관한 연구는 대부분 IVF-ET cycle에서 수정에 실패한 난자들에 대해서 제한적인 연구 (Edirisinghe, 1992)가 이루어졌고, 본 연구도 IVF cycle과 ICSI cycle에서 수정에 실패한 난자들을 실험에 공시하여 두가지 다른 방법으로 수정시킨 난자에서의 수정 실패시 그들의 염색체의 양상을 비교하여 보았다. IVF 시술시와 ICSI시술시 수정이 되지 않은 난자중에서 염색체의 수적인 이상이 26.7%와 25.3% 이었고 PCC의 경우도 12.2%와 17.6%로 비슷한 비율을 나타내었다. Diploidy난자는 IVF cycle에서 분석한 난자 180개중 6개 (3.3%)의 난자에서 관찰되어 Angell 등 (1991)의 보고와는 유사하였으나 Plachot 등 (1987)이 보고한 7%, Ma 등 (1989)이 보고한 9%, 그리고 Pieters 등 (1989)이 보고한 14%에 비해 그 빈도가 낮게 관찰되었다. 연구자들 사이에 이러한 차이는 Angell 등 (1991)이 주장하였듯이 실험에 공시하는 난자를 선별하는 기준의 차이 때문에 나타날 수 있다. 본 연구에서는 제 1극체가 돌출되어 있는 MII난자들만을 실험에 공시하였지만 많은 다른 연구자들은 수정이 되지 않은 모든 난자들을 실험에 공시하였기 때문에 나타날 수 있는 차이라고 사료된다.

본 연구에서 난자 염색체의 구조적 이상은 분석하지 않았는데, 그 이유는 난자의 염색체는 백혈구 세포나 양수 세포같은 다른 세포에 비해 길이가 짧고 두꺼우므로 정확한 banding이 불가능

hyperploidy난자는 20개 (11.1%), 그리고 diploidy 난자는 6개 (3.3%)로 전체적으로 염색체 수적 이상을 가진 난자는 48개 (26.7%) 이었다. Premature chromosome condensation (PCC)를 가진 난자는 전체 180개중 22개 (12.2%)에서 관찰이 되었다. ICSI cycle의 경우 135개의 난자들중 93개 (68.9%)의 난자가 분석이 가능하였다. Karyotype이 가능했던 83개의 난자중 62개가 정상적인 haploidy (74.7%)이었고, hypoploidy난자는 15개 (18.1%), hyperploidy난자는 6개 (7.2%)로 전체적으로 염색체 수적 이상을 가진 난자는 21개 (25.3%) 이었다. PCC를 가진 난자는 전체 93개중 18개 (17.6%)에서 관찰이 되었다. 본 연구 결과 conventional하게 수정을 시킨 IVF cycle과 정자를 직접 주입한 ICSI cycle에서 수정에 실패한 난자의 염색체의 수적인 이상과 PCC의 비율을 비교하여 보았을 때 유의한 차이는 인정되지 않았다. 그림 1은 정상적인 난자의 23개의 염색체를 보여주고 있고, 그림 2는 23개의 염색체중 C군과 F군의 염색체가 1개씩 없는 hypoploidy이고, 그림 3은 G군의 염색체 1개가 많은 hyperploidy의 사진이다. 그리고 그림 4는 2배수체의 인간난자의 염색체를 보여준다. 그림 5는 난자내에서 정자가 condensed 된 PCC의 여러 가지 형태를 보여준다. 그리고

하기 때문에 염색체의 구조적 이상을 정확히 판단하기 힘들다. 그리고 대부분의 연구들을 종합해보면 염색체의 구조적 이상은 평균적으로 약 4.6% 정도로 보고 (Kamiguchi *et al.*, 1993) 하고 있어 일반적으로 수적인 염색체 이상보다 적게 일어난다고 한다. Premature chromosome condensation (PCC)은 Schmiady 등 (1986)과 Plachot 등 (1987)에 의해 인간 난자에서 처음 보고 되었는데, 그 특징은 성숙 또는 미성숙 난자의 수정시 진행 형성에 실패한, 수정이 되지 않은 것으로 판정되는 난자에서 정자의 chromatid가 존재하는 것이다. PCC가 일어나는 근본적인 이유는 아직 확실한 것은 아니나 난자가 완전히 성숙되지 않은 것과 관계가 있는 것으로 알려졌다 (Schmiady *et al.*, 1986; Calafell *et al.*, 1991). 본 연구에서는 IVF cycle에서 12.2%의 PCC가 관찰되어 Pieters 등 (1989)의 보고와 유사하였다. ICSI cycle에서는 17.6%로 관찰되어 Soballa (1994) 등이 보고한 것에 비해서 높은 빈도로 나타났으나 Schmiady 등 (1996)이 보고한 28.4%에 비해서는 낮은 비율로 관찰되었다. 이러한 차이는 sperm의 chromatin이 fixation될때 disperse가 완전히 되었는가 여부에 따라 정자의 핵으로 판정을 하는가 또는 PCC로 판정을 하는가에 의해 차이가 날 수도 있다. 다른 이유로는 난자를 회수한 이후에 IVF cycle에 비해 ICSI cycle에서 난자의 preincubation 시간이 짧아서 정자가 난자내로 들어가는 시간이 빠르기 때문에 즉, 난자가 완전히 성숙이 이루어지기전에 정자가 침투하여 일어날 수 있는 현상이라고 생각된다.

결 론

결론적으로, IVF와 ICSI cycle에서 수정이 되지 않은 난자들에서 관찰되는 염색체의 형태는 차이가 없었다. 그리고 IVF cycle에서 뿐만 아니라 ICSI cycle에서 높은 PCC비율이 관찰된 것은 ICSI가 비록 남성불임의 많은 부분을 해결해 줄 수 있다고 하더라도 난자의 완전한 성숙이 꼭 필요하며 따라서 수정에 성공하는데 필요한 난자의 요인들에 대한 세포학적, 생화학적 연구도 필요하다고 생각된다. 또한 PCC와 관련된 다른 요인들, ICSI 기술 그리고 정자의 이상유무에 대한 연구도 병행되어야 한다고 생각된다.

인 용 문 헌

- Angell RR, Ledger W, Yong EL, Harkness L and Baird DT: Cytogenetic analysis of unfertilized human oocytes. *Hum Reprod* 1991, 6, 568-573.
- Calafell JM, Badenas J, Egozeue J, Santalo J: Premature chromosome condensation as a sign of oocyte immaturity. *Human Reprod* 1991, 6, 1017-1021.
- Edirisinghe WR, Murch AR, Yovich JL: Cytogenetic analysis of human oocytes and embryos in an in vitro fertilization programme. *Hum Reprod* 1992, 7, 220-236.
- Kamiguchi Y, Rosenbusch B, Sterzik K, Mikamo K: Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air drying method. *Hum Genet* 1993, 90, 533-541.
- Martin RH, Mahadevan M, Taylor PJ, Hildebrand K, Long-Simpson L, Peterson D, Yamamoto J and Fleetham J: Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes. *J Reprod Fert* 1986, 78, 673-678.
- Ma S, Kalousek DK, Zouves C, Yuen BH, Gomel V and Moon YS: Chromosome analysis of human oocytes failing to fertilize in vitro, *Fertil Steril* 1989, 51, 992-997.
- Pieters MHEC, Geraedts JPM, Dumoulin JCM, Evers JLH, Bras M, Kornips FHAC and Menheere PPCA: Cytogenetic analysis of in vitro fertilization (IVF) failures. *Hum Genet* 1989, 81, 367-370.
- Plachot M, de Grouchy J, Junca A, Mandelbaum J, Turleau C, Couillin P, Cohen J and Salat-Baroux J: From oocyte to embryo: a model, denuded from in vitro fertilization; for natural selection against chromosome abnormalities. *Ann Genet* 1987, 30, 22-32.
- Plachot M, Junca A-M, Mandelbaum J, de Grouchy J, Salat-Baroux J and Cohen: Chromosome investigations in early life. I. Human oocytes recovered in an IVF programme. *Hum Reprod* 1986, 8, 547-551.
- Schmiady H, Ketenich H: Premature chromosome condensation after in vitro fertilization. *Hum*

- Reprod* 1986, 4(6), 689-695.
- Schmiady H, Tandler-Schneider A and Kentenich H:
Premature chromosome condensation of the
sperm nucleus after Intracytoplasmic sperm in-
jection. *Hum Reprod* 1996, 11, 2239-2245.
- Soballa M, Schmiady H, Schmutzler AG, Krebs D:
Cytogenetics of failed microfertilization. *Hum
Reprod* 1994, 9 (suppl 4), 219.
- Tarkowski AK: An air drying method for chro-
mosome preparation from mouse eggs. *Cy-
togenetics* 1966, 5, 394-400.
-