

세포질내 정자주입을 시행한 인간 난자의 전핵 형성 및 배아 발생에 관한 연구

제일병원 불임연구실, 한양대학교 자연과학대학 생물학과*
전진현 · 임천규 · 박용석 · 이호준 · 김종흡* · 김문규*

Pronucleus Formation and Embryonic Development of the Human Oocytes Fertilized by Intracytoplasmic Sperm Injection

Jin Hyun Jun, Chun-Kyu Lim, Yong-Seog Park, Ho-Joon Lee, Jong Heup Kim* and Moon Kyoo Kim*

*Infertility Research Laboratory, Cheil General Hospital,
Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University*, Seoul, Korea*

= Abstract =

Mammalian, including human, spermatozoa undergo morphological and physiological changes during sperm maturation. Therefore, these changes may affect the fertilization and embryonic development. In this study, we examined the pronucleus formation, pronucleus disappearance and embryonic development in the human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). The injected spermatozoa were grouped into ejaculated, epididymal and testicular by the collecting region. Among 363 metaphase II injected oocytes, 287(79.1%) oocytes were normally fertilized and displayed two pronuclei. There were no difference in the fertilization rates and in the pronucleus formation and pronucleus disappearance at 16, 20 and 24 hr after ICSI, among the each spermatozoa group. Also, at 64 hr, the appearance of embryonic development was similar. From these results it can be concluded that there was no difference of maturity among the sperm collected from ejaculated, epididymis and testis in the pronucleus formation and embryonic development. Therefore, testicular spermatozoa are successfully used with ICSI in IVF-ET program.

서 론

수정이란 정자와 난자의 유전정보가 융합되어 하나의 접합자(zygote)를 형성하는 과정이다. 일반적으로 이러한 접합자를 형성하기 위해서는 난자성숙과정을 통해 형성된 성숙 난자와 정자성숙과정을 통해 형성된 수정능력을 가진 성숙 정자가 필요하게 된다(Lopata & Leung, 1988; Edwards & Brody, 1995). 인간을 포함한 대부분의 포유류 정자는 고환과 부고환을 통과하면서 형

태학적, 생리학적인 여러가지 변화를 수반하여, 수정과정에 필요한 운동성 획득과 정자 세포막의 변화가 일어나 정자성숙과정을 완료하는 것으로 알려져 있다(Nicolson & Yanagimachi, 1979; Zaneveld et al., 1991). 그러므로 이러한 성숙과정을 수행하지 않은 고환 정자(testicular sperm)나 부고환 정자(epididymal sperm)는 정상적인 수정과정을 수행할 수 없을 것으로 생각된다.

그러나 불임환자의 체외수정에서 사용되는 부고환 정자나 고환 정자는 세포질내 정자주입술(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)을 이용하면

사정 정자(ejaculated sperm)와 유사한 수정률을 얻을 수 있는 것으로 보고되고 있다(Devroey et al., 1994; 전진현 등, 1994; 손일표 등, 1994; Silber et al., 1994; Nagy et al., 1995). 이와같이 이러한 정자들을 이용한 ICSI에서 좋은 결과를 얻고 있지만, 이들 정자간의 성숙 정도와 이들 정자를 이용한 수정란의 배아 발생 양상에 관한 비교, 연구는 미진한 상태이다.

Ogura와 Yanagimachi(1993)는 hamster에서 미성숙 정자인 round spermatid를 난자의 세포질에 주입하여 수정과정 중에서 전핵 형성에 대해 연구하였는데, 부고환 정자나 고환 정자에 비해 전핵 형성 시간이 훨씬 빠름을 보고하였다. 이것은 round spermatid와 같은 미성숙 정자는 난자의 세포질내에서 보다 빨리 탈응축되어 전핵 형성이 빠른 것으로 생각된다. 이와같이 정자의 성숙 정도는 수정 과정에서 전핵 형성의 시간적 진행과 관계가 있을 것으로 생각된다. 인간의 경우, 일반적인 체외수정시 전핵 형성은 insemination 후 9-20시간에 관찰되는 것으로 알려져 있으며(Edwards et al., 1969; Santhanathan & Trouson, 1985), ICSI를 시행했을 때는 정자주입 6시간 후부터 전핵이 나타나기 시작하여 16시간 후에 수정란의 99%에서 전핵이 관찰되는 것으로 보고되었다(Nagy et al., 1994).

본 연구에서는 정자를 그 채취 부위에 따라 사정 정자, 부고환 정자 그리고 고환 정자 등으로 구분하고, 이러한 정자를 이용한 ICSI에서 전핵 형성, 전핵 소실(pronucleus disappearance) 그리고 배아 발생 양상 등을 관찰하여, 이들 정자의 성숙 정도를 비교하고 체외수정에서 고환 정자의 이용 가능성을 알아보았다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 1995년 1월부터 3월까지 제일병원 불임클리닉에서 ICSI를 시행한 40명의 환자를 대상으로 하였다. 대상 환자는 세계보건기구(WHO) 기준(1992)에 따른 정액분석 결과 정상 소견을 나타낸 환자에서 일반적인 수음(masturbation) 방법으로 채취한 사정 정자군(20주기), 여러가지 원인으로 인한 무정자증 환자에서 미세수술적 부고환 정자흡입(microsurgical epididymal sperm aspiration, MESA) 방법(손일표 등,

1995)으로 채취한 부고환 정자군(10 주기) 그리고 부고환에서 정자를 얻을 수 없는 환자에서 고환조직 정자채취(testicular sperm extraction, TESE) 방법(Silber et al., 1995)으로 채취한 고환 정자군(10 주기) 등으로 구분하였다.

2. 정자 준비

일반적인 방법으로 채취한 사정 정자는 37℃에서 30분 정도 액화시킨 후 CASA(computer assisted sperm analyser)를 이용하여 정자의 수, 운동성 등을 판정하였으며, Percoll gradient centrifugation 방법으로 정자를 회수하였다. 수확한 정자는 3% BSA(bovine serum albumin) 배양액으로 세척한 후 ICSI 시행 전까지 배양기에 보관하였다. 부고환 정자는 MESA 방법으로 채취한 후 swim-up 방법으로 운동성 정자를 회수하고 3% BSA 배양액으로 세척한 후 ICSI에 사용하였다. 고환 정자는 TESE 방법으로 채취한 후 0.4% BSA 배양액에서 ICSI 시행 전까지 배양기에 보관하였다.

3. 과배란 유도 및 난자 준비

난자를 획득하기 위한 과배란 유도는 FSH/hMG 와 GnRH-agonist를 병용하여 사용하였으며, hCG 주사 후 34 시간에 질식 초음파를 이용하여 난자를 채취하였다. 채취한 난자-난구 복합체(oocyte-cumulus complex)는 1차적으로 현미경 하에서 성숙도를 판정하고 3-5시간 동안 배양한 후에 0.1% hyaluronidase를 처리하여 난구세포를 제거하였다. ICSI를 시행하기 직전에 난자의 성숙 정도를 확인하여 제1극체가 방출된 제2감수분열중기(metaphase II)의 성숙 난자만을 ICSI에 사용하였다.

4. Intracytoplasmic sperm injection(ICSI)

ICSI는 도립현미경(Nikon, Diaphot 300)에 장착된 1쌍의 미세조작기(Narishige, NT-88)를 이용하여 수행하였으며, holding pipette 과 injection pipette은 내경이 각각 15-20µm 와 4-5µm 인 것을 사용하였다. 사정 정자는 준비된 정자를 10% polyvinylpyrrolidone (PVP) 배양액 drop에 넣어 운동성을 감소시키고, injection pipette으로 운동 정자의 중편(midpiece)에 물리적 힘을 가하여 비운동화(immobilization) 시킨 후 난자에 주입하였다. 부고환 정자는 운동성이 좋은 경우에는 사정 정

Table 1. Fertilization of human oocytes by intracytoplasmic sperm injection according to the origin of the injected spermatozoa

Spermatozoa	Cycles	No. of				
		Retrieved oocytes	Injected oocytes	Fertilized zygotes(%)	Cryo. zygotes	Examined zygotes
Ejaculated	20	195	164	131(79.9)	15	116
Epididymal ^a	10	124	103	85(82.5)	8	77
Testicular ^b	10	122	96	71(74.0)	5	66
Total	40	441	363	287(79.1)	28	259

Cryo.; Cryopreservation, ^a; Obtained by microsurgical epididymal sperm aspiration(MESA), ^b; Obtained by testicular sperm extraction(TESE).

Table 2. Pronucleus(2-PN) formation, pronucleus disappearance and the first cleavage in the human fertilized zygotes at 16, 20 and 24 hours after intracytoplasmic sperm injection according to the origin of the injected spermatozoa

Spermatozoa	Examined zygotes	Njo. of (%)						
		at 16 hr		at 20 hr		at 24 hr		
		2-PN	PN-D	2-PN	PN-D	2-PN	PN-D	2-cell
Ejaculated	116	111(95.6)	3(2.6)	102(87.9)	13(11.2)	77(66.4)	28(24.1)	11(9.5)
Epididymal	77	75(97.4)	0(0.0)	74(96.1)	3(3.9)	50(64.9)	16(20.8)	11(14.3)
Testicular	66	58(87.9)	4(6.1)	60(90.9)	6(9.1)	41(62.1)	14(21.2)	11(16.7)

2-PN; two pronucleus formation, PN-D; pronucleus disappearance, 2-cell; two cell stage embryo.

Table 3. Human embryos development at 64 hours after intracytoplasmic sperm injection according to the origin of the injected spermatozoa

Spermatozoa	No. of embryos(%)					Total
	2 cell	3-4 cell	5-6 cell	7-8 cell	Fragment.	
Ejaculated	8(6.9)	57(49.1)	29(25.0)	14(12.1)	8(6.9)	116
Epididymal	4(5.5)	26(35.6)	25(34.3)	13(17.8)	5(6.9)	73
Testicular	3(4.6)	26(39.4)	20(30.3)	12(18.2)	5(7.9)	66

Fragment.; Fragmented embryo.

자에서와 같은 방법을 이용하였고, 운동성이 좋지 않은 경우에는 고환 정자에서와 같이 일차적으로 0.4% HSA(human serum albumin) 배양액 drop내에서 운동성 정자를 회수하고, 이들을 10% PVP 배양액 drop으로 옮겨 비운동화시킨 후 난자에 주입하였다. 준비된 난자는 제1극체가 12시 또는 6시 방향에 위치하도록 holding pipette으로 고정한 후 준비된 정자를 injection pipette을 사용하여 3시 방향에서 9시 방향쪽으로 주입하였다. 정자주입시 난자의 세포질을 injection pipette으로 적당량 흡입하여 난자의 세포질내에 정자가 주입된 것을 확인하였다. 정자주입 후에 성장 배양액 drop 마다 난자를 1개씩 넣어 배양, 관찰하였다.

5. 수정란 및 배아 관찰

각각의 난자는 ICSI 시행 후 16시간, 20시간, 24시간에 관찰하여 수정여부와 전핵 형성, 전핵 소실, 첫번째 난할 등을 관찰하였다. 뚜렷한 두 개의 전핵이 관찰되는 경우를 전핵 형성(pronucleus formation) 시기로 판정하였고, 관찰되었던 두개의 전핵이 보이지 않은 경우를 전핵 소실(pronucleus disappearance) 시기로 판정하였다. 배아의 발생 정도는 ICSI 후 64시간에 관찰하여 배아의 할구 수를 기록하였으며, 50% 이상이 fragmentation된 배아는 fragmented embryo로 구분하였다.

6. 분석 및 통계 방법

결과에 대한 통계적 분석은 χ^2 -test를 이용하였

으며, p 값이 0.05 이하인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

대상환자의 평균 나이는 34세였으며, 40명의 환자, 40주기에서 채취한 441개의 난자 중, 363개의 성숙난자에서 ICSI를 시행하였다. 정자를 주입한 난자 중에서 287개(79.1%)가 수정되었으며, 수정란 중 25개는 전핵시기에 동결보존(cryopreservation)하여, 본 연구에서는 262개의 수정란을 관찰하였다. 각각의 정자군에서의 수정률은 사정 정자 79.9%(131/164), 부고환 정자 82.5%(85/103), 고환 정자 74.0%(71/96)로 나타나 고환 정자군에서 다소 낮았지만 통계적 유의성은 없었다(표 1).

전핵 시기의 수정란은 사정 정자군과 부고환 정자군에서는 정자주입 후 16시간에 95.6%와 97.4% 였으며, 고환 정자군에서는 정자주입 후 20시간에 90.9% 였고, 정자주입 후 24시간에는 수정란 중 62-65%가 전핵 시기로 관찰되어 시간이 지남에 따라 전핵이 소실되어 syngamy 시기로 진행되어 감을 알 수 있었다. 전핵 소실 시기의 수정란은 정자주입 후 16시간에는 6% 이내였지만, 24시간에는 20% 이상 관찰되었다. 또한 정자주입 후 24시간에는 첫번째 난할이 완료된 2-세포기 배아도 관찰되었으며, 고환 정자군에서 다소 많았지만 유의한 차이는 없었다(표 2).

정자주입 후 64시간 동안 배양하여 10% 이상의 배아가 8세포기까지 발생되었다. 배아의 발생 양상은 각각의 정자군에서 비슷하였는데, 3-4 세포기 배아의 비율이 가장 높았으며 2-세포기 배아와 비정상적인 fragmented 배아도 관찰되었다(표 3). 부고환 정자군의 수정란 중에서 4개는 전핵시기에 발생이 중지되어, 표 3의 결과에서 제외하였다.

고 찰

인간을 포함한 대부분의 포유류 정자는 부고환에서의 성숙과정을 통해 정자 성숙이 완료되는 것으로 알려져 있으며(Nicolson & Yanagimachi, 1979; Zaneveld et al., 1991), 이러한 성숙과정을 거치지 않은 부고환 정자나 고환 정자는 정상적인 사정 정자에 비해 핵 모양, 세포질 잔

여 여부, 운동성 등에서 다소 차이를 보이지만, 이들 정자간의 수정 과정에서 차이점에 대한 연구는 일반적인 체외수정 방법에서의 수정률 차이로 인해 어려움이 있었다.

그러나 ICSI를 이용하면 사정 정자, 부고환 정자, 고환 정자 등에서 모두 비슷한 수정률을 얻을 수 있어(표 1), 이들 정자를 이용한 체외수정 시 수정과정과 배아 발생 양상에 관한 연구를 수행할 수 있었다. 고환 조직에서 채취한 고환 정자는 부고환 성숙과정을 거치지 않은 정자이기 때문에 성숙 정도에 있어 사정 정자와는 차이가 있을 것으로 생각되지만, ICSI 이용시 수정과정과 배아 발생 양상에서 특별한 차이를 나타내지 않았다(표 2,3). 이러한 결과는 정자가 난자의 세포질내로 들어간 후에는 난자 세포질의 영향을 받음을 간접적으로 시사하는 것으로 생각된다. 그러나 부고환 정자를 이용하여 일반적인 체외수정 방법을 수행하면 수정률이 매우 낮게 나타나(손일표 등, 1994; Silber et al., 1994) 부고환에서의 정자성숙과정이 정상적인 수정과정에 필수적임을 알 수 있다.

Ogura와 Yanagimachi(1993)는 hamster에서 미성숙 정자인 round spermatid를 난자의 세포질에 주입하여 부고환 정자나 고환 정자에 비해 전핵 형성 시간이 훨씬 빠름을 보고하였다. 이것은 round spermatid와 같은 미성숙 정자는 난자의 세포질내에서 보다 빨리 탈응축되어 전핵 형성이 빠른 것으로 생각된다. 그러나 hamster에서 고환 정자와 부고환 정자 주입시 전핵 형성은 특별한 차이를 나타내지 않는 것으로 보고하여, 본 연구에서의 결과(표 2)와 유사한 것으로 생각된다. Nagy 등(1994)은 사정 정자를 이용한 ICSI에서 난자 활성화, 전핵 형성, 난할 등에 관한 연구를 통하여 전핵 형성은 정자 주입 6시간 후부터 관찰되기 시작하여 16시간에는 수정란의 99%에서 전핵이 관찰되는 것으로 보고하였는데, 본 연구에서도 16시간 이전에 수정란의 90% 이상에서 전핵 형성이 완료되어(표 2), 위의 결과와 유사하였다. 또한, 배아의 발생 양상에 있어서도 각각의 정자군에서 비슷하게 나타나 수정 이후의 난할과정에서도 차이가 없음을 알 수 있다(표 3).

이렇게 각각의 정자군에서 전핵 형성, 전핵 소실 및 배아 발생 등이 차이가 나타나지 않은 이유 중 하나는 ICSI에 이용한 정자의 대부분이 운동성 정자이고 형태적으로도 사정 정자에 가까

운 것이었기 때문이 아닌가 사료된다. 이와 같은 운동성 정자는 비록 고환 또는 부고환 정자라 할지라도 이미 어느 정도 성숙되어 사정 정자와 비슷한 양상의 결과를 나타낸 것으로 생각되며, 인간에서 정자 성숙 정도와 수정과정에 대해 보다 직접적인 연구 결과를 얻기 위해서는 전형적인 미성숙 고환 정자나 round spermatid를 이용한 정자주입이 시행되어야 할 것으로 생각된다.

결론적으로, 부고환 또는 고환 정자라도 운동성이 있는 경우에는 사정 정자와 성숙 정도에 있어 특별한 차이가 없는 것으로 생각되며, 고환 정자라 할지라도 ICSI를 이용하면 성공적인 체외수정이 가능함을 알 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 ICSI에 사용한 정자를 채취 부위에 따라 사정 정자, 부고환 정자, 고환 정자 등으로 구분하고 이들을 이용하여 ICSI를 시행한 인간 난자에서 전핵 형성, 전핵 소실 그리고 배아 발생 양상 등을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. ICSI 후 각각의 정자군에서 수정률은 사정 정자 79.9%(131/164), 부고환 정자 82.5%(85/103), 고환 정자 74.0%(71/96)로 나타났다.

2. 수정란 중에서 전핵 형성은 사정 정자군과 부고환 정자군에서 ICSI 후 16시간에 95.6% 와 97.4%, 고환 정자군에서는 20시간에 90.9%로 관찰되었으며, 전핵 소실 시기는 시간이 지남에 따라 점차 증가하여 ICSI 후 24시간에 각각의 정자군에서 사정 정자 24.1%, 부고환 정자 20.8%, 고환 정자 21.2%로 관찰되었다.

3. ICSI 후 64시간에 관찰한 배아의 발생 양상은 각각의 정자군에서 비슷하게 나타났다.

이상의 결과로서 ICSI를 이용하면 각각의 정자군에서 수정률, 전핵 형성, 전핵 소실, 발생 양상 등이 차이가 없음을 알 수 있다. 이는 성숙 정도에 있어 사정 정자, 부고환 정자, 고환 정자 사이에 특별한 차이가 없음을 보여준 것으로 사료되며, 고환 정자라 할지라도 ICSI를 이용하면 성공적인 체외수정이 가능함을 알 수 있다.

인 용 문 헌

Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber S,

Van Steirteghem A: Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994, 62, 639-641.

Edwards R, Bavister B, Steptoe P: Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature* 1969, 221, 632-635.

Edwards R, Brody S: Principles and practice of assisted human reproduction. In: Oocyte growth, maturation and fertilization. Philadelphia: W.B. Saunders company, 1995, 285-349.

전진현, 이호준, 김정욱, 박용석, 이유식, 홍재업, 손일표, 전종영: 체외수정 및 배아이식술에서 세포질내 정자주입술(ICSI)의 수정률과 임신율. *대한불임학회잡지* 1994, 21, 247-252.

Lopata A, Leung P: The fertilizability of human oocytes at different stage of meiotic maturation. *Ann N Y Acad Sci* 1988, 541, 324-336.

Nagy Z, Liu J, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A: Time course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994, 9, 1743-1748.

Nagy Z, Silber S, Liu J, Devroey P, Cecile J, Van Steirteghem A: Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995, 63, 808-815.

Nicolson G, Yanagimachi R: Cell surface changes associated with the epididymal maturation of mammalian spermatozoa. In: Fawcett D, Bedford J, eds. *The spermatozoon*. Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1979, 187-194.

Ogura A, Yanagimachi R: Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes from pronuclei and participate in syngamy. *Biol Reprod* 1993, 48, 219-225.

Sathananthan A, Trouson A: The human pronuclear ovum: fine structure of monospermic and polyspermic fertilization in vitro. *Gamete Res* 1985, 12, 385-398.

Silber S, Nagy Z, Liu J, Godoy H, Devroey P, Van Steirteghem A: Conventional IVF versus ICSI

- (intracytoplasmic sperm injection) for patients requiring microsurgical sperm aspiration(MESA). *Hum Reprod* 1994, 9, 1705-1709.
- Silber S, Van Steirteghem A, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P:High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* 1995, 10, 148-152.
- 손일표, 홍재엽, 이유식, 전진현, 박용석, 이호준, 강인수, 전종영:폐쇄성 정로장애로 인한 무정자증 환자에서 미세수술적 부고환 정자흡입술과 세포질내 정자주입술을 이용한 수정률 및 임신율 증진에 관한 연구. 대한불임학회잡지 1994, 21, 267-272.
- 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 deferens. *Fertil Steril* 1994, 61, 1045-1051
- World Health Organization:WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 3rd edition. Cambridge:Cambridge University Press 1992.
- Zaneveld L, De Jonge C, Anderson R, Mack S:Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human Reprod* 1991, 6,1265-1274.
-