

미수정 및 저수정율의 기왕력을 지닌 체외수정시술 환자에서의 난자 세포질내 정자 주입술을 이용한 미세보조 수정술에 관한 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

문신용 · 김석현 · 채희동 · 김광례 · 이재훈 · 김희선 · 류범용 · 오선경 · 서창석
최영민 · 김정구 · 이진용

Microassisted Fertilization of Human Oocytes with Intracytoplasmic Sperm Injection in IVF - ET Patients with History of Failure in Fertilization or Extremely Low Fertilization Rate in Previous Cycles

Shin Yong Moon, Seok Hyun Kim, Hee Dong Chae, Kwang Rye Kim, Jae Hoon Lee, Hee Sun Kim, Buom Yong Ryu, Sun Kyung Oh, Chang Suk Suh, Young Min Choi, Jung Gu Kim and Jin Yong Lee

*Department of Obstetrics and Gynecology College of Medicine, Seoul National University
Seoul, Korea*

= Abstract =

Although IVF-ET is widely applied in the treatment of couples with male factor infertility, it may fail in many infertile couples with normal semen parameters, and certain couples cannot be accepted for standard IVF-ET due to unfertilization or extremely low fertilization rate of oocytes. Recently, several procedures of microassisted fertilization (MAF) using micromanipulation have been introduced, and pregnancies and births have been obtained after partial zona dissection (PZD), subzonal insertion (SUZI), and intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

This clinical study was performed to develop and establish ICSI as an effective procedure of MAF in infertile couples who could not undergo standard IVF-ET repetitively because of failure in fertilization or extremely low fertilization rate of oocytes with the conventional fertilization technique in the previous IVF-ET cycles. From March, 1995 to May, 1996, 27 cycles of IVF-ET with ICSI in 19 infertile patients were included in study group, and the outcomes of ICSI were analyzed according to fertilization rate, cumulative embryo score (CES), and pregnancy rate.

The number of oocytes retrieved after controlled ovarian hyperstimulation (COH) was 10.50 ± 6.13 in 30 previous cycles, and 10.57 ± 5.53 in 27 ICSI cycles. In ICSI cycles, the number of oocytes optimal for ICSI procedure was 7.89 ± 4.30 , and the fertilization rate of $67.9 \pm 20.2\%$ could be obtained after ICSI. The number of embryos transferred was 1.43 ± 2.40 in previous cycles, and 4.36 ± 1.77 with the mean CES of 41.8 ± 27.4 in ICSI cycles. In ICSI cycles, the overall pregnancy rate was 29.6% (8/27) per cycle and 42.1% (8/19) per patient with the clinical pregnancy rate of 22.2% (6/27) per cycle and 31.6% (6/19) per patient.

* 이 연구는 1994년도 서울대학교 의과대학 교육연구재단 교실지정기금 연구비 지원에 의한 결과임.

In conclusion, MAF of human oocytes with ICSI is a promising fertilization method for IVF-ET patients, especially with the past history of failure in fertilization or low fertilization rate of oocytes in the previous IVF-ET cycles, and ICSI using micromanipulation procedures applied to human oocytes will provide a range of novel techniques which may dramatically improve the pregnancy rate in IVF-ET program and contribute much to effective management of infertile couples.

Key Words: In vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET), Pregnancy rate, Fertilization, Unfertilized oocytes, Low fertilization rate, Micromanipulation, Microassisted fertilization (MAF), Intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

서 론

불임 부부에서 불임증의 원인 중 남성의 결함, 즉 정자의 질적, 양적 결함으로 인하여 불임이 되는 남성인자 (male factor infertility)의 빈도는 매우 다양하게 보고되고 있지만 50% - 60%를 차지하고 있다. 남자와 정자의 체외수정 및 배아의 자궁내이식, 즉 체외수정술 (in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET) 프로그램의 초기 단계에서는 남성인자의 불임환자에서도 체외수정술을 시행하면 상대적으로 임신이 잘 성립될 것으로 기대하였으나 현재까지 그 결과는 기대에 미치지 못하여 난관인자가 원인인 경우와 비교하여 상대적으로 불량한 것으로 알려져 있다 (Tournaye *et al.*, 1992). 또한 남성인자가 불임증의 원인으로 진단된 불임환자에서 체외수정술시 과배란유도 (controlled ovarian hyperstimulation, COH) 후 난포 천자로 채취된 난자를 대상으로 체외에서 남편의 정자와 수정 (insemination)을 시도하여 수정 (fertilization)이 안 일어난 미수정 (unfertilized) 난자의 경우 기존의 고식적인 체외수정 방법으로 재수정 (reinsemination)을 재차 시도하여도 대부분의 난자에서는 수정이 일어나지 않는다 (Dehninger *et al.*, 1988). 한편 명백한 남성인자가 불임증의 원인으로 진단되지 않은 불임환자에서도 체외수정술시 난자와 정자의 수정이 일어나지 않거나 수정이 이루어져도 수정율이 매우 낮아 처음부터 배아이식을 시도하지 못하거나 수정이 일어난 수정란, 즉 배아의 질도 좋지 않은 경우가 많이 보고되고 있다 (Dehninger *et al.*, 1988).

최근 여러 연구 결과 남성인자 불임증으로 진단이 되었거나, 혹은 과거의 체외수정술 시행 주기에서 채취된 난자 전부에서 수정이 안 일어

난 불임환자를 대상으로 고농도의 정자 micro-droplet를 이용한 수정 (high concentration micro-droplet insemination)을 실시하여 난자와 정자의 체외수정을 시도하고, 이러한 시도에서도 미수정된 난자를 회수하여 미세조작 (micromanipulation)을 이용한 난자 세포질내 정자 주입술 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)로 난자의 미세보조 수정술 (microassisted fertilization, MAF)을 실시하여 난자와 정자의 수정이 일어나면 체외배양 후 환자의 자궁내로 배아이식을 시행하여 임신 성공을 기대함으로써 남성인자 불임증 뿐만 아니라 난자의 수정을 저하에 대한 치료로서 임상에도 도입되고 있다. 그러나 일단 수정에 실패한 난자를 대상으로 1일 후 난자 세포질내 정자 주입술에 의한 수정을 시도한 결과 난자의 수정 성공과 다정자증 (polyspermia)의 방지에는 어느 정도 효과가 있지만 (Nagy *et al.*, 1995), 임신 성공율은 기대한 만큼 보고되고 있지 못하다 (Tsirigotis *et al.*, 1995).

이에 연구자들은 합리적인 미세보조 수정술을 개발 확립하고, 임상에 이용하기 위해서 과거 체외수정술 시행 주기에서 과배란유도 후 채취된 난자 모두에서 체외수정이 일어나지 않았거나, 수정율이 매우 저조하였던 불임환자에서 다음 체외수정술시 과배란유도 후 채취된 난자를 대상으로 일차적으로 난자 세포질내 정자 주입술을 실시하여 난자의 수정을 시도하고, 이에 따른 임신율의 상승을 기대할 수 있는지를 알아보기 위하여 본 연구를 고안하였으며, 수정에 성공한 난자에서 과거 기존의 고식적인 체외수정 방법으로 수정이 안 일어난 이유를 규명하고, 각 불임환자에 따른 가장 적절한 체외수정 방침을 결정하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

1995년 3월부터 1996년 5월까지 불임을 주소로 서울대학교병원 산부인과 불임클리닉을 방문하여 시행한 불임검사 결과 치유될 수 없는 난관 질환, 자궁내막증, 만성 무배란, 원인불명 불임증 등으로 판명되어 체외수정술 이외에는 다른 불임 치료 방법이 없다고 판단된 환자 중 과거의 체외수정술 시행 주기에서 과배란유도 후 채취된 난자가 모두 체외에서 수정이 되지 않았거나 수정률이 매우 불량하였던 환자를 대상으로 본 연구를 시행하였다.

대상 환자의 배우자에서 시행되었던 정액검사상 정자의 수, 운동성 정자의 분포 및 정자의 형태 등은 모두 정상 범위내로서 본 연구 대상 환자에서 남성인자 불임증은 없었다.

2. 연구방법

1) 과배란유도

대상 환자에서 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist (Decapeptyl, D-Trp-6-LH, Ferring, Malmö, Sweden)를 사용한 황체기 장기투여법 (luteal phase long protocol)을 실시하여 과배란유도를 시행하였다 (Chang *et al.*, 1990 & 1994; 문 등, 1991; 김 등 1991 & 1995). 과배란유도 주기 전 월경주기 제 3일 오전 8시에 채혈하여 혈중 황체화호르몬 (lutening hormone, LH), 난포자극호르몬 (follicle stimulating hormone, FSH) 및 estradiol(E2) 농도를 측정하며, 질식 초음파검사 (transvaginal ultrasonography)를 시행하여 골반내 이상 유무를 확인하였다. 월경주기가 일정한 환자에서는 월경주기 제 14일에 난포의 크기 및 배란 유무를 확인하여 월경주기 제 21일에 GnRH agonist의 피하주사를 시작하였다 (ovarian suppression phase).

GnRH agonist의 피하주사 후 월경이 있으면 월경주기 제 3일에 뇌하수체의 기능 억제 유무를 확인하기 위하여 혈중 LH, E₂, progesterone (P₄)을 측정하여 LH < 5 mIU/ml, E₂ < 50 pg/ml, P₄ < 1 ng/ml인 경우 과배란유도를 시작하였다. 또한 월경주기 제 3일에 질식 초음파검사를 시행하여 GnRH agonist에 의한 난소 낭종이 발생하였거나 난관 수종이 있는 경우를 확인하여 질식 초음파

유도하에 질식 천자를 실시하여 흡인 제거하였다. 월경주기 제 3일에 과배란유도를 시작하며, 과배란유도제는 FSH (Metrodin, Serono, Switzerland)와 hMG (Pergonal, Serono, Switzerland)를 복합 사용하였다 (ovarian stimulation phase). 과배란유도를 시작하는 날을 과배란유도 제 1일로 하고, 제 1일과 제 2일에는 오후 6시에 FSH 150 IU를 근육주사하며, 제 3일부터는 매일 오전, 오후에 각각 hMG 150 IU를 근육주사하면서 환자의 난소 반응 상태 및 혈중 E₂ 농도에 따라 과배란유도제 용량의 증감을 조절하였다. 과배란유도 제 6일 부터는 혈중 E₂ 농도와 질식 초음파검사를 시행하여 난포 성장을 관찰하였다. 우성난포 크기의 평균 직경이 18 mm 이상이거나 16 mm 이상인 난포가 3개 이상 관찰되면서 혈중 E₂ 농도가 계속 상승하고, 직경 10 mm 이상인 난포당 혈중 E₂ 농도가 300 pg/ml 이상이면 hCG (Profasi, Serono, Switzerland) 10,000 IU를 근육주사하여 배란을 유도하였다.

LH와 FSH의 혈중 농도는 단일분지계 항체 (monoclonal antibody)를 이용한 immunoradiometric assay (IRMA; Medgenix, Fleurus, Belgium)로 측정하였다. LH 측정의 민감도는 0.2 mIU/ml, intraassay coefficient of variation (CV)는 3.5-6.5%, interassay CV는 4.5-8.8% 이었으며, FSH 측정의 민감도는 0.1 mIU/ml, intraassay CV는 1.6-2.7%, interassay CV는 3.6-5.3% 이었다. E₂의 혈중 농도는 방사면역측정법 (radioimmunoassay, RIA; Spetria, Orion, Finland)으로 측정하였으며, E₂ 측정의 민감도는 20 pg/ml, intraassay CV는 2.9-9.7%, interassay CV는 2.3-10.2%, estrone (E1)과의 교차반응도는 1.3%, estriol (E3)과의 교차반응도는 0.4% 이었다. P₄의 혈중 농도는 progesterone Maia kit를 이용한 방사면역측정법 (RIA; Biodata S.p.A., Roma, Italy)으로 측정하였으며, P₄ 측정의 민감도는 0.022 ng/ml, intraassay CV는 5.7-9.0%, interassay CV는 4.6-8.2% 이었다.

질식 초음파검사는 과배란유도 주기 전 월경주기 제 3일에 처음 실시하여 골반강내의 여러 기관에 대한 이상 유무를 평가한 후 GnRH agonist 투여 시작일과 FSH/hMG 투여 시작일에 실시하며, 과배란유도 제 6일 부터는 hCG 투여 다음 날까지 매일 실시하여 성장하는 난포의 지름을 측정하였다. 오전 8시부터 오전 9시 사이에 동일한 검사자에 의해 실시하며, 질식 초음파단층촬영

영기기는 5.0 MHz frequency의 질식 transducer가 부착된 transvaginal real-time sector scanner (Comibison 310, Kretztechnik, Austria)를 사용하였다.

2) 정액 채취

정액의 채취는 남자 채취 당일에 수음으로 50 ml pyrex beaker에 무균적으로 채취하여 실온에서 30-40 분간 방치하여 액화시킨 후 기본적인 정액검사를 실시하였다. 정액의 농도, 운동성은 세계보건기구 (World Health Organization, WHO, 1992)의 규정에 따라 시행하며, 정자의 형태를 판정하기 위하여 Kruger 등(1986)에 의하여 고안된 정자의 정밀 형태 분석 (strict morphology criteria)에 따랐다. 정자의 회수를 위하여 80% continuous percoll로 세척하여 얻어진 정액을 3.6mM pentoxifylline (3,7-dimethyl-1,5-oxohexylxanthine, Sigma, USA)으로 30분간 처리한 후 원심분리하여 다시 swim-up 처리한 정자를 사용하였다.

3) 남자 채취

남자의 채취는 hCG 10,000IU 근육주사 36시간 후에 질식 초음파 유도하에 질벽을 통하여 난포의 흡인 천자를 이용하여 시행하였다. 남자를 포함하고 있는 난포액을 2 ml의 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS)을 포함하고 있는 난포액 수집통에 흡인하고, 그 직후 다시 2 ml의 D-PBS용액을 사용하여 남자흡인 주사 침안에 붙어있는 남자가 없도록 재확인하였다. 난포액과 D-PBS 용액이 들은 혼합액을 즉시 배양실로 옮겨서 혼합액의 양과 색을 기록하고 배양접시 (#3002, Falcon Plastics, USA)에 옮긴 후 해부현미경 (dissecting microscope)으로 남자의 존재 여부를 확인하고, 남자의 존재가 확인되면 역반사현미경 (inverted microscope)으로 남자의 형태를 관찰하였다. 채취된 남자는 남자-난구세포 복합체 (oocyte-cumulus cell complex, OCCC)의 형태에 따라 미성숙 (immature), 성숙 (mature), 과성숙 (postmature), 변성퇴화 (degenerative) 등으로 구분하였다.

남자를 수정배양액 2 ml가 들어있는 배양접시에 옮긴 후 1-2시간 37°C 5% CO₂ 배양기내에서 배양을 시행하였다. 이후 난구세포를 제거하기 위하여 배양된 남자-난구세포 복합체를 0.1% hyaluronidase가 첨가된 D-PBS 용액에 옮겨서 30초간 Pasteur pipette을 이용하여 흡입과 방출을 반복한 후 수정배양액으로 옮겨 다시 Pasteur pipette을 이용하여 난구세포를 깨끗이 제거하고 3회 세척하였다. 세척된 남자를 수정배양액 2

ml가 들어있는 배양접시에 넣어 ICSI시술 전까지 3-5시간 37°C 5% CO₂ 배양기내에서 배양하였다. ICSI시술을 시행하기 직전에 남자의 성숙도를 재판정하여 제 1극체 (first polar body)가 방출된 제 2감수분열 중기 (metaphase II, M II)의 남자만을 선별하여 ICSI시술의 대상 남자로 사용하였다.

배양액은 Ham's F-10 (Gibco #430-1200)을 이용하여 250 ml의 5차 증류수로 배양액 (4X)을 만들고, penicillin G 75 mg, streptomycin sulfate 75 mg을 추가한 후 가압여과 소독을 시행하여 4°C 냉장고에 보관하였다. 이와 같이 제조된 배양액 (4x) 25 cc에 5차 증류수 75 cc를 첨가하고, calcium lactate 24.52 mg과 NaHCO₃ 210.6 mg을 추가하여 pH는 7.4, 삼투압은 280-285 mOsm/liter가 되도록 하여 매 실험 직전 가압 여과 소독한 후 신생아 제대혈청의 농도가 수정배양액에서는 7.5%, 성장배양액에서는 15%가 되도록 혈청을 첨가한 후 실험에 사용하였다.

4) 남자와 정자의 미세보조 수정술 : 남자 세포질내 정자 주입술(ICSI)

미세보조 수정술, 즉 남자 세포질내 정자 주입술 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)을 위한 집게피펫 (holding pipettes) 및 주입피펫 (injection pipettes)은 Narishige사의 GD-1 유리모세관 (glass capillary tube)을 사용하여 만들었다. 유리모세관은 2% 7x 세척제 (detergent)에서 초음파 세척 후 다시 초순수 증류수에서 30분씩 2회 초음파 세척하고 100°C dry-oven에서 건조 멸균한 후 사용하였다. 집게피펫은 피펫 puller를 이용하여 피펫을 가늘고 길게 뽑은 후 microforge (MF-9, Narishige)에서 자르고 불에 달구어서 (fire polishing) 내경이 15~20µm, 외경이 100~120µm 정도 되게 다듬어서 사용하였다. 주입피펫은 피펫 puller로 가늘고 길게 뽑은 피펫을 미세연마기 (microgrinder)에서 3-5분 동안 갈아서 피펫 끝의 내경이 4-5µm, 외경이 8-9µm 이며, 40°C 정도의 각도를 갖게 하였다. 이때 미세연마기에 증류수를 천천히 떨구어 주어 피펫 내부로 유리 파편이 들어가는 것을 방지하였다.

ICSI 시술은 도립현미경 (Diaphot 300, Nikon, Japan)에 장착된 1쌍의 미세조작기 (NT-88, Narishige, Japan)를 이용하였으며, 사용된 holding pipette은 외경과 내경이 각각 100-120µm, 15-20µm 이었고, injection pipette은 외경과 내경이 각각 8-

9 μ m, 4-5 μ m인 것을 사용하였다.

준비된 운동성 정자를 oil이 덮혀있는 배양접시내의 10% polyvinylpyrrolidone (PVP) 용액 소적에 넣어 정자의 운동성을 감소시키고, 주입피펫을 이용하여 정자의 중편부 (midpiece)에 물리적인 힘을 가하여 비활동화 (immobilization)시켰다. 비활동화된 정자를 꼬리 부위부터 주입피펫내로 흡입하였다. 집게피펫을 이용하여 준비된 성숙난자 (M II)의 방출된 제 1 극체가 6시, 혹은 12시 방향이 되도록 난자를 고정한 후 주입피펫을 난자의 정중양인 3시에서 9시 방향으로 통과시켜 난자의 세포질내로 정자를 주입하였다. 즉 정자 주입시 주입피펫으로 난자의 세포질을 흡입하여 난막 (oolemma)이 정확히 관통되었음을 확인하였고, 이후 PVP 용액이 난자 세포질내로 들어가지 않도록 조심스럽게 정자와 흡입된 난자의 세포질을 다시 주입하였다. 정자 주입이 완료된 후 oil이 피복된 수정배양액의 20 μ l 소적 마다 1개씩의 난자를 넣어서 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 배양기내에서 배양하였다.

5) 난자의 수정 확인

ICSI 시술 16-18시간 후 역반사현미경 ($\times 200$, $\times 400$)을 이용하여 난자의 손상 여부 및 전핵의 형성 여부 등을 자세히 관찰하였다. 2개의 극체 (polar body)와 세포질내에 핵소체 (nucleolus)를 포함하고 있는 선명한 2개의 전핵 (pronucleus)이 관찰되면 정상적으로 수정된 배아로 간주하였다. 정상적으로 수정된 배아에서 24시간 후 배아의 난할 (cleavage)을 관찰하였으며, 할구 (blastomeres)의 균등성, 할구파편 (anucleate fragments)의 포함 정도 등에 따라 배아의 질적 등급 (embryo grading)을 평가하였다 (김 등, 1995).

6) 배아 이식 및 임신 확인

난할이 확인된 배아는 Jones 등(1983)이 고안한 배아이식관 (transfer catheter)을 이용하여 등급이 좋은 배아를 최고 6개까지 환자의 자궁내로 이식하며, 여분의 배아는 냉동보존 (cryopreservation)시켰다 (문 등, 1994). 배아의 자궁내이식 후에는 최소한 4시간 정도 안정을 취하고, 난자 채취 당일부터 progesterone in oil 12.5 mg (Progest, Samil, Korea)을 임신이 확인될 때까지 계속 근육주사하여 황체기 보강을 실시하였다.

임신의 확인은 배아이식 후 제 11일에 혈중 β -hCG 농도를 확인하여 3 mIU/ml 이상이고, 1주일 후 실시한 추적검사에서 혈중 β -hCG의 상승을

보이며, 임신 제 5-6주경에 실시한 질식 초음파 검사에서 태낭 (gestational sac) 및 태아의 심장 박동이 관찰되는 경우와 임상적으로 유산이 의심되어 실시한 인공소파술에 의하여 병리조직학적으로 태아 조직이 확인된 경우를 임상적 임신으로 판정하였다. 생화학적 임신 (biochemical pregnancy)은 혈중 β -hCG 농도의 상승 후 감소를 보이는 경우로 정의하였으며, 임상적 임신의 범주에서 제외하였다. 임상적 임신으로 진단된 환자는 임신 및 분만의 결과를 추적 관찰하여 확인하였다.

β -hCG의 측정은 hCG-beta-kit (Serono Diagnostics, Switzerland & International)를 이용한 방사면역측정법 (RIA)을 사용하였으며, 측정의 민감도는 3 mIU/ml, intraassay CV는 3.1%, interassay CV는 6.0% 이었다.

7) 연구 결과 분석 및 통계 방법

연구 결과에 대한 통계학적 분석은 chi-square test, Student's t-test 등을 이용하였으며, $p < 0.05$ 인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

서울대학교병원 산부인과 불임클리닉에서 시행받은 기왕의 체외수정시술시 과배란유도 후 채취된 난자 모두에서 체외수정시 수정이 되지 않았거나 수정율이 매우 불량하였던 본 연구의 대상 환자는 총 19명 (27주기)으로서 평균 연령은 34.1 ± 2.4 세 (31 - 40세) 이었다 (Table 1).

대상 환자들에서 체외수정시술의 적응증은 난관인자 불임증이 8명, 자궁내막증이 6명, 원인불명 불임증이 3명, 골반내 유착증이 1명, 만성 무배란 불임증이 1명 이었다. 대상 환자들의 배우자에서 시행되었던 정액검사 결과 정자의 수, 운동성 정자의 분포, 정자의 형태 등에서의 이상은 발견되지 않았다.

월경주기 제 3일에 실시한 기저 혈중 호르몬 농도는 LH가 5.0 ± 2.7 mIU/ml (1.0 - 11.1 mIU/ml), FSH가 10.8 ± 4.3 mIU/ml (4.1 - 20.2 mIU/ml), E2가 25.9 ± 12.4 pg/ml (10.0 - 48.0 pg/ml)이었다.

본 연구를 시행하기 전 19명의 대상 환자에서 시행한 기왕의 체외수정시술 주기는 모두 30주기로서 과배란유도 후 채취된 난자의 수는 10.50 ± 6.13 개 (2 - 27개) 이었으며, 고식적인 방법으로 체외수정을 실시하여 얻어진 배아의 수는 $1.43 \pm$

2.40개 (0 - 8개) 이었고, 난자의 수정율은 평균 $10.0 \pm 14.9\%$ 이었다 (Table 2).

27주기의 연구 대상 주기에서 과배란유도 후 채취된 난자의 수는 10.57 ± 5.53 개 (3 - 24개) 이었으며, 이중 ICSI를 실시할 수 있었던 성숙난자의

수는 7.89 ± 4.30 개 (2 - 19개) 이었다. ICSI 시술 후 난자의 수정율은 평균 $67.9 \pm 20.2\%$ 이었으며, 체외배양 후 자궁내이식에 적합한 수정란의 발달 단계를 보여 자궁내이식을 실시한 배아의 수는 4.36 ± 1.77 개 (2 - 7개) 이었다. 자궁내이식된 배아들에서의 누적배아지수 (cumulative embryo score, CES)는 평균 41.8 ± 27.4 (10 - 112) 이었다.

배아이식 제 11일 후에 실시한 혈중 β -hCG 농도 측정 결과 β -hCG의 상승을 보인 경우는 8명으로서 임신율은 시술주기당 29.6% (8/27), 시술환자당 42.1% (8/19) 이었으며, 이중 질식 초음파 검사로 자궁내 태반이 확인되어 임상적 임신으로 판정된 경우는 6명으로서 임상적 임신율은 시술주기당 22.2% (6/27), 시술환자당 31.6% (6/19) 이었다.

고 찰

체외수정시술 분야에서 1988년 이후 정자의 결함에 의한 남성인자 불임환자에 대한 치료적 접근으로 난자와 정자의 미세조작 (micromanipulation)을 이용한 여러 종류의 미세보조 수정술 (microassisted fertilization, MAF)이 이용되기 시작하였고, 이에 따라 보조생식술은 지대한 발전을 거듭하게 되었다 (Cohen *et al.*, 1988; Fishel, 1993a & 1993b). 초기에는 미세보조 수정술로서 partial zona dissection (PZD)이 개발되었고 (Cohen *et al.*, 1991 & 1992; Cohen, 1992), 난자의 난황막 주위 공간 (perivitelline space)에 정자를 넣어주는 su-

Table 1. Clinical characteristics of 19 patients undergoing ICSI

No. of patients	19
No. of IVF-ET cycles	27
Age of patients(years)	
Mean	34.1 ± 2.4
Range	31 - 40
Indications of IVF-ET	
Tubal factor	8
Endometriosis	6
Unexplained	3
Pelvic adhesion	1
Chronic anovulation	1
Basal serum hormone levels on	
MCD #3	
LH(mIU/ml)	
Mean	5.0 ± 2.7
Range	1.0 - 11.1
FSH(mIU/ml)	
Mean	10.8 ± 4.3
Range	4.1 - 20.2
E ₂ (pg/ml)	
Mean	25.9 ± 12.4
Range	10.0 - 48.0

Mean \pm SD

MCD: menstrual cycle date

Table 2. Outcomes of IVF-ET in 19 patients undergoing ICSI

No.	Previous cycles	ICSI cycles
Patients	19	19
Cycles	30	27
Oocytes retrieved	$10.50 \pm 6.13(2 - 27)$	$10.57 \pm 5.53(3 - 24)$
Oocytes optimal for ICSI	-	$7.89 \pm 4.30(2 - 19)$
Fertilization rate(%)	10.0 ± 14.9	67.9 ± 20.2
Embryos transferred	$1.43 \pm 2.40(0 - 8)$	$4.36 \pm 1.77(2 - 7)$
Cumulative embryo score(CES)	-	$41.8 \pm 27.4(10 - 112)$
Pregnancies	0	8
PR/cycle(%)		29.6(8/27)
PR/patient(%)		42.1(8/19)
Clinical pregnancies	0	6
PR/cycle(%)		22.2(6/27)
PRatient(%)		31.6(6/19)

Mean \pm SD with ranges in parentheses

PR: pregnancy rate

bzonal sperm insertion (SUZI)이 사용되었으며 (Ng *et al.*, 1988; Fishel *et al.*, 1992; Palermo *et al.*, 1992a; Wolf *et al.*, 1992), 이어 정자를 난자의 세포질내에 직접 주입하는 intracytoplasmic sperm injection (ICSI)이 도입되어 획기적인 미세보조 수정술의 발전과 함께 체외수정술시 임신 성공률이 다수 보고되고 있다 (Palermo *et al.*, 1992b & 1993).

미세보조 수정술에 대한 여러 연구자들의 연구 결과를 종합 분석하여 보면 PZD는 일정한 수정률 및 임신 성적을 내지 못하고 있어 SUZI로 대체되고 있으나 (Wiker *et al.*, 1993), SUZI도 정자의 수, 운동성, 형태 및 임신 결과 사이에 분명한 상관관계를 보여주지 못하고 있다. 여기에 수반되어 PZD와 SUZI는 수정되는 난자에서 다정자증이 큰 문제점으로 지적되고 있다. 그러나 가장 침습적 방법 (invasive technique)인 ICSI는 SUZI와 비교할 때 상대적으로 좋은 성적을 나타내고 있는 등 최근에는 미세보조 수정술 중 ICSI 기술의 임상적 유용성과 우월성이 확립되어 향후 ICSI가 미세보조 수정술의 대표적인 방법으로 사용이 될 것으로 인지되고 있다 (Van Steirteghem *et al.*, 1993a & 1993b; Tournaye *et al.*, 1994; Tucker *et al.*, 1995). 현재까지는 대상 환자의 선택 기준 (patient selection criteria)이 각 연구자마다 서로 상이하여 연구 결과 성적을 그대로 난자의 미세보조 수정술에 의한 임신 성공률로 받아들일 수는 없다는 문제점을 내포하고 있으며, 아직도 명확한 남성인자를 제외하고는 ICSI 기술의 임상 적응증이 확실하게 설정되어 있지 않은 실정이다 (Malter *et al.*, 1993).

남성인자 불임증은 두가지 측면에서 고려될 수 있는데 양적 결함, 즉 정액검사가 항상 이상 소견을 보이고 형태학적으로 정상적인 운동성 정자의 수가 감소되어 있는 경우 (quantitative spermatogenic or maturation disorder)에는 미세보조 수정술의 명백한 적응증이 될 수 있지만 질적 결함, 즉 정상적인 정액검사의 소견을 보이면서 수정이 일어나지 않는 경우 (qualitative disorder)에는 양적 결함에 비하여 진단도 힘들 뿐만 아니라 체외수정술시 미세보조 수정술의 적응증으로 미리 고려하기가 어렵다 (Sathananthan *et al.*, 1991; Liu & Baker, 1992a). 특히 이러한 환자들은 정상적인 정액검사 소견을 보일 뿐만 아니라 대부분 과거에 비뇨기과적 질병에 노출된 경험이 없으

며, 항정자 항체 (antisperm antibody, ASA) 검사도 음성으로 나타나 흔히 원인불명 불임증 (unexplained infertility)으로 진단되기도 하고, 특수검사를 시행하여 보면 정자의 수정 능력에 문제가 있는 것으로 밝혀지는 경우로서 (Liu *et al.*, 1989; Liu & Baker, 1992b), 공여자의 정액 (donor semen)을 사용하여 교차수정실험 (cross fertilization IVF test)을 시행하면 확실한 진단이 가능하여 일반적인 정액검사 결과는 정상이지만 질적으로 문제가 있어서 수정이 일어나지 않는다는 것이 밝혀지기도 한다.

이차적으로 난자가 비정상적인 경우에도 미세보조 수정술을 시행할 수 있다. 일부 불임환자에서는 난자가 형태학적으로는 잘 성숙된 것처럼 현미경하에서 관찰되어도 투명대가 구조적으로 비정상적인 경우가 있다. 즉 투명대내의 정자 수용체 (sperm receptors)가 적절한 작용을 하지 않거나, 혹은 투명대를 구성하고 있는 물질이 정자가 통과하기 어렵게 하는 경우를 생각할 수 있다. 이러한 경우에도 기존의 체외수정 방법으로 수정이 일어나지 않을 수 있으며, 이를 미리 진단하는 것은 어렵다. 따라서 수회의 수정 실패, 또는 낮은 수정율을 경험한 후 이러한 원인을 고려하여 볼 수 있게 되며, 이후의 체외수정술시에는 기존의 수정 방법으로 성공을 거둘 수 없을 것을 예측할 수 있게 된다.

이러한 이론적 근거로 Tucker 등(1993)은 과거 체외수정술 시행 주기에 수정이 되지 아니하였거나 심한 남성인자 불임환자들은 고농도 ($1 - 5 \times 10^6/ml$)의 정자 microdroplet을 이용한 수정 방법으로 체외수정을 실시하고, 수정이 안되면 미세보조 수정술을 사용하여 재수정을 시켜야 한다고 보고하였다. 정자의 농도를 올려서 수정을 시키면 미세보조 수정술과 비교하여도 비교적 좋은 성적을 올릴 수 있다고 보고된 바 있고 (Mashiach *et al.*, 1993; Tucker *et al.*, 1993), 이를 통하여 수정율은 낮게는 16% (Trounson & Webb, 1984)에서 높게는 70% (Boldt *et al.*, 1987)로 보고되었으나 난자의 질은 채취 후 24 시간이 경과하면 불량하게 변하고, 따라서 수정율도 낮으며, 수정에 성공한 수정란 역시 그 질이 불량하게 된다 (Tsirigotis *et al.*, 1995). 따라서 수정에 실패한 난자를 1일 후 ICSI 기술을 이용하여 수정을 시도한 결과 수정의 성공과 다정자증의 방지에는 어느 정도 효과를 보이지만 (Nagy *et al.*, 1995),

특히 임신율은 기대한만큼 보고되고 있지 못하며 (Tsirigotis *et al.*, 1995), 이미 수정 과정이 진행되고 있는 난자에 손상을 줄 수 있는 가능성도 내포하게 된다 (Hobart & Roberto, 1995). Tsirigotis 등(1995)은 수정에 실패한 난자에 1일 후 ICSI 기술을 시행하는 것은 치료적 목적 보다는 다음 체외수정기술 주기를 위한 예측으로서의 진단적 목적이 더 중요할 것이라고 보고한 바 있다. 또한 정액검사 자체는 정상이지만 정자가 난자의 투명대와 결합하여 투명대를 통과할 수 있는 능력에 결함이 있는 경우 모든 난자에서 수정에 실패할 수 있고, 이러한 경우 다음 주기에서도 기존의 수정 방법으로는 동일한 실패를 경험하게 되며, 이에 따라 이러한 불임환자들에서도 미세보조 수정술이 요구된다 (Ng *et al.*, 1990; Tucker *et al.*, 1993). 이에 더불어 ICSI 기술에 의하여 단 한개의 정자만을 난자에 주입하여 다정자증을 방지하는 것에 대한 임상적 가치도 보고되고 있다 (Palermo *et al.*, 1992a). 최근에는 모든 체외수정기술시 처음부터 기존의 체외수정 방법을 사용하지 않고 일차적으로 ICSI 기술에 의한 난자의 수정을 시도하자는 보고도 나오고 있다 (Tucker *et al.*, 1995).

본 연구에서 과거 체외수정기술 시행 주기에서 과배란유도 후 채취된 난자에서 모두 수정이 일어나지 않았거나 수정율이 극히 낮았던 불임환자들을 대상으로 다음 체외수정기술 주기에서 미세조작을 이용한 ICSI 기술을 시행하여 난자와 정자의 체외수정을 실시한 결과 난자의 평균 수정율은 67.9±20.2%, 자궁내이식된 배아의 평균 누적배아지수 (CES)는 41.8±27.4, 시술주기당 및 시술환자당 임신율은 각각 29.6%, 42.1%를 나타내는 등 체외수정기술시 양호한 ICSI 기술 결과를 얻을 수 있어 ICSI 기술을 이용한 합리적인 난자의 미세보조 수정술을 개발 확립할 수 있었다. 따라서 과거 수정에 실패하여 배아이식을 시도하여 볼 수 없었던 불임환자들에게 체외수정기술 시행시 과배란유도 후 채취된 난자를 대상으로한 일차적인 ICSI 기술이 임상적으로 고려될 수 있을 것으로 사료되며, 이에 따라 난자가 체외에서 수정이 되지 않은 원인 등에 대한 생식생리학적 연구가 가능하게 되어 불임환자의 진단 및 치료에 많은 도움을 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

향후 ICSI 기술에 대한 심도깊은 연구가 필요

하겠지만 본 연구 결과를 통하여 난자 세포질내 정자 주입술, 즉 ICSI 기술을 이용한 합리적인 미세보조 수정술의 임상 적응증을 확대 설정하고, 체외수정기술 등을 위시한 보조생식술에 임상적으로 적용하여 과거 과배란유도 주기에서 수정상의 제반 문제가 야기된 경우 등에서 성공적인 난자와 정자의 수정을 시도할 수 있으며, 각 체외수정기술 대상 환자에서 가장 적절한 난자의 체외수정 기술 방침을 결정하여 궁극적으로 불임부부에서 체외수정기술 후 임신 성공율의 증진을 획기적으로 도모할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

1995년 3월부터 1996년 5월까지 서울대학교병원 산부인과 불임클리닉에서 시행받은 기왕의 체외수정기술시 배우자에서 실시한 정액검사는 정상이면서 과배란유도 후 채취된 난자 모두에서 체외수정시 수정이 되지 않았거나 수정율이 매우 불량하였던 불임환자 19명을 대상으로 미세보조 수정술 (MAF)에 의한 난자 세포질내 정자 주입술 (ICSI)을 이용한 체외수정기술 27주기를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대상 환자들의 평균 연령은 34.1±2.4세 (31 - 40세) 이었으며, 체외수정기술의 적응증은 난관인자 불임증이 8명, 자궁내막증이 6명, 원인불명 불임증이 3명, 골반내 유착증이 1명, 만성 무배란 불임증이 1명 이었다.
2. 기저 혈중 호르몬 농도는 LH가 5.0±2.7 mIU/ml (1.0 - 11.1 mIU/ml), FSH가 10.8±4.3 mIU/ml (4.1 - 20.2 mIU/ml), E₂가 25.9±12.4 pg/ml (10.0 - 48.0 pg/ml) 이었다.
3. 기왕의 체외수정기술 30주기에서 과배란유도 후 채취된 난자의 수는 10.50±6.13개 (2 - 27개), 고식적인 체외수정을 실시하여 얻어진 배아의 수는 1.43±2.40개 (0 - 8개) 이었고, 난자의 수정율은 평균 10.0±14.9% 이었다.
4. ICSI 기술 27주기에서 과배란유도 후 채취된 난자의 수는 10.57±5.53개 (3 - 24개), 이중 ICSI를 실시할 수 있었던 성숙난자의 수는 7.89±4.30개 (2 - 19개) 이었고, ICSI 기술 후 난자의 수정율은 평균 67.9±20.2% 이었다. 자궁내이식된 배아의 수는 4.36±1.77개 (2 - 7개) 이었으며, 누적배아지수 (CES)는 평균 41.8±27.4 (10 - 112) 이었다.

5. ICSI 시술을 이용한 체외수정시술 결과 임신율은 시술주기당 29.6% (8/27), 시술환자당 42.1% (8/19) 이었으며, 임상적 임신율은 시술주기당 22.2% (6/27), 시술환자당 31.6% (6/19) 이었다.

본 연구 결과 난자 세포질내 정자 주입술 (ICSI) 을 이용한 합리적인 난자의 미세보조 수정술 (MAF)이 개발 확립되었으며, 임상적으로 적용하여 체외수정시술시 과거 과배란유도 후 채취된 난자에서 고식적인 체외수정 방법으로 수정이 일어나지 않은 경우 등에서 성공적인 난자와 정자의 수정을 시도할 수 있어서 난자 세포질내 정자 주입술의 체외수정시술에 있어서의 임상적 유용성을 확인할 수 있었을 뿐만 아니라 궁극적으로 불임부부에서 체외수정시술 후 임신 성공율의 증진을 획기적으로 도모할 수 있을 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

- 김석현, 송은섭, 송용상, 이경희, 김정구, 문신용, 이진용, 장윤석: 기초 혈중 Follicle Stimulating Hormone 농도가 높은 체외수정시술 환자의 과배란유도시 Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist의 단기투여법과 장기투여법의 비교. 대한불임학회지 1991, 18(2), 201-208.
- 김석현, 지병철, 정경남, 김희선, 류범용, 오선경, 문신용, 이진용, 장윤석: 체외수정시술시 다태임신의 예방에 관한 연구: 배아 등급과 누적배아지수의 의의. 대한산부회지 1995, 38(12), 2333-2346.
- 문신용, 김정훈, 김석현, 최영민, 신창재, 김정구, 이진용, 장윤석: 인간 배아의 동결보존에 관한 연구. 대한불임학회지 1994, 21(2), 137-147.
- 문신용, 최진, 송용상, 김석현, 김정구, 이진용, 장윤석: 체외수정시술을 위한 과배란유도시 Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist의 장기투여법과 단기투여법의 비교. 대한산부회지 1991, 34(8), 1125-1133.
- Boldt J, Howe AM, Butler WJ, McDonough PG, Padilla SL: The value of oocyte reinsemination in human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1987, 48, 617-623.
- Chang YS, Kim CH, Kim SH, Shin CJ, Kim JG, Moon SY, Lee JY: Use of GnRH Agonist in IVF Program. In: Mori T, Tominaga T, Aono T, Hiroi M, eds. *Frontiers in Endocrinology: Perspectives on Assisted Reproduction*(Vol. 4). Ares-Serono Symposia Publications, 1994, 285-291.
- Chang YS, Kim SH, Shin CJ, Kim JG, Moon SY, Lee JY: The Efficacy of a Combination Administration of Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist and Gonadotropins for Controlled Ovarian Hyperstimulation in IVF Program. *Asia-Oceania J Obstet Gynecol* 1990, 16(3), 337-345.
- 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.
- Cohen J, Alikani M, Malter HE, Adler A, Talansky BE, Rosenwaks Z: Partial zona dissection or subzonal sperm insertion: microsurgical fertilization alternatives based on evaluation of sperm and embryo morphology. *Fertil Steril* 1991, 56, 696-706.
- Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z: Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* 1992, 7, 685-691.
- Cohen J, Malter HE, Fehilly C, Wright G, Elsner CW, Kort HI, Massey JB: Implantation of embryo after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. *Lancet* 1988, 2, 162.
- Dehninger S, Acosta AA, Morshedi M, Vecck L, Swanson RJ, Simmons KF, Rosenwaks Z: Corrective measures and pregnancy outcome in IVF in patients with severe sperm morphology abnormalities. *Fertil Steril* 1988, 50, 283-287.
- Fishel S: Historical overview of the use of micromanipulation. In: Fishel S, Symonds EM, eds. *Gamete and embryo micromanipulation in human reproduction*. London: Edward Arnold, 1993a, 3-17.
- Fishel S: Gamete and embryo micromanipulation in human reproduction: perspicacity or opacity? In:

- Fishel S, Symonds EM, eds. Gamete and embryo micromanipulation in human reproduction. London: *Edward Arnold*, 1993b, 193-204.
- 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.
- Hobart B, Roberto BG: ICSI of unfertilized oocytes after IVF insemination: are the traditional markers of fertilization adequate? *Hum Reprod* 1995, 10, 491-493.
- Jones HW Jr, Acosta AA, Garcia JE, Sandow BA, Veeck L: On the transfer of conceptus from oocytes fertilized in vitro. *Fertil Steril* 1983, 39, 241.
- Jones HW Jr, Jones GS, Andrews MC, Acosta A, Bundren C, Garcia J, Sandow B, Veeck L, Wikes C, Witmyer J, Wortham JE, Wright GL: The program for in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 1982, 38, 14.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, Van der Merwe JP, Van Zyl JA, Smith K: Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986, 46, 1118-1123.
- Liu DY, Baker HWG: Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil Steril* 1992a, 58, 465-483.
- Liu DY, Baker HWG: Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil Steril* 1992b, 58, 1178-1184.
- Liu DY, Lopata A, Johnston WIH, Baker HWG: Human sperm-zona pellucida binding, sperm characteristics and in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1989, 4, 696-701.
- Malter HE, Cohen J, Alikani J, Grifo J, Talansky BE, Rosenwaks Z: Microsurgical fertilisation and zona pellucida micromanipulation. In: Fishel S, Symonds EM, eds. Gamete and embryo micromanipulation in human reproduction. London: *Edward Arnold*, 1993, 101-114.
- Mashiach S, Bider D, Ben-Shlomo I, Ben-Rafel Z, Dor J: Micro-assisted reproduction: is it the treatment of choice after fertilization failure. In: Fishel S, Symonds EM, eds. Gamete and embryo micromanipulation in human reproduction. London: *Edward Arnold*, 1993, 133-140.
- Nagy ZP, Joris H, Staessen C, Devroey P, Liu J, Van Steirteghem AC: Prospective, auto-controlled study on reinsemination of failed-fertilized oocytes by intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995, 64, 1130-1135.
- Ng SC, Bongso A, Ratnam SS, Sathananthan H, Chan CLK, Wong PC, Haggulund L, Anandakumar C, Wong YC, Goh VHH: Pregnancy after transfer of multiple sperm under the zona. *Lancet* 1988, 2, 790.
- Ng SC, Bongso A, Sathananthan H, Ratnam SS: Micromanipulation: its relevance to human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990, 53, 203-219.
- Palmero 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.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992a, 340, 17-18.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Induction of acrosome reaction in human spermatozoa used for subzonal insemination. *Hum Reprod* 1992b, 7, 248-254.
- Sathananthan AH, Kola I, Osborne J, Trounson A, Ng SC, Bongso A, Ratnaq SS: Centrioles in the beginning of human development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88, 4806-4810.
- Tournaye H, Devroey P, Camus M, Staessen C, Bollen N, Smith J, Van Steirteghem AC: Comparison of in vitro fertilization in male and tubal infertility. *Hum Reprod* 1992, 7, 218-222.
- Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, Van Steirteghem AC: 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.
- Trounson A, Webb J: Fertilization of human

- oocytes following reinsemination in vitro. *Fertil Steril* 1984, 41, 816-819.
- Tsirigotis M, Bennett V, Nicholson N, Pelekanos M, Taranissi M, Craft I: Late intracytoplasmic sperm injection in unexpected failed fertilization in vitro: diagnostic or therapeutic? *Fertil Steril* 1995, 63, 816-819.
- Tucker MJ, Wiker S, Massey J: Rational approach to assisted fertilization. *Hum Reprod* 1993, 8, 1778.
- Tucker MJ, Mayer MP, Wright G, Ingargiola PE, Morton PC, Jones AE: Practical evolution and application of direct intracytoplasmic sperm injection for male factor and idiopathic fertilization failure infertilities. *Fertil Steril* 1995, 63, 820-827.
- Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde MP, Van Assche E, Devroey P: Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection and by subzonal insemination: report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod* 1993a, 8, 1055-1060.
- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staesen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P: High fertilization and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993b, 8, 1061-1066.
- Veeck LL, Wortham JWE Jr, Witmyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JE, Jones GS, Jones HW Jr: Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983, 39, 594.
- Wiker SR, Tucker MJ, Wright G, Malter HE, Kort HI, Massey JB: Repeated sperm injection under the zona following initial fertilization failure. *Hum Reprod* 1993, 8, 467-469.
- Wolf JP, Bucot B, Kunstmann JM, Frydman R, Jouannet P: Influence of sperm parameters on outcome of subzonal insemination in the case of previous IVF failure. *Hum Reprod* 1992, 7, 1407-1413.
- World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.