

## 동결 보존된 고환 정자로 ICSI 시술 후 수정된 수정란의 이식에 의한 임신 1례

<sup>1</sup>분당차병원 불임센터, <sup>2</sup>차병원 여성의학연구소, <sup>3</sup>분당차병원 비뇨기과, <sup>4</sup>포천중문의과대학교  
이우식<sup>1,4</sup> · 김종식<sup>2</sup> · 김현규<sup>2</sup> · 김영찬<sup>3</sup> · 박 찬<sup>1,4</sup> · 김시영<sup>1,4</sup> · 고정재<sup>2,4</sup> · 차광열<sup>2,4</sup>

### A Case of Pregnancy from Embryos following ICSI with Frozen-Thawed Testicular Sperms

Woo-Sik Lee<sup>1,4</sup>, Jong-Sik Kim<sup>2</sup>, Hyun-Kyoo Kim<sup>2</sup>, Young-Chan Kim<sup>3</sup>, Chan Park<sup>1,4</sup>,  
Si-Young Kim<sup>1,4</sup>, Jung-Jae Ko<sup>2,4</sup> and Kwang-Yul Cha<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Infertility Medical Center, Pundang Cha General Hospital, <sup>2</sup>Infertility Medical Center,  
Cha General Hospital, <sup>3</sup>Department of Urology, Pundang Cha General Hospital,  
<sup>4</sup>College of Medicine, Pochon CHA University

#### = Abstract =

This case report describes the pregnancy following the transfer of embryos generated from intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using frozen-thawed sperms obtained by testicular sperm extraction (TESE) in patient with hypoplasia of vas deferens.

**Key Words:** TESE, Frozen-thawed sperm, ICSI, Pregnancy

#### 서 론

고환 기능이 정상인 폐쇄성 무정자증 환자의 경우 미세수술적 부고환 정자 흡입술 (microsurgical epididymal sperm aspiration, MESA)과 고환조직 정자 채취술(testicular sperm extraction, TESE)로 정자를 채취하여 세포질내 정자 주입술(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)을 실시하면, 일반적인 체외수정 방법으로 수정이 어려운 남성불임 환자에게도 높은 수정률과 임신율을 얻을 수 있다 (Temple-Smith *et al.*, 1985; Van Steir-teghem *et al.*, 1993; Silber *et al.*, 1995). 이중 부고환 폐쇄, 부고환 형성부전 등과 같이 부고환에서 정자채취가 불가능한 경우에는 TESE를 통하여 정자를 채취할 수 있다.

그리고 수술적 정자 채취법으로 얻어진 정자는 동결 보존술을 이용하면 과배란 유도 때마다 정자채취 기술을 반복해야 하는 불편을 감소시킬

수 있다 (Devroey *et al.*, 1995).

고환이나 부고환에서 추출한 정자는 매우 약한 운동성을 보이거나 운동성이 전혀 없는 경우가 많다. 이러한 경우 정자를 배양액이나 Vero cells과의 공배양 등을 통해서 운동성의 지속과 향상을 얻을 수 있다 (W. Rohini Edirisinghe *et al.*, 1996; 김현규 등, 1997).

MESA나 TESE로 얻어진 정자를 동결-융해한 후 ICSI 시술로 임신에 성공한 사례 (Nagy Z, *et al.*, 1995; Carol A. Holden, Ph.D. *et al.*, 1997)가 국외에 보고된 이래로, 국내에서는 동결-융해한 MESA 정자로 임신에 성공한 예 (손일표 등, 1994)와 MESA 정자로 ICSI 시술한 후 얻어진 수정란의 동결 후 배아 이식으로 임신에 성공한 예가 있다 (문신용 등, 1997).

본 증례는 TESE 정자를 동결-융해한 후 ICSI 시술로 얻어진 수정란을 배양시켜 배아 이식을 실시하여 임상적 임신에 성공한 예로서 문헌고찰과 함께 보고하는 바이다.

## 증 례

남자환자의 나이는 32세로 타 병원에서 무정자 증 판정을 받고 본원을 방문하였다. 비뇨기과 검사를 통하여 정관의 형성부전 소견이 나왔고 고환 생검을 실시한 결과 정자의 존재가 확인되어 MESA를 권유하였다. 부고환의 4곳에서 정자채취를 시도하였으나 정자가 발견되지 않아 TESE를하기로 결정하였다.

환자의 부인은 28세로 월경력상 월경주기는 32~33일 정도였고 자궁 초음파 사진 및 자궁난관 조영술 소견은 정상이었으며 배란장애는 보이지 않았다. 생리 3일째 혈액검사 소견은 LH 3.4 mU/ml, FSH 5.2  $\mu$ U/ml, TSH 1.51  $\mu$ U/ml, Prolactin 16.3 ng/ml였다.

첫 주기에서는 FSH와 HMG를 사용하여 과배란 유도를 실시하였다. 과배란을 유도한지 10일째 우성난포의 직경이 25 mm, Estradiol 치가 2645.7 pg/ml로 hCG 10,000 IU를 투여하여 36시간이 지난 뒤에 질식 초음파를 사용하여 질벽을 통해 난자를 채취하였다.

hCG 투여 다음날 TESE를 실시하였다. 국소마취 하에 음낭 및 초막을 약 3 cm 정도 절개한 후 백막을 0.5 cm 정도 절개하여 고환조직을 추출하였다. 추출한 고환조직은 50% human FF (Follicular Fluid)가 첨가된 Bicarbonate Ham's F-10 배양액이 담긴 Organ culture dish로 옮기고 Scalpel blade으로 세정관을 짜낸 후 나온 추출물을 새로운 dish로 옮긴 후 200배 현미경 하에서 정자의 존재 유무와 운동성을 확인하였다. 운동성이 없는 정자가 49%, 운동성을 보이는 정자가 51% 정도 발견되었고 ICSI 기술을 위해 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 단순 배양하였다.

정자가 회수된 다음날 총 12개의 난자가 채취되었고 채취한 난자를 15% FF가 첨가된 HTF 배

양액에서 3시간 정도 배양한 후 0.1% Hyaluronidase로 처리하여 난구세포를 제거한 후 다시 3시간 정도 배양하였다. 현미경하에서 제 1극체가 방출된 Metaphase II 상태의 10개의 난자가 ICSI 시술에 사용되었다.

이날 운동성을 가진 정자가 약 53% 정도로 증가하였고 ICSI 기술을 위해 1500 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 얻어진 pellet에 0.3 ml 정도의 배양액을 섞었다. 준비된 난자와 정자로 ICSI를 하였고 약 16~20시간 후에 전핵형성 유무로 수정 확인을 한 결과 5개의 수정란을 얻었으며 이중 2개의 수정란은 나팔관속에 이식하였으며 나머지 3개는 1일간 더 배양한 후 4~8 세포기 때에 자궁속으로 이식하였다. 임신검사는 배아 이식 후 13일째에 혈청내  $\beta$ -hCG의 수치로 판정하였으나 임신에 실패하였다.

ICSI를 시행한 다음날까지 정자를 50% human FF가 첨가된 Bicarbonate Ham's F-10 배양액에 단순 배양한 결과 운동성을 가진 정자 중 전진성의 운동성을 보이는 정자가 약 78% 가까이 증가하여 동결을 시행하였다. TEST (TES and Tris) yolk 완충용액을 정자가 담긴 배양액과 1:1 비율로 섞은 후 액체질소 표면에서 약 10분간 정지한 후 -196°C 액체질소에 옮겨 동결하였다. 3일간 배양한 정자의 활동성의 변화는 아래의 표와 같다 (Table 1).

두 번째 주기에서는 GnRH agonist와 FSH/hMG를 사용한 장기요법을 실시하여 과배란 유도를 한 결과 11개의 난자를 채취하였다. 동결된 정자는 hCG 투여 다음날 급속융해 방법으로 준비하였다. 액체질소에서 보관 중인 정자를 꺼내 상온에서 40초 정도 방치한 후 35°C의 항온 수조에서 완전히 녹을 때까지 융해하였다. 융해된 정자는 50% human FF가 첨가된 Bicarbonate Ham's F-10 배양액으로 세척하여 동결시 첨가되었던 TEST yolk 완충용액을 제거하고 Organ culture dish에 옮

Table 1. Outcome of changes in motility during in-vitro culture of testicular sperm

	Immotile sperm	Shaky sperm	Progressive sperm		
			Slow	Moderate	Rapid
1일	71	57	11	7	0
2일	150	79	29	14	47
3일	171	43	36	32	82

(단위:  $\times 10^4$ /ml)

겨 다음날까지 배양하였다. 11개의 난자 중 10개의 난자가 Metaphase II 상태였으며 같은 방법으로 ICSI를 하였다.

이중 5개의 난자가 수정되어 3개의 수정란을 나팔관 속에 이식하였고, 나머지 2개는 1일간 더 배양하여 4~8 세포기 때에 자궁속으로 이식하였다. 배아 이식 13일 후  $\beta$ -hCG 검사로 임신이 확인되었고 30일 후 2개의 임신낭으로 임상적 쌍태아 임신을 확인하게 되었다.

## 고 찰

남성 불임환자에게 있어서 외과적 수술방법으로 정자를 채취하는 방법은 1985년 Temple-Smith 등에 의해 부고환에서 정자를 채취하여 첫 임신에 성공한 이후 많은 발전을 하였고 현재는 폐쇄성 무정자증 환자의 경우 임신에 도달하지 못하는 경우는 없다고 한다 (Silber *et al.*, 1996). 부고환 정자는 일반적 체외수정 방법으로는 수정률과 임신율이 낮다.

이러한 단점은 ICSI를 이용하여 개선되었고 현재는 일반적인 체외수정 방법과 ICSI로 얻어진 배아의 이식, 배아의 동결-융해 후 이식 등의 결과가 차이가 없다. 또한 사정에 의한 정자와 폐쇄성 무정자증 환자에게 외과적 수술로 채취된 정자를 이용하여 ICSI 시술을 한 결과 수정률과 임신율은 양자간에 큰 차이가 없는 것으로 보고되었다 (김정욱 등, 1997; Mohamed A. Aboulghar *et al.*, 1997).

선천성 정관 결손증 (Congenital absence of vas deference: CAVD)이나 수술로 교정이 불가능한 폐쇄성 무정자증과 같이 정자형성이 정상적으로 이루어지면 MESA와 TESE로 정자 채취가 가능하며, 부고환 폐쇄 및 부고환 형성부전 등과 같이 부고환에서 정자 채취가 불가능한 경우는 TESE를 이용하여 정자를 채취하여 ICSI를 하게 된다 (Devroey *et al.*, 1994; Semra Kahraman *et al.*, 1996; William Watkins *et al.*, 1997). TESE는 1993년 Silber *et al.*와 Devroey *et al.* 등에 의해 처음 시술되어 TESE로 명명되었으며, 1994년 Devroey *et al.* 등은 폐쇄성 무정자증 환자에게 처음으로 TESE를 시술한 이후 많은 시술과 진전이 있었으나 TESE는 MESA보다 회수되는 정자의 수가 적고 운동성이 떨어지며, 배양, 동결 등에 단점이 있다고 알려져 왔다. 그러나 시험관 내의 단순배양이나

Vero cells, Epididymal epithelium 등과의 공배양을 통해 운동성을 향상시키는 방법이 보고되어 왔다 (W. Rohini Edirisinghe *et al.*, 1996; 김현규 등 1997; A. Bongso and Trounson, 1996). 특히 Vero cells과의 공배양에 의하면 운동성이 있는 정소정자의 수는 공배양 전과 비교하면 평균 3.3배, 정소정자의 수가 50,000/ml 이하의 미약한 운동성만을 보였던 경우 공배양 후 7.7배나 운동성이 증가하는 것을 증명하였고 이 정자로 ICSI 했던 결과 평균 수정률이 75.0%이었으며 임신율은 61.5%로 보고하였다 (김현규 등 1997). 그러나 본 증례에서는 단지 human FF (Follicular Fluid)를 첨가한 3일 정도의 단순배양으로 정자의 운동성과 생존율을 크게 향상시킬 수 있었고, 비교적 높은 농도의 FF를 첨가시켜 짧은 시간 내에 활동성을 높일 수 있었다.

채취된 정소정자를 채외에서 성숙, 활동성을 증가시킬 때에는 보통 3~4일, 길게는 6일 이상 배양시킨다 (W. Rohini Edirisinghe *et al.*, 1996; V. Cholewczynski *et al.*, 1996). 대개 5일 전후의 배양으로 정자의 활동성은 최고치에 도달하며, 이때 동결을 하는 것이 보편적이다. 1997년 Carol 등에 의하면, 정자를 냉동하기 전 정자의 생존율이 20% 이상이어야만 융해 후의 결과가 좋다 (Carol A Holden *et al.*, 1997)고 보고하였다. 본 증례에서 정자를 동결-융해 직후 생존율이 20% 정도 나왔고 1일간 배양한 후에는 약한 전진성의 운동성을 보이는 정자와 경미한 움직임 보이는 정자가 관찰되었다. 이러한 결과로 운동성이 약한 TESE 정자를 배양액 내에서 운동성을 향상시킨 후 동결하는 방법은 그 동안 단점으로 지적되어온 TESE 정자의 동결보존과 과배란 유도 때마다 시술이 반복되어야 하는 불편을 해결할 수 있었다. 그러나 TESE 정자 운동성의 향상 및 융해 후 TESE 정자의 생존율의 향상 및 운동성의 회복에 많은 연구가 진행되어야겠다.

그 동안 MESA 및 TESE 정자, 동결-융해한 MESA 및 TESE 정자를 이용하여 임신에 성공한 사례가 다수 보고되었으나 아직까지 국내에서는 동결-융해한 정소정자를 이용한 임신의 보고가 없었다. 그러나 본원에서 이를 이용한 임상적 임신에 성공하였고, 사정에 의한 정자와 마찬가지로 정소정자 역시 동결-융해하여 임신을 성공시킬 수 있는 방법이 모색되었기에 본 증례와 함께 보고하는 바이다.

## 결 론

본원 불임센터에서 TESE를 시행하여 얻은 정자를 동결-융해한 후 ICSI 시술로 얻은 수정란의 나팔관 이식 및 배아의 자궁이식에 의해 임신에 성공하였기에 문헌고찰과 함께 보고하는 바이다.

## 인 용 문 헌

- Bongso A, Trounson A: Evaluation of mortality, fertilizing ability and embryonic development of murine epididymal sperm coculture with epididymal epitherium. *Hum Reprod* 1996, 11, 1451-1456.
- Carol A, Giuliana F, Peter J, Alex C, Graeme J, Ron H, Peter D, Robert I: Frozen-thawed epididymal spermatozoa for intracytoplasmic Sperm Injection. *Fertil Steril* 1997, 67, 81-87.
- Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber S, Van Steirteghem AC: Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994, 62, 639-641.
- Devroey P, Silber S, Nagy Z, et al: Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Hum Reprod* 1995, 10, 903-906.
- Liu J, Watts L, Cholewczynski V, Litz J, Logan P, Compton G, et al: The mortality of fresh or frozen-thawed human testicular spermatozoa obtained from patients with obstructive azoospermia can be significantly improved after in-vitro culture. *Hum Reprod* 1996, 11, S23-S24.
- Kim HK, Oum KB, Kim HJ, Ko JJ, Lee SH, Yoon TK, Cha KY: The Effects of Vero Cells Coculturing on the Motility of Human Testicular Spermatozoa in an Intracytoplasmic Sperm Injection Program. *K J Fertil Steril* 1997, 24, 225-231.
- Kim JW, Han MH, Byun HK, Jun JH, Son IP, Koong MK, Paik EC, Kang IS, Lee HJ: Results of Transfer of Cryopreserved Supernumerary Embryos Obtained after Conventional in vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). *K J Fertil Steril* 1997, 24, 111-118.
- Mohamed A, Ahmed K, Ragaa T, Nevine A, Gamal I, Yahia M, Ibrahim F: Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic Sperm Injection using ejaculate semen and surgical retrieved sperm. *Fertil Steril* 1997, 68, 108-117.
- Nagy Z, Liu J, Cecile J, Silber S, Devroey P, Van Steirteghem AC: 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.
- Semra K, Suat O, Cengiz A, Senai A, Murat T, Alp N, Isik T, Basak B, Kutay B, Robert S, Martine N, Pierre V: Fertility with testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod* 1996, 11, 756-760.
- Silber S, Nagy Z, Liu J, Godoy H, Devroey P, Van Steirteghem A: Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *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 testicular biopsy. *Hum Reprod* 1995, 10, 148-152.
- Silber SJ, Van Steirteghem AC, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Devroey P: Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil Steril* 1996, 66, 110-117.
- Moon SY, Lee HS, Kim HS, Ryu BY, Pang MG, Oh SK, Suh CS, Kim SH, Choi YM, Kim JG, Lee JY: A Case of Pregnancy from Cryopreserved Embryos following ICSI with frozen-thawed Epididymal Sperms. *K J Fertil Steril* 1997, 24, 273-276.
- Temple-Smith PD, Southwick GJ, Yates CA, Trounson AO, De Kretser DM: Human pregnancy by in-vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1985, 2, 119-122.

- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, et al.: Clinical results from intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993, 8, 1061-1066.
- W. Rohini Edirisinghe, Stephen M. Junk, Phillip L. Maston and John L. Yovich: Changes in motility patterns during in-vitro culture of fresh and frozen/thawed testicular and epididymal spermatozoa: implications for planning treatment by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996, 11, 2474-2476.
- William W, Boonsaeng W, Felix N, Andrew S, Harold B, Gordon HW: Testicular and epididymal sperm in a microinjection program: method of retrieval and results. *Fertil Steril* 1997, 67, 527-535.
-