

폐쇄성 무정자증 환자의 신선고환조직 정자와 동결고환조직 정자의 운동성이 임신율에 미치는 영향

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실, 비뇨기과¹, 산부인과²
박용석 · 이형승 · 변혜경 · 염혜원 · 송상진 · 임천규 · 이유식¹ · 윤종민¹
서주태¹ · 송지홍² · 강인수² · 궁미경²

Influence on the Pregnancy Rate of Motility of Fresh and Frozen Testicular Spermatozoa in Obstructive Azoospermic Patients

Yong-Seog Park, Hyoung-Song Lee, Hye Kyung Byun, Hye-Won Youm, Sang-Jin Song,
Chun Kyu Lim, You Sik Lee¹, Jong Min Yun¹, Ju Tae Seo¹,
Ji Hong Song², Inn Soo Kang², Mi Kyoung Koong²

Laboratory of Reproductive Biology and Infertility, Department of Urology¹
Department of Obstetrics and Gynecology², Samsung Cheil Hospital & Women's Healthcare
Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Objective: ICSI with testicular sperm could achieve optimal fertilization and pregnancy. This study was performed to observe the influence on fertilization and pregnancy of motility of fresh testicular sperm and sperm extracted from frozen-thawed seminiferous tubules in obstructive azoospermia.

Materials and Methods: We analysed clinical outcome of ICSI using fresh testicular sperm and sperm extracted from thawed seminiferous tubules. The presence of motility were compared to determine the factor for optimal fertilization and pregnancy rates.

Results: In 316 cases of TESE-ICSI in obstructive azoospermia, ICSI with fresh testicular sperm (fresh sperm group) were 163 cases and ICSI with sperm testicular sperm extracted from frozen-thawed seminiferous tubule (thawed sperm group) were 153 cases. The fertilization rates were 71.3% and pregnancy rates were 32.5% in fresh sperm group, in thawed sperm group, 65.1% and 33.3% respectively. The fertilization and pregnancy rates of motile and non-motile testicular sperm were 72.9% and 33.6%, 50.0% and 18.2%, respectively ($p < 0.05$). The fertilization and pregnancy rates of motile and non-motile sperm extracted from the thawed seminiferous tubule were 67.8% and 34.7%, 55.1% and 28.1%, respectively ($p < 0.05$). The comparative of the results of ICSI using motile fresh testicular sperm and motile sperm extracted from thawed seminiferous tubule, fertilization and pregnancy rates were not significantly different (72.9% and 33.6%, 67.8% and 34.7%, respectively).

Conclusion: These results suggest that successful pregnancy in TESE-ICSI treatment is influenced by the motility of fresh testicular sperm and sperm extracted from thawed seminiferous tubule in obstructive azoospermic patients.

Key Words: TESE, ICSI, Testicular sperm, Seminiferous tubule

*교신저자: 박용석, 서울시 중구 목동동 1-23 삼성제일병원 불임연구실, Tel: 02-2000-7592, e-mail: arkangel@samsung.co.kr

남성불임 환자에서 고환조직 정자채취술 (testicular sperm extraction; TESE, 이하 TESE)과 세포질내 정자주입술 (intracytoplasmic sperm injection; ICSI, 이하 ICSI)을 이용하여 임신율을 높이는 결과를 보고한 이래,¹⁻⁶ 반복적인 고환조직의 절개를 피하기 위한 고환정자 동결이나,^{7,8} 세정관을 동결보존하여 임신에 도달하지 못했을 경우 이를 반복 용해하여 사용하는 방법이 보고되었다.^{9,10} 그러나 고환정자와 고환조직 동결-용해 후 회수정자의 경우, 운동성 정자가 없는 경우가 많으므로 이를 이용시 운동성과 임신율의 영향에 대하여는 아직 많은 보고가 알려져 있지 않았다.

이에 본 연구에서는 폐쇄성 무정자증 환자에서 고환조직 정자채취술 (TESE)을 실시하여 신선 고환정자와 고환조직 동결-용해 후 회수된 정자의 운동성을 비교, 관찰하여 수정률과 임신율에 미치는 영향을 조사하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 1998년 1월부터 2000년 12월까지 삼성세일병원 불임클리닉을 내원하여 폐쇄성 무정자증으로 최종진단된 153명의 남성불임 환자를 대상으로 163례에서 TESE-ICSI를 시행하였으며, 이들의 평균 연령은 37.5 ± 5.7 세이고, 배우자의 평균 연령은 34.0 ± 5.5 세였다. 다음 IVF-ET 시술 주기에 고환조직 동결-용해 후 회수된 정자를 이용한 ICSI는 120명의 환자를 대상으로 153례를 시행하였으며, 28명은 진단을 위한 고환생검 (testicular biopsy)을 실시한 후 조직을 동결보존하였다가 IVF-ET 시술시 용해하여 이용하였다.

2. 고환조직 정자채취술 (TESE)

고환조직 정자채취술은 이미 보고된 바와 같다.^{6,13} 방법을 약술하면, 초막 (tunica vaginalis)과 백막 (tunica albuginea)을 절개하여 세정관 (seminiferous tubule)을 추출한 후 0.4% BSA가 첨가된 Ham's F-10 배양액으로 옮겨 해부현미경하에서 조심스럽게 세정관을 미세검자로 짜내어 (squeezing) 추출물을 얻은 후, 현미경하에서 정자의 존재 여부를 확인하였다. 정자가 확인된 경우 다음 주기에 사용하기 위하여 세정관을 몇 부분으로 나누어 동결보존하였다.

3. 세정관의 동결 및 용해

세정관을 0.4% BSA가 첨가된 Ham's F-10 배양액에 넣은 후 0.4% BSA가 첨가된 human semen preservation medium (HSPM)과 1:1로 섞어 2 ml 동결용 ampule에 넣었다. Ampule은 자동동결기 (Kryo-10, Planar Biomed, UK)에 옮긴 후 $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 4°C 까지 하강시키고 4°C 에서 -90°C 까지 $-10^\circ\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 하강시킨 후 -196°C 액체질소에 보관하였다. 용해는 다음 IVF 주기의 남자 채취 당일 ampule을 액체질소에서 꺼내어 실온에서 10분간 정치시킨 후 37°C 항온수조에서 10분간 정치시켜 실시하였다. 용해가 끝난 후 배양액으로 몇 차례 세척하여 동해방지제를 제거하고 세정관은 전술한 바와 같은 방법으로 정자 추출과정을 시행하고, 용해 후 회수된 정자는 ICSI를 위해 처리를 하였다.

4. 과배란 유도 및 난자 준비

난자 채취를 위한 과배란 유도는 FSH/hMG와 GnRH agonist를 병용하였으며, hCG 주사 후 34시간에 질식 초음파를 이용하여 난자를 채취하였다. 채취한 난자-난구 복합체는 성숙도를 판정하고, 3~5시간 동안 배양한 후에 0.1% hyaluronidase를 처리하여 난구세포를 제거하였다. ICSI를 시행하기 직전에 난자의 성숙 정도를 현미경하에서 판정하여 제1 극체가 방출된 제2 감수분열 중기의 난자만을 ICSI에 사용하였다.

5. 세포질내 정자주입술 (ICSI)

세포질내 정자주입술을 위해 회수된 정자는 1500 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet에 0.3~0.5 ml의 배양액을 첨가, 섞은 후 배양기에서 3~5시간 동안 배양한 후 미약한 꼬리의 움직임이나 운동성을 나타내는 정자를 활력정자로 판정하여 미세조작기를 이용하여 ICSI에 사용하였으며, holding pipette과 injection pipette은 내경이 각각 $15\text{--}20\ \mu\text{m}$ 와 $4\text{--}5\ \mu\text{m}$ 인 것을 사용하였다. 정자는 일차적으로 배양액 drop에서 운동성 정자를 회수하고, 이들을 10% polyvinyl-pyrrolidone (PVP) drop으로 옮겨 운동성을 감소시키고, injection pipette으로 운동성 정자에 물리적 힘을 가하여 비운동화시킨 후 난자에 주입하였다. 준비된 난자는 제1 극체가 12시 또는 6시 방향에 위

Table 1. Outcome of ICSI with fresh testicular spermatozoa and spermatozoa extracted from frozen-thawed seminiferous tubule

	Total	fresh [†]	frozen-thawed [‡]
No. of patients	212	153	120
No. of cycles	316	163	153
No. of retrieved oocytes	4147	2137	2010
No. of injected oocytes	3393 (81.8)	1758 (82.3)	1635 (81.3)
No. of fertilized oocytes	2318 (68.3)	1254 (71.3)*	1064 (65.1)*
No. of transferred embryos	1150 (49.6)	596 (47.5)	554 (60.4)
No. of transferred cycles	300 (94.9)	155 (95.1)	142 (92.8)
No. of pregnancies	99 (31.3)	53 (32.5)	51 (33.3)
No. of ongoing pregnancies	90 (28.5)	49 (30.1)	46 (30.1)

Values in parentheses are percentage.

*p<0.05, [†]fresh; fresh testicular spermatozoa

[‡]frozen-thawed; spermatozoa extracted from frozen-thawed seminiferous tubule

치하도록 holding pipette으로 고정된 후 injection pipette을 사용하여 정자를 3시 방향에서 9시 방향으로 주입하였다. 정자주입시 난자의 세포질을 injection pipette으로 적당량 흡입하여 난자의 세포질내에 정자가 주입된 것을 확인하였다. 수정 여부는 ICSI 시행 후 16~20시간에 전핵 형성 여부로 확인하였다.

6. 배아 이식 및 임신 확인

난자 채취 후 72시간 동안 배양하여 정상적으로 발생된 4-8 세포기 배아를 자궁내에 이식하였으며, 임신여부는 배아 이식 13일 후에 혈청내 β -hCG 양으로 판정하였고, 임신낭 (gestational sac)이 확인된 경우를 임상적 임신 (clinical pregnancy)으로 정의하였으며, 현재까지 임신이 유지된 경우를 ongoing pregnancy로 정의하였다.

7. 분석 및 통계 방법

결과에 대한 통계적 분석은 χ^2 -test를 이용하였고, p 값이 0.05 이하인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

총 212명의 폐쇄성 무정자증 환자에서 316례의 TESE-ICSI 혹은 고환조직 동결-융해 후 ICSI를 시행

하였다. 총 4147개의 회수된 난자 중, 3393개에 ICSI를 시행하여 68.3% (2318/3393)의 수정률을 얻었으며, 주기당 평균 3.8 ± 1.7 개 (mean \pm SD)의 수정란을 300례에서 이식하여 99례 (31.3%)와 90례 (28.5%)의 임신 및 임상적 임신율을 보였다. 이를 신선한 고환조직 정자군 (이하 신선정자군)과 동결-융해 후 회수된 고환조직 정자군 (이하 융해정자군)으로 나누어 정자의 운동성과 임신율과의 관계를 비교하였다 (Table 1).

신선정자군은 TESE 기술을 받은 153명의 환자에서 163례 시행하여 2137개의 난자를 회수하였으며, 그 중 1758개의 난자에 ICSI를 시행하였다. 수정률은 71.3% (1254/1758)였으며 평균 3.8 ± 1.2 개 (mean \pm SD)의 수정란을 155주기에 이식하여 53례 (32.5%)와 49례 (30.1%)의 임신 및 임상적 임신율을 보였다. 이들 중 임신에 실패하였거나 재임신을 원할 경우, 총 120명의 환자에서 동결보존된 고환조직을 융해하여 153례의 IVF 기술을 시행하였다 (융해정자군). 2010개의 난자를 회수하여, 1635개의 난자에 동결된 고환조직을 융해 후 회수된 정자를 이용하여 ICSI를 시행하였다. 수정률은 65.1% (1064/1635)였으며 평균 3.8 ± 2.0 개 (mean \pm SD)의 수정란을 142주기에 이식하여 51례 (33.3%)와 46례 (30.1%)의 임신 및 임상적 임신율을 보였다. 신선정자군과 융해정자군간의 수정률은 각각 71.3%와 65.1%로 두 군간에 유의한 차이가 있으나 (p<0.05), 임신율은 유의차가 없었다.

Table 2. Outcome of ICSI with fresh motile or non-motile testicular spermatozoa

	Total	Motility (+) [†]	Motility (-) [‡]
No. of cycles	163	152	11
No. of retrieved oocytes	2137	1966	171
No. of injected oocytes	1758 (82.3)	1638 (83.3)	120 (70.2)
No. of fertilized oocytes	1254 (71.3)	1194 (72.9)*	60 (50.0)*
No. of transferred embryos	596 (47.5)	558 (46.7)	38 (63.3)
No. of transferred cycles	155 (95.1)	146 (96.1)	9 (81.8)
No. of pregnancies	53 (32.5)	51 (33.6)*	2 (18.2)*
No. of ongoing pregnancies	49 (30.1)	48 (31.6)*	1 (9.1)*

Values in parentheses are percentage.

* $p < 0.05$, [†]Motility (+) = ICSI using motile spermatozoa, [‡]Motility (-) = ICSI using non-motile spermatozoa

Table 3. Outcome of ICSI with motile or non-motile spermatozoa extracted from frozen-thawed seminiferous tubule

	Total	Motility (+) [†]	Motility (-) [‡]
No. of cycles	153	121	32
No. of retrieved oocytes	2010	1560	450
No. of injected oocytes	1635 (81.3)	1281 (82.1)	354 (78.7)
No. of fertilized oocytes	1064 (65.1)	869 (67.8)*	195 (55.1)*
No. of transferred embryos	554 (60.4)	445 (51.2)	109 (55.9)
No. of transferred cycles	142 (92.8)	115 (95.0)	27 (24.8)
No. of pregnancies	51 (33.3)	42 (34.7)*	9 (28.1)*
No. of ongoing pregnancies	46 (30.1)	37 (30.6)*	9 (28.1)*

Values in parentheses are percentage.

* $p < 0.05$, [†]Motility (+) = ICSI using motile spermatozoa, [‡]Motility (-) = ICSI using non-motile spermatozoa

신선정자군의 활력정자와 비활력정자를 이용하여 ICSI 후 결과를 비교하였다 (Table 2). 총 163례 중 152례에서 활력정자를 주입하여 72.9% (1194/1638)의 수정률을 나타냈으며, 11례에서 비활력정자를 주입하여 50% (60/120)의 수정률을 나타내 두 군간에 유의한 차가 관찰되었다 ($p < 0.05$). 임신율과 임상적 임신율은 활력정자군에서 각각 51례 (33.6%)와 48례 (31.6%)를 나타냈으며, 비활력 정자군에서는 각각 2례 (18.2%)와 1례 (9.1%)를 나타내 임신율도 두 군간에 유의한 차가 관찰되었다 ($p < 0.05$).

융해정자군의 활력정자와 비활력정자를 이용하여 ICSI 후 결과를 비교하였다 (Table 3). 총 153례 중 121례에서 활력정자를 주입하여 67.8% (869/1281)의

수정률을 나타냈으며, 12례에서 비활력정자를 주입하여 55.1% (195/354)의 수정률을 나타내 두 군간에 유의한 차가 관찰되었다 ($p < 0.05$). 임신율과 임상적 임신율은 활력정자군에서 각각 42례 (34.7%)와 37례 (30.6%)를 나타냈으며, 비활력정자군에서는 각각 9례 (28.1%)를 나타내 임신율에서도 유의한 차가 관찰되었다 ($p < 0.05$).

신선정자군과 융해정자군에서 회수된 활력정자의 ICSI 후 결과를 비교하였다 (Table 4). 신선정자군과 융해정자군의 수정률은 각각 72.9%와 67.8%를 나타내 신선정자군의 수정률이 높은 것으로 관찰되었으나, 임신율과 임상적 임신율은 신선정자군에서 각각 33.3%와 31.6%, 융해정자군에서 34.7%와 30.6%를 나타내

Table 4. Comparative result of fresh motile testicular spermatozoa and motile spermatozoa extracted from frozen-thawed seminiferous tubule

	fresh [†]	frozen-thawed [‡]
No. of cycles	152	121
No. of retrieved oocytes	1966	1560
No. of injected oocytes	1638 (83.3)	1281 (82.1)
No. of fertilized oocytes	1194 (72.9)	869 (67.8)
No. of transferred embryos	558 (46.7)	445 (51.2)
No. of transferred cycles	146 (96.1)	115 (95.0)
No. of pregnancies	51 (33.6)	42 (34.7)
No. of ongoing pregnancies	48 (31.6)	37 (30.6)

Values in parentheses are percentage.

*p>0.05, [†]fresh; fresh testicular spermatozoa

[‡]frozen-thawed; spermatozoa extracted from frozen-thawed seminiferous tubule

임신율에서는 두 군간에 통계적으로 유의한 차는 관찰되지 않았다.

고 찰

고환조직 정자채취술과 세포질내 정자주입술 (TESE-ICSI)이 무정자증으로 인한 남성불임 환자의 문제를 극복할 수 있는 유용한 방법으로 많은 연구자들에 의해 보고된 이래,¹⁻⁶ 고환조직 상태가 양호할 경우 세정관을 동결하는 고환조직 동결-융해 방법은 다음 IVF 주기에 다시 TESE를 시행하지 않고 융해하여 이용할 수 있는 효율적인 방법이다. Perraguin-Jayot 등¹¹은 고환정자를 동결하는 것보다 고환조직을 동결-융해한 후 정자를 회수한 결과 정자의 생존율과 운동성이 높다고 보고하였으며, Gianaroli 등¹²은 동결된 고환조직에서 정자를 회수하여 수정률, 배발생율과 임신율을 각각 64%, 84% 그리고 33%로 보고하였다. 본 연구에서 폐쇄성 무정자증 환자의 고환정자와 고환조직을 동결-융해한 후의 정자를 회수하여 비교한 결과, 수정률은 각각 71.3%와 65.1%를 나타내었고, 임상적 임신율은 각각 30.1%를 나타내 (Table 1), 수정률은 다소 높은 반면, 임신율은 차이가 없는 것으로 관찰되었다. 저자들의 이전 보고^{13,14}에서 동결-융해 직후 정자의 움직임이 관찰되지 않았으나, 3-5시간 체외 배양 후 미약한 꼬리의 움직임이나 운동성을 나타내는 정자가 확인되어 일정 시간동안 체외 배양을 함으로써 정자

의 운동성이 증가함을 알 수 있었다. 동결-융해 후 정자 상태에 영향을 미치는 요인으로 신선정자의 수와 운동성, 동해방지제의 종류, 동결 및 융해 방법 그리고 회석 및 세척과정 등이 보고되었으며,¹⁵ 동결-융해 후 움직임이 관찰되지 않을 경우 정상 형태의 성숙정자, 난자의 성숙도 등을 판정하는 것이 적절한 수정과 임신에 필수적인 조건이라 하겠다. 본 연구에서 ICSI를 시행할 때 움직임이 좋은 정자도 다수 관찰되었으나, 고환정자의 특성상 움직임이 없는 경우가 많으며, 특히 동결 고환정자의 경우 움직임이 없는 경우가 대부분이므로, 꼬리의 미약한 움직임도 수정 가능한 정자로 판단하여 활력정자에 포함하여 난자내 주입하였다. 고환정자를 이용한 수정율과 임신율은 신선정자군과 융해정자군 모두 활력정자를 주입하였을 경우가 비활력정자를 주입하였을 경우보다 유의하게 높은 것으로 판명되었으며 (p<0.05), 신선정자군과 융해정자군간의 활력정자를 주입하였을 경우 수정률은 신선정자군이 다소 높은 것으로 나타났으나, 통계적으로 유의한 차는 관찰되지 않았으며 임신율도 차이가 없었다.

이와 같은 결과로 폐쇄성 무정자증 적응증에서는 활력정자를 난자내 주입하였을 경우, 수정률과 임신율에서 차이가 없으므로 활력정자의 존재가 적절한 수정과 임신에 필수적이라 생각되며, 고환정자를 단기간 체외 배양시 운동성을 증가시킬 수 있는 효과적인 방법과 고환조직 동결-융해 후 생존 효율을 높일 수

있는 다양한 방법의 개발이 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal-Bertin G, Casseye M. Successful fertilization by testicular spermatozoa in an in vitro fertilization programme. *Hum Reprod* 1993; 8: 1339-40.
2. Devroey P, Liu J, Nagy A, Tournaye H, Silber SJ, Van Steirteghem AC. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994; 62: 639-41.
3. Craft I, Tsirigotis M. Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1995; 10: 1623-7.
4. Nagy Z, Liu J. Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoon gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995; 63: 808-15.
5. Silber SJ, Van Steirteghem AC, 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: 148-52.
6. 박용석, 전진현, 변혜경, 김종현, 서주태, 이유식 등. 고환조직 정자채취술과 세포질내 정자 주입술을 이용한 고환조직 정자의 수정률과 임신율. *대한불임학회잡지* 1997; 24: 101-9.
7. Gil-Salom M, Romero J, Minguez Y, Rubio C, De los Santos MJ, Remohi J, et al. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1996; 11: 1309-13.
8. Romero J, Remohi J, Minguez Y, Rubio C, Pellier A, Gil-Salom M. Fertilization after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Fertil Steril* 1996; 65: 877-9.
9. Allan JA, Cotman AS. A new method for freezing testicular biopsy sperm: three pregnancies with sperm extracted from cryopreserved sections of seminiferous tubule. *Fertil Steril* 1997; 68: 741-4.
10. Oates RD, Mulhall J, Burgess C, Cunningham D, Carson R. Fertilization and pregnancy using intentionally cryopreserved testicular tissue as the sperm source for intracytoplasmic sperm injection in 10 men with nonobstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997; 12: 734-9.
11. Perraguin-Jayot S, Audebert A, Emperaire JC, Parneix I. Ongoing pregnancies after intracytoplasmic injection using cryopreserved testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1997; 12: 2706-9.
12. Gianaroli L, Magli MC, Selman HA, Colpi G, Belgrano E, Trombetta C, et al. Diagnostic testicular biopsy and cryopreservation of testicular tissue as an alternative to repeated surgical openings in the treatment of azoospermic men. *Hum Reprod* 1999; 14: 1034-8.
13. 박용석, 전진현, 이호준, 강인수, 김종현, 이유식 등. 동결-융해 후 회수된 고환정자와 세정관내 정자의 수정 능력과 효율성에 관한 연구. *대한불임학회잡지* 1998; 25: 171-7.
14. 박용석, 이형송, 송상진, 김정욱, 강인수, 서주태. 고환조직 동결-융해 후 회수된 고환정자에 대한 Hypo-osmotic swelling (HOS) test의 효과. *대한불임학회잡지* 2000; 27: 267-73.
15. Fischer R, Baukloh V, Naether OGJ, Schulze W, Salzbrunn A, Benson DM. Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of spermatozoa extracted from frozen-thawed testicular biopsy. *Hum Reprod* 1996; 11: 2197-9.