

# 신선 고환조직 정자와 냉동보존-용해 고환조직 정자를 이용한 남자세포질내 정자주입술 결과의 비교 연구

연세대학교 의과대학 산부인과학교실<sup>1</sup>, 서울대학교 의과대학 산부인과학교실<sup>2</sup>,  
서울대학교 의학연구원 인구의학연구소<sup>3</sup>, 서울대학교 의과대학 비뇨기과학교실<sup>4</sup>

최영식<sup>1</sup> · 최영민<sup>2,3\*</sup> · 김수웅<sup>4</sup> · 백재승<sup>4</sup> · 지병철<sup>2</sup> · 구승엽<sup>2,3</sup> · 서창석<sup>2,3</sup>  
김석현<sup>2,3</sup> · 김정구<sup>2,3</sup> · 문신용<sup>2,3</sup>

## Comparison of ICSI Outcomes between Fresh and Cryopreserved-Thawed Testicular Spermatozoa

Young Sik Choi<sup>1</sup>, Young Min Choi<sup>2,3\*</sup>, Soo Woong Kim<sup>4</sup>, Jae-Seung Paick<sup>4</sup>, Byung Chul Jee<sup>2</sup>,  
Seung-Yup Ku<sup>2,3</sup>, Chang Suk Suh<sup>2,3</sup>, Seok Hyun Kim<sup>2,3</sup>, Jung Gu Kim<sup>2,3</sup>, Shin Yong Moon<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University College of Medicine,

<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine,

<sup>3</sup>Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center,

<sup>4</sup>Department of Urology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

**Objective:** To compare the outcomes of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with fresh and cryopreserved-thawed testicular spermatozoa in patients with azoospermia.

**Methods:** One hundred and nine cycles (66 couples) where ICSI was planned with fresh or cryopreserved-thawed testicular spermatozoa were included in this study; Ninety two cycles (61 couples) with fresh testicular spermatozoa (fresh group) and seventeen cycles (13 couples) with cryopreserved-thawed testicular spermatozoa (cryopreserved-thawed group). We compared ICSI outcomes such as fertilization rate, implantation rate, pregnancy rate and miscarriage rate, which were statistically analyzed using Mann-Whitney U test or Fisher's exact test, where appropriate.

**Results:** In 9 out of the 92 cycles where ICSI was planned with fresh testicular spermatozoa, testicular spermatozoa could not be retrieved. Fertilization rate tended to be higher in the fresh group than in the cryopreserved-thawed group ( $58.0 \pm 27.8\%$  vs.  $45.9 \pm 25.0\%$ ,  $p=0.076$ ). The number of high quality embryos was significantly higher in the fresh group ( $0.9 \pm 1.2$  vs.  $0.2 \pm 0.5$ ,  $p=0.002$ ). However, there were no significant differences in clinical pregnancy rate, implantation rate and miscarriage rate between the two groups.

**Conclusion:** The results of this study suggest that although the use of cryopreserved-thawed testicular sperm for ICSI in patients with azoospermia may reduce fertilization capacity and embryo quality, it may not affect pregnancy rate, implantation rate and miscarriage rate. If testicular sperm can be obtained before ICSI procedure, the use of cryopreserved-thawed testicular sperm may also avoid unnecessary controlled ovarian hyperstimulation and cancellation of oocyte retrieval when spermatozoa cannot be retrieved as well as damage on testicular function by repeated TESE. [Korean. J. Reprod. Med. 2008; 35(2): 131-141.]

**Key Words:** Azoospermia, Testicular sperm retrieval, Cryopreservation, Intracytoplasmic sperm injection

주관책임자: 최영민, 우) 110-744 서울특별시 종로구 연건동 28, 서울대학교 의과대학 산부인과학교실

Tel: (02) 2072-2385, Fax: (02) 762-3599, e-mail: ymchoi@snu.ac.kr

\*본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (01-PJ10-PG6-01GN13-0002).

\*\*This study was supported by a grant of the Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (01-PJ10-PG6-01GN13-0002).

1992년 Palermo 등이 남성인자 불임부부에서 난자세포질내 정자주입술 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)을 이용한 성공적인 임신을 보고한 이후로<sup>1</sup> ICSI 기술은 중증의 남성인자 불임부부의 치료에 널리 사용되고 있다. 무정자증은 전체 남성의 1%, 불임남성의 약 10~15%를 차지하며<sup>2,3</sup> 고환에서 정상적인 정자의 생성에도 불구하고 정액 배출로의 협착 등으로 발생하는 폐쇄성 무정자증 (obstructive azoospermia)과 정자 생성의 이상으로 발생하는 비폐쇄성 무정자증 (nonobstructive azoospermia)으로 구분할 수 있고, 전체 무정자증 남성불임 환자 중 폐쇄성 무정자증은 85%, 비폐쇄성 무정자증은 15% 정도로 보고되고 있다.<sup>4</sup>

Schoysman 등이 고환정자추출술 (testicular sperm extraction, TESE)을 이용한 성공적인 임신을 보고한 이후로<sup>5</sup> 고환정자추출술에 따른 ICSI 기술은 폐쇄성 무정자증 환자뿐만 아니라 비폐쇄성 무정자증 환자에서도 효과적인 치료 방법으로 사용되고 있다. 폐쇄성 무정자증 환자의 대부분은 고환정자추출술을 통하여 성공적으로 정자를 채취할 수 있다고 알려져 있으나 비폐쇄성 무정자증 환자에서는 고환정자추출술의 성공률이 더 낮은 것으로 알려져 있으며 보고자에 따라 30~90%로 다양하게 보고되고 있다.<sup>6-11</sup> 고환정자추출술이 계획된 불임부부에서는 여성배우자의 과배란유도 (controlled ovarian hyperstimulation, COH)가 동시에 시행되므로 고환정자추출술이 실패하는 경우 결국 여성배우자에서 불필요한 과배란유도를 시행하게 되는 결과를 초래하며 이는 불임부부에 있어서 심리적, 재정적 문제를 일으킬 수 있다. 따라서, 무정자증 환자에서 채취된 고환정자의 냉동보존은 고환정자의 채취 실패에 따른 주기 취소의 가능성을 감소시켜 불필요한 여성배우자의 과배란유도를 줄일 수 있다. 또한, 반복적인 고환정자추출술은 고환조직의 소실로 인한 고환기능의 상실을 초래할 수 있으며 채취된 고환정자를 최대한 냉동보존하는 것은 고환기능의 소실을 예방하는데 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

그러나, 신선 고환정자 (fresh testicular spermatozoa)와 냉동보존-융해 고환정자 (cryopreserved-thawed testicular spermatozoa)를 사용한 ICSI 기술의 결과를 비교한 이전의 연구들은 다양한 결과를 보고하고 있다. 대부분의 연구들은 신선 고환정자와 냉동보존-융해 고환정자를 사용한 ICSI 기술 주기에서 임신율의 차이가 없다고 보고하고 있으나 수정률이나 배아의 질, 착상률 측면에서는 상반된 보고들이 있다. 수정률은 많은 연구들에서 차이가 없거나<sup>6,12-18</sup> 신선 고환조직을 사용한 군에서 수정률이 더 높았다고 보고하고 있으나<sup>19-22</sup> 일부 연구는 냉동보존-융해 고환조직을 사용한 군에서 오히려 수정률이 더 높았다는 보고도 있다.<sup>23</sup> 신선 고환정자 및 냉동보존-융해정자를 이용한 ICSI 기술 후 배아의 질도 유의한 차이가 없었다는 보고들이 많았으나<sup>12,18,19,22,24</sup> Aoki 등은 ICSI 기술시 냉동보존-동결 고환정자를 사용한 경우에 비하여 신선 고환정자를 사용한 경우 배아의 질이 유의하게 좋다고 보고하였다.<sup>23</sup> 착상률도 대부분의 연구들에서 양 군에서 유의한 차이를 보이지 않았으나 Wu 등은 신선 고환정자를 사용한 ICSI 기술 주기에서 유의하게 착상률이 높다고 보고하였다.<sup>18</sup> 국내 보고로는 김 등이 신선 고환정자와 냉동보존-융해 고환정자를 사용한 ICSI 기술의 결과를 비교한 연구에서 수정률, 임신율, 유산율에서 유의한 차이를 보이지 않았다고 보고한 바 있고<sup>24</sup> 김 등도 유사한 결과를 보고한 바 있다.<sup>25</sup>

따라서 저자 등은 무정자증 환자에서 고환정자추출술 후 신선 고환정자와 냉동보존-융해 고환정자를 사용한 ICSI 기술의 결과를 비교 분석하고자 하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

1997년 1월부터 2006년 8월까지 무정자증으로 진단되어 서울대학교병원 불임클리닉에서 66명의 불임부부에서 시행된 고환정자추출술 및 ICSI 기술

109주기를 대상으로 본 연구를 시행하였다. ICSI 기술을 위하여 사용하기로 계획된 정자가 신선 고환정자인지 냉동보존-용해 고환정자인지에 따라 신선 고환정자군 (fresh testicular spermatozoa group) 과 냉동보존-용해 고환정자군 (cryopreserved-thawed testicular spermatozoa group)의 양 군으로 구분하였다. 총 109주기 중 신선 고환정자군은 92주기 (61 couples)이었고 냉동보존-용해 고환정자군은 17주기 (13 couples)이었다.

## 2. 연구방법

### 1) 과배란유도 (controlled ovarian hyperstimulation, COH)

과배란유도를 포함한 체외수정기술의 제반과정은 이미 본 교실에서 발표한 바와 같은 방법으로 시행되었다.<sup>26</sup> 과배란유도 방법으로 성선자극호르몬 분비호르몬 (gonadotropin releasing hormone, GnRH) 작용제 (agonist) 장기투여법 또는 성선자극호르몬 분비호르몬 길항제 (antagonist) 다회투여법 등이 사용되었고, 성선자극호르몬으로는 follicle-stimulating hormone (FSH), human menopausal gonadotropin (hMG) 등이 사용되었다. 과배란유도시 질식 초음파검사로 난포의 성장을 관찰하면서 필요한 경우 혈중 estradiol (E<sub>2</sub>) 농도의 측정을 통하여 성선자극호르몬의 용량을 조절하였으며, 우성 난포의 크기가 18~19 mm 이상이 되면 human chorionic gonadotropin (hCG) 5,000~10,000 IU를 투여하여 난자의 최종성숙 및 배란을 유도하였고 난자채취는 hCG 투여 34~36시간 후에 질식 초음파 유도 하에 시행되었다.

### 2) ICSI 기술을 위한 난자의 준비

채취된 난자를 2 mL의 수정배양액이 들어있는 배양접시에 옮긴 후 1~2시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기내에서 배양하였다. 이후 난구세포를 제거하기 위하여 배양된 난자-난구세포복합체를 0.1% hyaluronidase가 첨가된 D-PBS 용액에 옮겨서 30초간 Pasteur pipette를 이용하여 흡인과 방출을 반복한 후 수정배양액으로 옮겨 다시 Pasteur pipette의

직경을 달리하여 단계적으로 난구세포를 깨끗이 제거하고 3회 세척하였다. 난자는 도립현미경 하에서 성숙도를 판정하며 제 1극체 (first polar body)가 난자로부터 방출된 제 2감수분열 중기 (Metaphase II, MII) 난자만을 선택하여 2 mL의 수정배양액이 들어있는 배양접시에 넣어 ICSI 기술 전까지 총 3~5시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기내에서 배양하도록 하였다. ICSI 기술을 시행하기 직전에 난자의 성숙도를 재판정하여 제 1감수분열 중기 (Metaphase I) 난자가 제 1극체가 방출된 제 2감수분열 중기로 진행하였으면 ICSI 기술의 대상 난자로 사용하였다.

### 3) 고환정자추출술 (testicular sperm extraction, TESE) 및 정자처리

고환정자추출술은 간단한 정맥마취 하에 고환을 약 1 cm 정도 절개한 후 고환 백막 (tunica albuginea) 을 찾아 약간만 절개함으로써 고환 실질 조직인 정세관 (seminiferous tubule) 조직을 얻었다. 만일 정자가 발견되지 않을 경우에는 같은 부위에서 조직을 다시 한 번 얻고, 그래도 없을 경우에는 다른 부위의 고환 백막을 절개하거나, 다른 쪽 고환에서 동일한 방법으로 실시하였다.

채취된 고환조직을 직경이 60 mm인 배양접시에 담긴 IVF 배양액에 넣고 멸균된 slide glass, 혹은 25G 주사침이 부착된 1 ml 주사기를 이용하여 잘게 절단하였다. 조직으로부터 분리된 정자가 확인되면 절단된 조직과 정자 부유액을 conical tube에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기내에서 1시간 배양하였다. 배양 후 조직을 제외한 정자 부유액을 회수하여 2 mL IVF 배양액으로 희석하고 1,800G로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 정자피를 0.2~0.3 mL IVF 배양액으로 희석하여 사용시까지 배양기내에서 배양하였다. 만일 모든 처리 후 조직으로부터 분리된 정자가 확인되지 않을 경우에는 미세조작기를 이용하여 고환조직으로부터 직접 정자를 분리하였다.

### 4) 고환정자 및 정세관의 동결 및 용해

동결 보존시에는 원심분리하여 얻은 정자피와

Sperm Freezing Medium (MediCult, Denmark)를 1:1로 1방울씩 조심스럽게 섞어 상온에서 약 10분간 둔 후 0.5 mL straw에 배양액-공기-정자괴-공기-배양액 순으로 넣고 sealing power를 이용하여 straw 끝을 막았다. 이후 Straw를 4°C에서 5분, -20°C에서 1시간 후 -196°C의 액체질소 표면으로부터 2 cm 지점에서 5분, 0.5 cm 지점에서 3분간 처리한 후 액체질소에 침지하였다. 해동시에는 질소 탱크에서 꺼낸 straw를 공기중에 두어 상온에서 녹인 후 straw의 공기층을 잘라내어 해동된 정자괴를 미리 배양된 2 ml universal IVF 배양액 (MediCult)에 넣고 1500 rpm에서 10분, 다시 1000 rpm에서 10분간 2번 원심분리하여 세척과정을 거친 후 정자괴의 1~1.5 배의 universal IVF 배양액을 넣어 1~2시간 정도 배양 후 swim-up된 정자를 수정에 사용하였다.

#### 5) 난자세포질내 정자주입술 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)

ICSI 기술은 도립현미경에 1쌍의 미세조작기를 장착하여 사용하였으며, 집게 (holding pipettes) 및 주입피펫 (injection pipettes)을 3차원 수압식 기구버팀목 (tool holder)에 고정하고, 미세주입기 (microinjector)에 연결하였다. 주입피펫은 ICSI 미세피펫을 사용하였고, 집게피펫은 유리모세관 (glass capillary tube)을 사용하여 만들었다. 유리모세관을 피펫 puller를 이용하여 피펫을 가늘고 길게 뽑은 후 단면을 고르게 자르고 microforge에서 달구어 내경이 15~20  $\mu\text{m}$ , 외경이 100~120  $\mu\text{m}$  정도 되게 한 후 30~40° 정도의 각도를 갖도록 구부러 사용하였다. Oil이 덮여 있는 배양접시내의 IVF medium 소적에 준비된 운동성 정자를 떨구어 주입피펫을 이용하여 운동성 있는 정자만을 골라 10% polyvinylpyrrolidone (PVP) 용액 소적에 넣어 정자의 운동성을 감소시키고, 주입피펫을 이용하여 정자의 중편부 (midpiece)에 물리적인 힘을 가하여 비활동화 (immobilization) 시켰다. 비활동화된 정자를 꼬리부위부터 주입피펫내로 흡입하고 집게피펫으로 준비된 MII 난자의 방출된 제 1 극체가 12시 방향이 되도록 난자를 고정한 후 주입피펫을 난자의 3시

에서 9시 방향으로 찌르고 난자의 세포질내로 정자를 주입하였다. 정자주입시 주입피펫으로 난자의 세포질을 흡입하여 난막 (oolemma)이 정확히 관통되었음을 확인한 후 조심스럽게 정자와 흡입된 난자의 세포질을 다시 주입하여 PVP 용액이 난자세포질내로 들어가지 않도록 하였다. 정자주입이 완료된 후 oil이 피복된 G1.2 배양액 20  $\mu\text{L}$  소적마다 1개씩 난자를 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 난자의 수정을 확인할 때까지 배양하였다.

#### 6) 배아이식 및 임신의 확인

정상적으로 수정된 배아에서 8-세포기까지 배아의 난할을 관찰하고, 할구의 균등성, 할구 파편의 포함 정도 등에 따라 배아의 질적 등급 (embryo grading)을 평가하였다. 이후 상실배 단계를 거쳐 포배기 단계에 이른 배아를 관찰하여 포배강의 형성 여부, 배아의 확장 여부 등을 기술하였다. 발달이 충분히 진행된 배아는 등급이 좋은 배아를 최고 6개까지 환자의 자궁강내로 이식하였다. 난자 채취 당일부턴 임신이 확인될 때까지 매일 progesterone 50 mg을 근육주사하거나 8% progesterone gel 90 mg을 질내 투여하여 황체기 보강을 실시하였고 임신이 확인된 경우 임신 10~12주까지 지속하였다.

임신의 확인은 배아이식 11일 후 혈중  $\beta\text{-hCG}$  농도를 측정하였고 임신 5~6주경에 실시한 질식 초음파검사서 자궁강내에 태낭 및 태아의 심장 박동이 관찰되는 경우를 임상적 임신으로 판정하였다. 초음파검사서 태낭이 관찰되지 않으면서 혈중  $\beta\text{-hCG}$  농도가 상승하였다가 감소한 경우는 임상적 임신의 범주에서 제외하였다.

#### 7) 통계분석

연구 결과에 대한 통계학적 분석은 SPSS 12.0 for Windows 프로그램을 사용하여 실시하였다. Fisher's exact test, Mann-Whitney U-test 등을 이용하였으며,  $p < 0.05$ 인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

난자세포질내 정자주입술을 위하여 신선 고환정자를 사용하기로 계획된 군 (n=92)과 냉동보존-용해 고환정자를 사용하기로 계획된 군 (n=17)에 포함된 환자들의 임상적 특성은 Table 1과 같다. 남성 배우자 및 여성배우자의 평균 연령은 신선 고환정자군에서 35.4±4.5세, 32.1±4.5세, 냉동보존-용해 고환정자군에서 35.2±4.0세, 32.1±5.4세이었고 통계

적으로 유의한 차이가 없었다. 무정자증의 원인별로 분석하였을 때 비폐쇄성 무정자증 환자는 신선 고환정자군에서 53.3% (49/92), 냉동보존-용해 고환정자군에서 41.2% (7/17)로 양 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 불임기간도 신선 고환정자군에서 4.9±3.9년, 냉동보존-용해 고환정자군에서 5.6±5.7년으로 유의한 차이가 없었다. 여성배우자의 기저 혈중 난포자극호르몬 (8.8±5.5 vs. 8.6±5.2 mIU/mL), 황체화 호르몬 (6.0±3.5 vs. 6.3±5.8 mIU/mL), 에스트라디올 농도 (27.5±15.5 vs. 34.1±20.2

**Table 1.** Clinical characteristics

	Fresh (n=92)	Cryopreserved-thawed (n=17)	P-value
Male			
Age (years)	35.4±4.5	35.2±4.0	0.905
Type of azoospermia			
Obstructive	43 (46.7%)	10 (58.8%)	0.433
Non-obstructive	49 (53.3%)	7 (41.2%)	
Female			
Age (years)	32.1±4.5	32.1±5.4	0.972
No. of previous attempts	1.1±1.2	1.9±1.3	0.005
Basal serum FSH level (mIU/mL)	8.8±5.5	8.6±5.2	0.920
Basal serum LH level (mIU/mL)	6.0±3.5	6.3±5.8	0.464
Basal serum E <sub>2</sub> level (pg/mL)	27.5±15.5	34.1±20.2	0.390
Infertility duration (years)	4.9±3.9	5.6±5.7	0.535

Mean ± S.D.

**Table 2.** Results of controlled ovarian hyperstimulation (COH)

	Fresh (n=92)	Cryopreserved-thawed (n=17)	P-value
Duration of COH (days)	10.2±2.4	9.7±1.9	0.395
Total dose of gonadotropin used (amp.)	30.1±12.4	28.3±10.7	0.729
No. of follicles ≥ 11 mm on hCG day	11.7±6.4	11.7±3.7	0.746
Serum E <sub>2</sub> levels on hCG day (pg/mL)	2,140.0±1,460.9	2,282.2±1,360.4	0.481
Total no. of oocytes retrieved	11.1±7.5	10.6±5.2	0.896
No. of mature oocytes	8.4±5.3	7.7±4.5	0.696

Mean ± S.D.

pg/mL)도 양 군간에 유의한 차이를 보이지 않았다.

체외수정시술을 위한 과배란유도의 결과는 Table 2와 같다. 과배란유도 기간 및 사용된 총 성선자극 호르몬 양은 신선 고환정자군에서 10.2±2.4일, 30.1±12.4 ampule이었고, 냉동보존-융해 고환정자군에서 9.7±1.9일, 28.3±10.7 ampule로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. hCG 투여일의 11 mm 이상의 난포 수 (11.7±6.4 vs. 11.7±3.4), hCG 투여일의 혈중 에스트라디올 농도 (2,140.0±1460.9 vs. 2282.2±1360.4 pg/mL), 채취된 총 난자의 수 (11.1±7.5 vs. 10.6±5.2), 채취된 성숙난자의 수 (8.4±5.3 vs. 7.7±4.5)도 양 군간에 유의한 차이가 없었다.

ICSI 시술을 위하여 신선 고환정자를 사용하기로 계획하여 여성배우자에서 과배란유도가 시행된

92주기 중 9주기는 고환정자추출술을 통하여 정자를 채취할 수 없어 주기가 취소되었고 총 83주기에서만 ICSI 시술이 시행되었으며 이 중 4주기는 수정실패로 인하여 배아이식이 취소되었다. 냉동보존-융해 고환정자군에서는 정자를 얻지 못하거나 수정에 실패하여 취소된 주기는 없었다. 수정률은 신선 고환정자군에서 58.0±34.8%, 냉동보존-융해 고환정자군에서는 45.9±25.0%이었고 신선 고환정자군에서 높은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다 (p=0.076). 이식된 배아의 수나 이식된 배아의 누적배아지수 (cumulative embryo score, CES)의 총합, 이식된 배아 당 누적배아지수는 양 군간에 유의한 차이가 없었다. 그러나 양질의 배아의 숫자는 신선 고환정자군에서 유의하게 많았다 (0.9±

**Table 3.** Outcomes of intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

	Fresh (n=92)	Cryopreserved-thawed (n=17)	P-value
No. of injected oocytes	8.3±5.5	8.5±4.6	0.686
No. of 2PN oocytes	4.8±4.2	4.4±3.6	0.747
Fertilization rate (%)	58.0±27.8	45.9±25.0	0.076
No. of embryos transferred	3.6±1.7	3.0±1.3	0.160
Cumulative embryo score	52.4±34.8	44.7±24.8	0.511
Cumulative embryo score per embryo transferred	14.5±8.0	15.8±8.6	0.539
No. of high quality embryos	0.9±1.2	0.2±0.5	0.002
No. of positive hCG	20/79 (25.3)	6/17 (35.3)	0.387
Clinical pregnancy rate per ET (%)	19.0 (15/79)	29.4 (5/17)	0.338
Clinical pregnancy per cycle (%)	16.3 (15/92)	29.4 (5/17)	0.302
Implantation rate (%)	9.8 (28/286)	15.7 (8/51)	0.220
No. of miscarriages	4	1	1.000
Preclinical	2	1	
Clinical	2	0	
Ectopic pregnancy	1	0	
No. of cancelled cycles	13	0	0.214
TESE failure	9	0	
Total fertilization failure	4	0	

Mean ± S.D., PN: pronuclei, ET: embryo transfer

1.2 vs.  $0.2 \pm 0.5$ ,  $p=0.002$ ). 배아이식 주기당 임상적 임신율은 신선 고환정자군에서 19.0% (15/79), 냉동보존-융해 고환정자군에서 29.4% (5/17)로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 착상률도 신선 고환정자군에서 9.8% (28/286), 냉동보존-융해 고환정자군에서 15.7% (8/51)로 통계적 유의성은 관찰되지 않았다. 신선 고환정자군에서는 2례의 전임상 유산 (preclinical miscarriage), 2례의 임상적 유산, 1례의 자궁외 임신이 있었으며 냉동보존-융해 고환정자군에서는 1례의 전임상 유산이 있었고 양 구간 유산율에서 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (Table 3).

## 고 찰

본 연구는 폐쇄성 및 비폐쇄성 무정자증 환자에서 신선 고환정자 및 냉동보존-융해 고환정자를 사용한 ICSI 기술의 결과를 비교하였고 주기 취소율과 관련하여 신선 고환정자를 사용한 ICSI 기술이 계획되었던 92주기 중 9주기 (9.8%)에서 고환정자를 추출하는데 실패하여 주기가 취소되었으나 냉동보존-융해 고환정자를 사용하기로 계획된 주기에서는 모두 ICSI 기술에 사용가능한 정자를 얻을 수 있었다. 따라서 무정자증 환자에서 ICSI 기술 이전에 고환정자를 확보하고 냉동보존-융해 고환정자를 사용한다면 난자채취 당일 정자를 확보하지 못하여 주기를 취소하는 경우나 여성배우자의 불필요한 과배란유도를 줄일 수 있는 유용한 방법으로 사료된다. ICSI 기술의 결과를 보면 냉동보존-융해 고환정자를 사용한 군에 비하여 신선 고환정자를 사용한 군에서 수정률이 더 높은 경향을 보였으며 유의하게 양질의 배아를 더 많이 얻을 수 있었으나 임신율이나 착상률, 유산률에서는 양 구간에 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 따라서 냉동보존-융해 정자를 사용할 경우 ICSI 기술의 결과에 영향을 주지 않으면서 반복적인 고환채취술로 인한 고환기능의 손상을 피할 수 있을 것으로 사료된다.

무정자증 환자에서 고환으로부터 추출된 냉동보존-융해 정자를 사용한 ICSI 기술은 침습적인 고환정자추출술의 횟수를 줄이고 정자추출과 난자채취를 동시에 시행함으로써 발생할 수 있는 주기 취소 문제를 극복할 수 있는 논리적인 기술이며 수정률도 비교적 우수한 것으로 알려져 있다. 그러나 일부 연구들에서는 냉동보존-융해 고환정자의 경우 ICSI 기술에 따른 수정률,<sup>19-22</sup> 착상률,<sup>18,19</sup> 생아출산율 (live birth rate)<sup>23</sup>이 감소한다는 보고들도 있고 일부 연구들에서는 차이가 없다는 보고들도 있으며<sup>13-17,23-25,27</sup> 오히려 수정률이 높다는 보고도 있어<sup>23</sup> 아직 논란의 여지가 있다.

미성숙한 고환정자가 냉동 및 융해에 따라 받을 수 있는 손상에 대해서는 아직 명확하게 알려져 있지 않다. 정자를 냉동하는 방법은 다양하여 25°C에서 10초 동안 -186°C로 냉동시키거나 정자의 온도가 점차적으로 감소될 수 있도록 프로그램화된 냉동 방법을 사용하기도 하고 정자의 융해도 급속으로 시행될 수도 있고 더 천천히 해동시키기도 한다. 이러한 정자의 냉동 및 융해과정에 따른 세포내 ice 형성이 냉동손상 (cryoinjury)의 중요한 원인 중 하나로 알려져 있다. 가임남성의 사정된 정자는 불임남성의 사정된 정자에 비하여 냉동손상에 덜 민감하다고 알려져 있는데<sup>28</sup> 냉동과정 동안 정액장액 (seminal plasma)을 추가하는 경우 냉동손상으로부터 정자의 DNA를 보호하는 역할을 한다고 보고된 바 있다. 그러나 고환정자는 이러한 정액장액의 결여로 냉동손상에 더 민감할 수도 있다.<sup>29</sup> 따라서 고환으로부터 추출한 미성숙한 정자를 사용한 ICSI 기술시 고환정자의 냉동보존-융해가 ICSI 기술의 결과에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.

이전에 보고된 신선 고환정자와 냉동보존-융해 고환정자를 사용한 ICSI 기술의 결과가 Table 4에 정리되어 있는데 이전의 연구들은 대부분 후향적 연구였고 표본수가 충분하지 않은 연구들이 많았다. 1997년 Friedler 등은 비폐쇄성 무정자증 환자를 대상으로 신선 고환정자 25주기, 냉동보존-융해 고

**Table 4.** Results of previous studies comparing fresh testicular spermatozoa with frozen-thawed testicular spermatozoa for ICSI

Author (yr)	Type		n	FR	HQE	Cleavage rate	CPR/ET	IR	LBR
Wu (2005)	OA+NOA	Fresh	22	72.1%	54.2%	NA	59.0%	29.5%*	40.9%
		Frozen	36	66.5%	54.1%	NA	55.5%	22.2%*	36.1%
Ulug (2005)	NOA	Fresh	50	72.3%*	NA	NA	32.0%	11.2%	NA
		Frozen	50	65.8%*	NA	NA	45.4%	19.2%	NA
Aoki (2004)	OA+NOA	Fresh	40	68.3%*	4.54 <sup>†</sup>	NA	56.4%	NA	48.7%**
		Frozen	52	76.5%*	3.62 <sup>†</sup>	NA	41.2%	NA	31.2%**
Nicopoulos (2004)	OA+NOA	Fresh	16	50.0%**	34.5%	NA	23.1%	13.8%	15.4%
		Frozen	11	38.5%**	13.0%	NA	20.0%	8.7%	10.0%
Kim (2004)	OA+NOA	Fresh	98	NA	49.2%	NA	26.9%	14.4%	23.7%
		Frozen	62	NA	46.2%	NA	22.2%	11.0%	15.9%
Park (2003)	OA+NOA	Fresh	84	65.4%	NA	NA	34.0%	NA	NA
		Frozen	177	70.9%	NA	NA	38.8%	NA	NA
Windt (2002)	OA+NOA	Fresh	93	64.0%	NA	98.9%	30.1% <sup>‡</sup>	NA	NA
		Frozen	23	69.7%	NA	99.1%	30.4% <sup>‡</sup>	NA	NA
Wood (2002)	OA+NOA	Fresh	18	71%*	NA	94%*	11.1%	NA	NA
		Frozen	18	53%*	NA	100%*	27.8%	NA	NA
Fukunaga (2001)	OA+NOA	Fresh	28	58.1%	NA	93.0%*	32.1%	NA	NA
		Frozen	24	54.5%	NA	92.5%*	29.2%	NA	NA
Gil-Salom (2000)	OA+NOA	Fresh	156	62.0%	NA	90.6%*	28.2%	12.2%	8%
		Frozen	234	63.2%	NA	84.6%*	27.8%	13.1%	13%
Habermann (2000)	OA+NOA	Fresh	12	56%	NA	92%	33%	26%	25.0%
		Frozen	34	61%	NA	95%	45%	17%	26.5%
Palmero (1999)	OA+NOA	Fresh	62	60.4%	NA	NA	50.0%	NA	NA
		Frozen	5	74.4%	NA	NA	60.0%	NA	NA
Ben-Yosef (1999)	NOA	Fresh	15	54.0%	39.8%	NA	26.7%	12.5%	20.0%
		Frozen	24	51.2%	34.3%	NA	21.7%	8.5%	13.0%
Kim (1999)	OA+NOA	Fresh	30	66.5%	2.4 <sup>†</sup>	NA	26.7%*	NA	NA
		Frozen	39	69.2%	2.5 <sup>†</sup>	NA	33.3%*	NA	NA
De Croo (1998)	OA+NOA	Fresh	65	79.3%*	11.4%	97.2%	38.2% <sup>‡</sup>	24.6%*	23.6%
		Frozen	55	71.1%*	7.0%	94.2%	26.5% <sup>‡</sup>	9.1%*	14.7%



**Table 4.** Continued

Author (yr)	Type		n	FR	HQE	Cleavage rate	CPR/ET	IR	LBR
Friedler (1997)	NOA	Fresh	25	47%	24%	93%	26%	9%	NA
		Frozen	14	44%	19%	89%	27%	11%	NA

\* p<0.05, \*\* p>0.05 and p<0.10, <sup>†</sup> Mean embryo score, <sup>‡</sup> Clinical pregnancy rate per cycle

<sup>†</sup> No. of high quality embryos, <sup>\*</sup> Positive hCG

FR, fertilization rate; HQE, high quality embryos; CPR, clinical pregnancy rate; ET, embryo transfer; IR, implantation rate; LBR, live birth rate; OA, obstructive azoospermia; NOA, non-obstructive azoospermia; NA, not available.

환정자 14주기에 대하여 ICSI 기술의 결과를 비교하였는데 수정률, 임신률, 착상률은 유사하였고 통계적 유의성은 없었으나 생아 출산율은 신선 고환정자를 사용한 군에서 높았다고 보고하였고 (22% vs. 9%)<sup>30</sup> 이 후로 많은 연구들이 유사한 결과를 보고하고 있다.<sup>12,13,15~17,27</sup> 국내 보고로는 1999년 김 등이 무정자증 환자에서 신선 고환정자 30주기, 냉동보존-융해 고환정자 39주기를 대상으로 본 연구와 유사한 연구를 시행하였는데 수정된 난자 수, grade I/II 배아의 수, 수정률, 임신률에서 차이가 없다고 보고한 바 있고<sup>24</sup> 2004년 김 등도 냉동보존-융해 배아식주기에서 유사한 결과를 보고한 바 있다.<sup>25</sup>

그러나 본 연구의 결과처럼 신선 고환정자와 냉동보존-융해 고환정자를 ICSI 기술에 사용한 경우 ICSI 기술 결과에서 유의한 차이가 있다고 보고한 연구들도 있다. 1998년 De Croo 등은 폐쇄성 및 비 폐쇄성 무정자증 환자들을 대상으로 한 연구에서 신선 고환정자를 사용하기로 계획된 65주기 중 55주기에서 정자를 얻을 수 있었고 냉동보존-융해 고환정자를 사용하기로 한 35주기 중 34주기에서 정자를 얻을 수 있었다고 보고하였다. 수정률은 냉동보존-융해 고환정자의 경우에 비하여 신선 고환정자를 사용한 경우에서 유의하게 높았으나 (73.9% vs. 71.1%) 임상적 임신율은 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 착상률 (24.6% vs. 9.1%) 및 생아 출산률 (18.8% vs. 7.9%)은 신선 고환정자를 사용한 군에서 유의하게 높았다고 보고하였다.<sup>19</sup> Gil-Salom 등은 ICSI 기술시 156주기의 신선 고환정자를 사

용한 군과 234주기의 냉동보존-융해 고환정자를 이용한 군의 ICSI 기술 결과를 비교하였는데 수정률이나 임신율, 착상률은 양 군에서 유의한 차이가 없었으나 신선 고환정자를 사용한 군에서 유의하게 배아의 분할률 (embryo cleavage rate)이 높았다고 보고한 바 있다 (90.6% vs. 84.6%).<sup>14</sup> Wood 등은 동일한 환자 18명을 대상으로 신선 고환정자 및 냉동보존-융해 고환정자를 사용한 ICSI 기술 결과에 관한 비교 연구에서 임신율에는 영향을 주지 않았지만 수정률이 신선 고환정자를 사용한 군에서 유의하게 높았다 (71% vs. 53%)고 보고하였고 % 배아 분할률 (% cleavage rate)은 오히려 냉동보존-융해 고환정자에서 유의하게 높았다 (94% vs. 100%)고 보고하였다.<sup>22</sup> Aoki 등은 첫 번째 시술 주기만을 대상으로 신선 고환정자군 (n=40)과 냉동보존-융해 고환정자군 (n=52)의 ICSI 기술 결과를 비교하였는데 이전의 보고들과 상반되게 수정률이 냉동보존-융해 고환정자군에서 높았으나 (68.3% vs. 76.5%) 신선 고환정자군에서 배아의 질이 더 좋았고 임신율이 높았으며 (56.4% vs. 41.2%) 유산율이 낮았다고 (21.7% vs. 33.3%) 보고한 바 있다.<sup>23</sup>

결론적으로 본 연구에서는 무정자증 환자들에서 ICSI 기술을 위해 냉동보존-융해 고환정자를 사용하는 경우 수정률이 감소하고 배아의 질도 감소하지만 임신율, 착상률, 유산율과 같은 ICSI 기술의 임상적 결과에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 또한, ICSI 기술이전에 고환정자를 확보하고 냉동보존-융해 고환정자를 사용한다면 난자채취 당일 정자를 확보하지 못하여 주기를 취소하는 경

우나 여성배우자의 불필요한 과배란유도를 줄일 수 있으며 반복적인 고환정자추출술로 인한 고환기능의 손상을 줄일 수 있는 유용한 방법으로 사료된다. 그러나, 본 연구는 후향적 연구이고 표본수가 적어서 본 연구 결과를 확인하기 위해서 대규모의 전향적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

1. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-8.
2. Willott GM. Frequency of azoospermia. *Forensic Sci Int* 1982; 20: 9-10.
3. Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol* 1989; 142: 62-5.
4. Dubin L, Amelar RD. Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fertil Steril* 1971; 22: 469-74.
5. Schoysman R, Vandervorst M, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, van Roosendaal E, Schoysman D. Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet* 1993; 342: 1237.
6. Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Soffer Y, Komarovsky D, Ron-El R. Testicular sperm retrieval by percutaneous fine needle sperm aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997; 12: 1488-93.
7. Tournaye H, Camus M, Vandervorst M, Nagy Z, Joris H, Van Steirteghem A, et al. Surgical sperm retrieval for intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl* 1997; 20 Suppl 3: 69-73.
8. Tournaye H, Verheyen G, Nagy P, Ubaldi F, Goossens A, Silber S, et al. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum Reprod* 1997; 12: 80-6.
9. Ezeh UI, Moore HD, Cooke ID. A prospective study of multiple needle biopsies versus a single open biopsy for testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1998; 13: 3075-80.
10. Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 1999; 14: 131-5.
11. Turek PJ, Givens CR, Schriock ED, Meng MV, Pedersen RA, Conaghan J. Testis sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection guided by prior fine-needle aspiration mapping in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 1999; 71: 552-7.
12. Ben-Yosef D, Yogev L, Hauser R, Yavetz H, Azem F, Yovel I, et al. Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1999; 14: 1794-801.
13. Fukunaga N, Haigo K, Kyono K, Araki Y. Efficiency of using frozen-thawed testicular sperm for multiple intracytoplasmic sperm injections. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 634-7.
14. Gil-Salom M, Romero J, Rubio C, Ruiz A, Remohi J, Pellicer A. Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169: 15-9.
15. Habermann H, Seo R, Cieslak J, Niederberger C, Prins GS, Ross L. In vitro fertilization outcomes after intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. *Fertil Steril* 2000; 73: 955-60.
16. Palermo GD, Schlegel PN, Hariprasad JJ, Ergun B, Mielnik A, Zaninovic N, et al. Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum Reprod* 1999; 14: 741-8.
17. Park YS, Lee SH, Song SJ, Jun JH, Koong MK, Seo JT. Influence of motility on the outcome of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection with fresh vs. frozen testicular sperm from men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2003; 80: 526-30.
18. Wu B, Wong D, Lu S, Dickstein S, Silva M, Gelety TJ. Optimal use of fresh and frozen-thawed testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in azoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 2005; 22: 389-94.
19. De Croo I, Van der Elst J, Everaert K, De Sutter P, Dhont M. Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13: 1893-7.
20. Nicopoullou JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Ramsay JW. The results of 154 ICSI cycles using surgically retrieved sperm from azoospermic men. *Hum Reprod* 2004; 19: 579-85.
21. Ulug U, Bener F, Karagenc L, Ciray N, Bahceci M. Outcomes in couples undergoing ICSI: comparison between fresh and frozen-thawed surgically retrieved spermatozoa. *Int J Androl*

- 2005; 28: 343-9.
22. Wood S, Thomas K, Schnaufer K, Troup S, Kingsland C, Lewis-Jones I. Reproductive potential of fresh and cryopreserved epididymal and testicular spermatozoa in consecutive intracytoplasmic sperm injection cycles in the same patients. *Fertil Steril* 2002; 77: 1162-6.
23. Aoki VW, Wilcox AL, Thorp C, Hamilton BD, Carrell DT. Improved in vitro fertilization embryo quality and pregnancy rates with intracytoplasmic sperm injection of sperm from fresh testicular biopsy samples vs. frozen biopsy samples. *Fertil Steril* 2004; 82: 1532-5.
24. 김정훈, 채희동, 강은희, 전용필, 홍석호, 강병문 등. 동결-융해된 고환조직내 정자를 이용한 난자세포질내 정자주입술에 관한 연구. *대한산부회지* 1999; 42: 1926-34.
25. 김수경, 변혜경, 최수진, 박용석, 송상진, 전진현 등. 정자의 획득 방법에 따라 얻어진 ICSI 배아의 동결-융해 이식 후 임신 결과. *대한산부회지* 2004; 47: 2167-72.
26. Choi YS, Ku SY, Jee BC, Suh CS, Choi YM, Kim JG, et al. Comparison of follicular fluid IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, IGFBP4 and PAPP-A concentrations and their ratios between GnRH agonist and GnRH antagonist protocols for controlled ovarian stimulation in IVF-embryo transfer patients. *Hum Reprod* 2006; 21: 2015-21.
27. Windt ML, Coetzee K, Kruger TF, Menkveld R, van der Merwe JP. Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in men with azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 53-9.
28. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril* 2001; 76: 892-900.
29. Thompson-Cree ME, McClure N, Donnelly ET, Steele KE, Lewis SE. Effects of cryopreservation on testicular sperm nuclear DNA fragmentation and its relationship with assisted conception outcome following ICSI with testicular spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 449-55.
30. Friedler S, Raziel A, Soffer Y, Strassburger D, Komarovsky D, Ron-el R. Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia--a comparative study. *Fertil Steril* 1997; 68: 892-7.

---

= 국문초록 =

**목적:** 무정자증 불임부부에서 신선 (fresh) 고환정자 (testicular spermatozoa)와 냉동보존-융해(cryopreserved-thawed) 고환정자를 사용한 난자세포질내 정자주입술 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)의 결과를 비교하고자 하였다.

**연구방법:** 신선 고환정자 및 냉동보존-융해 고환정자를 사용하여 ICSI 시술을 시행하기로 계획된 총 109주기 (66명)를 대상으로 하였고 신선 고환정자를 사용하기로 계획한 군 (신선 고환정자군, fresh group)에는 92주기 (61명)이 포함되었고 냉동보존-융해 고환정자를 사용하기로 계획한 군 (냉동보존-융해 고환정자군, cryopreserved-thawed group)에는 17주기 (13명)가 포함되었다. 양 군간에 수정률, 착상률, 임신률, 유산률 등 ICSI 시술의 결과들을 비교하였고 통계학적 분석은 Mann-Whitney U 검정 및 Fisher의 정확한 검정을 적절하게 사용하였다.

**결과:** 신선 고환정자를 사용하여 ICSI 시술을 시행하기로 계획된 총 92주기 중 9주기에서 고환정자를 추출할 수 없어 시술 주기가 취소되었다. 냉동보존-융해 고환정자군과 비교하여 신선 고환정자군에서 수정률이 높은 경향을 보였고 ( $58.0 \pm 27.8\%$  vs.  $45.9 \pm 25.0\%$ ,  $p=0.076$ ) 양질의 배아 수는 통계적으로 유의하게 높았다 ( $0.9 \pm 1.2$  vs.  $0.2 \pm 0.5$ ,  $p=0.002$ ). 그러나 임상적 임신률, 착상률, 유산율은 양 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

**결론:** ICSI 시술을 위하여 냉동보존-융해 고환정자를 사용하는 경우 수정률 및 배아의 질이 감소하지만 임신율, 착상률, 유산율에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 또한, ICSI 시술이전에 고환정자를 확보하고 냉동보존-융해 고환정자를 사용한다면 난자채취 당일 정자를 확보하지 못하여 주기를 취소하는 경우나 여성배우자의 불필요한 과배란유도를 줄일 수 있으며 반복적인 고환정자추출술로 인한 고환기능의 손상을 줄일 수 있는 유용한 방법으로 사료된다.

**중심단어:** 무정자증, 고환정자추출술, 냉동보존, 난자세포질내 정자주입술

---