

고환조직 정자채취술 (TESE)의 정자 상태에 따른 세포질내 정자주입술의 (ICSI)수정률과 임신율

제일병원 불임연구실, 비뇨기과*, 산부인과**

전진현 · 김정욱 · 박용석 · 이호준 · 서주태* · 이유식* · 손일표** · 전종영**

Fertilization and Pregnancy Rate of Testicular Sperm Extraction(TESE) with Intracytoplasmic Sperm Injection(ICSI)

Jin Hyun Jun, Jeong Wook Kim, Yong-Seog Park, Ho-Joon Lee and Ju Tae Seo*,
Yu Sik Lee*, Il Pyo Son** and Jong Young Jun**

Infertility Research Laboratory, Department of Obstetrics and Gynecology,
Department of Urology**, Cheil General Hospital, Seoul, Korea*

= Abstract =

In IVF-ET program, intracytoplasmic sperm injection(ICSI) has been performed with testicular sperm extraction(TESE) in case of no normal spermatozoon could be retrieved from the epididymis. We wished to see whether the quality of testicular sperm affect the fertilization and pregnancy rate in TESE-ICSI cycles(n=40). These cycles were classified into three groups by the total number of normal motile spermatozoa(TNMS) in the TESE sample: i) good sperm(GS) group(n=12), TNMS > 10,000; ii) moderate sperm(MS) group(n=19), 1,000 < TNMS < 10,000; iii) poor sperm(PS) group(n=9), TNMS < 1,000. Among 423 injected oocytes, 307(72.6%) oocytes were normally fertilized and 43 zygotes were cryopreserved. The fertilization rates of GS group(79.3%) and MS group(75.9%) were significantly(p<0.005) higher than PS group(60.2%). After the embryo transfer(n=40), clinical pregnancy was obtained in 14 cycles(35.0%) and on-going pregnancy in 13 cycles(32.5%). The clinical and on-going pregnancy rates were similar in each group. From these results it can be concluded that testicular spermatozoa are successfully used with ICSI in IVF-ET program in spite of very poor quality of TESE sample.

서 론

세포질내 정자주입술(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)은 일반적인 체외수정(in vitro fertilization) 방법으로는 수정이 어려운 정자를 이용하여 높은 수정률과 임신율을 얻을 수 있는 방법으로 알려져 있다(Van Steirteghem et al., 1993; 전진현, 1994; Palermo et al., 1995). 최근에는 사정정자(ejaculated sperm)뿐만 아니라 부고환 정자

(epididymal sperm), 고환 정자(testicular sperm)를 이용하여서도 성공적으로 체외수정 및 배아이식술을 수행할 수 있는 것으로 보고되고 있다(Devroey et al., 1994; Tucker et al., 1995; Nazy et al., 1995).

손 등(1995)은 선천성 정관 형성 부전증(congenital absence of vas deferens, CAVD)이나 수술로서 교정이 불가능한 폐쇄성 무정자증(unreconstructable obstructive azoospermia)환자에서 미세수술적 부고환 정자흡입술(microsurgical

epididymal sperm aspiration, MESA)과 ICSI를 이용한 체외수정 및 배아이식술에서 수정률과 임신율 증진에 관하여 보고하였으며, Silber 등(1995)은 여러 원인으로 부고환에서 정자 채취가 불가능한 경우에 고환조직 정자 채취술(testicular sperm extraction, TESE)로 채취한 고환정자를 이용한 ICSI에서 수정과 임신에 성공하였음을 보고하였다.

고환에서 채취한 정자는 그 상태가 환자에 따라 다양하게 나타나며 이러한 정자의 상태는 ICSI의 결과에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 고환 정자는 상태가 불량하여 이에 대한 분석이 쉽지 않으므로, 정상적인 형태의 운동성 정자의 수(total number of normal motile spermatozoa, TNMS)로서 고환 정자의 상태를 구분하는 방법이 유용하리라 생각된다.

사정 정자를 이용한 ICSI의 결과는 정자의 상태 즉, 정자의 수, 형태, 운동성 등에 크게 영향을 받지 않는 것으로 알려져 있으며(Palermo et al., 1993; Payne et al., 1994), Kim 등(1995)은 부고환정자를 이용한 MESA-ICSI에서 부고환 정자의 채취 장소에 따른 수정률과 임신율을 보고하였다.

본 연구에서는 TESE 방법으로 채취한 고환정자를 운동성 정자의 수를 기준으로 세가지로 구분하고, 이들을 이용한 ICSI의 결과를 분석하여, TESE-ICSI의 효용성과 응용 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 1994년 11월부터 1995년 5월까지 제일병원 불임클리닉에서 체외수정 및 배아이식술을 시행한 여러 원인의 무정자증 환자중에서, 부고환에서 정자 채취가 불가능하여, TESE를 시행한 40예를 대상으로 하였으며, 정상적인 형태의 운동성 정자의 수 (TNMS)에 따라, 그 수가 10,000 이상인 양호 정자군(good sperm, GS group; 12예), 1,000~10,000 정도인 보통정자군(moderate sperm, MS group; 19예), 1,000 이하인 빈약정자군(poor sperm, PS group; 9예) 등으로 구분하였다.

2. 고환조직 정자채취술(TESE) 및 정자 확인

부고환에서 정자를 채취할 수 없다고 진단된 경우에 다음과 같은 방법으로 TESE를 실시하였다. 국소마취하에 약 1cm 정도를 음낭 및 초막을 절개한 후 백막을 0.5mm 정도 절개하여 약간의 고환조직을 추출하였다. 이렇게 추출한 고환조직을 0.4% BSA(bovine serum albumin) 배양액이 담겨진 Petri dish로 옮겨 배양액으로 1,2회 세척한 후 해부현미경 하에서 조심스럽게 정세관을 미세검자(microforceps)로 짜내거나 혹은 가위질하여 얻은 추출물에서 정자의 존재 여부를 확인하였다. 그 후 pipetting 하여 충분히 분산시킨 후, 원심분리하여 상층액을 제거하고 0.5ml의 배양액을 첨가하여 배양기에서 3-5시간 동안 배양하였다. 준비된 고환조직 현탁액을 injection dish에 있는 0.4% HSA(human serum albumin)배양액 drop에 넣고, 30분 정도 후에 운동성 정자의 수(TNMS)를 도립현미경 하에서 확인하여 각각의 정자군으로 구분하였다.

3. 과배란 유도 및 난자 준비

난자를 채취하기 위한 과배란 유도는 FSH/hMG와 GnRH agonist를 병용하였으며, hCG 주사 후 34시간에 질식 초음파를 이용하여 난자를 채취하였다. 채취한 난자-난구 복합체는 일차적으로 성숙도를 판정하고, 3-5시간 동안 배양한 후에 0.1% hyaluronidase를 처리하여 난구세포를 분리하였다. ICSI를 시행하기 직전에 난자의 성숙 정도를 현미경하에서 판정하여 제1극체가 방출된 제2감수분열 중기의 난자만을 ICSI에 사용하였다.

4. 세포질내 정자주입술

세포질내 정자주입술은 도립현미경(Nikon, Diaphot 300)에 장착된 1쌍의 미세조작기(Narishige, NT-88)를 이용하여 수행하였으며, holding pipette과 injection pipette은 내경이 각각 15-20 μ m와 4-7 μ m인 것을 사용하였다. 고환 정자는 일차적으로 배양액 drop에서 운동성 정자를 회수하고, 이들을 10% polyvinylpyrrolidone(PVP) drop으로 옮겨, 운동성을 감소시키고 injection pipette으로 운동정자의 중편(midpiece)에 물리적 힘을 가하여 비운동화시킨 후 난자에 주입하였다. 준비된 난자는 제1극체가 12시 또는 6시 방향에 위치하도록 holding pipette으로 고정된 후 준비된 정자를 injection pipette을 사용하여 3시 방향에서

Table 1. Age of patients according to the total number of normal motile testicular spermatozoa obtained by testicular sperm extraction

Group	No. of motile spermatozoa	Age (Mean ± SD)	
		Wife	Husband
GS ^a	<1,000	31.7 ± 3.4	34.3 ± 4.1
MS ^b	1,000-10,000	31.7 ± 3.7	34.4 ± 4.5
PS ^c	>10,000	31.2 ± 3.3	33.9 ± 4.1
Total		31.6 ± 3.4	34.3 ± 3.8

^a; good sperm, ^b; moderate sperm, ^c; poor sperm.

Table 2. Fertilization of human oocytes after intracytoplasmic sperm injection according to the total number of normal motile testicular spermatozoa obtained by testicular sperm extraction

Group	Cycles	No. of			
		Retrieved oocytes	Injected oocytes	Fertilized oocytes(%) ^a	Cryo. zygotes
GS	12	170	135	107(79.3)*	31
MS	19	220	170	129(75.9)*	12
PS	9	157	118	71(60.2)	0
Total	40	547	423	307(72.6)	43

^a; per injected oocyte, Cryo.; Cryopreservation,* p<0.005.

Table 3. Pregnancy obtained after intracytoplasmic sperm injection according to the total number of normal motile testicular spermatozoa obtained by testicular sperm extraction

Group	Cycles	No. of(%)			
		Embryo transfers	positive β-hCG	Clinical pregnancies	On-going pregnancies
GS	12	12	5(41.7)	5(41.7)	5(41.7)
MS	19	19	7(36.8)	6(31.6)	5(26.3)
PS	9	9	3(33.3)	3(33.3)	3(33.3)
Total	40	40	15(37.5)	14(35.0)	13(32.5)

9시 방향쪽으로 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.

5. 배아 이식 및 임신 확인

난자 채취 후 72시간 동안 배양하여 정상적으로 발생된 4-8 세포기 배아를 확인하고, acid Tyrode's solution (pH 2.3)을 사용하여 zona drilling 방법으로 assisted hatching(AHA)을 시행하였다(Cohen et al., 1992). AHA 시행 3-5시간 후에 배아를 자궁내에 이식하였으며, 임신여부는 배아 이식 13일 후에 혈청내 β-hCG 양으로 판정하였고, 태아의 심박동이 확인된 경우를 임상적 임신 (clinical pregnancy)로 정의하였으며, 현재까지 임

신이 유지된 경우를 on-going pregnancy로 정의하였다.

6. 분석 및 통계 방법

결과에 대한 통계적 분석은 x²-test를 이용하였고, p 값이 0.05이하인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

각각의 정자군에서 대상 환자의 나이는 차이가 없었으며(표 1), 40주기에서 채취한 547개의 난자 중, 423개의 성숙 난자에서 ICSI를 시행하였다. ICSI를 시행한 난자 중에서 307개(72.6%)가 수정되었으며, 그 중 43개의 수정란을 동결보존(cryopreservation)하였다. 각각의 정자군에서

수정률은 GS군에서 79.3% (107/135), MS군에서 75.9%(129/170), PS군에서 60.2%(71/118)로 GS군과 MS군의 수정률이 PS군의 수정률보다 유의하게 ($p<0.005$) 높았다(표 2).

배아이식은 40주기에서 모두 시행하여, 배아이식 후 15주기(37.5%)에서 β -hCG 양성반응을 보였으며, 14주기(35.0%)에서 임상적 임신율을 얻을 수 있었고, 13주기(32.5%)에서 임신이 유지되고 있다. 각각의 정자군에서 배아이식 후 β -hCG 양성반응은 GS군에서 41.7%(5/12)로 MS군의 36.8%(7/19)와 PS군의 33.3%(3/9)에 비해 높았지만 유의성은 없었으며, 임상적 임신율과 임신 유지율도 MS군과 PS군에 비해 GS군에서 높은 경향을 보였다(표 3).

고 찰

선천성 정관 형성 부전증이나 수술로서 교정이 불가능한 폐쇄성 무정자증 환자에서의 정자 채취는 일차적으로 부고환에서 MESA 방법으로 시도되지만, 부고환에서 정자 채취가 불가능한 경우에는 고환조직에서 정자를 채취하는 TESE 방법을 이용하게 된다. 이렇게 채취한 고환 조직의 정자는 그 상태가 환자에 따라 다양하게 나타나게 되는데, 고환 정자의 분석은 정자의 상태가 매우 불량하여 어려움이 있다. 본 연구에서는 정상적인 형태의 운동성 정자의 수(TNMS)로서 고환 정자의 상태를 구분하여 ICSI 후의 수정률과 임신율에 대해 알아보았다.

고환 정자의 상태가 양호한 GS군에서 가장 높은 수정률을 얻을 수 있었는데, 이는 정자의 상태가 좋지 못한 PS군에 비해 상대적으로 정자주입 과정에 소요되는 시간이 짧아 ICSI 과정이 용이하고, 정상적인 정자를 주입할 확률이 높기 때문인 것으로 생각된다. 고환정자의 상태가 보통인 MS군의 수정률은 GS군과 차이가 없어, 어느 정도의 정상적인 운동성 정자만 있으면 수정률에서는 차이가 없음을 알 수 있었다.

각각의 정자군에서의 임신율은 GS군에서 다소 높은 경향을 나타냈는데, 이는 수정률이 높으므로 인해 많은 수의 배아를 얻을 수 있고, 따라서 양질의 배아를 이식할 확률이 높았기 때문이 아닌가 생각된다. 그러나 PS군에서도 33.3%(3/9)의 임신율을 얻어 고환 정자의 상태가 좋지 않더라도 성공적으로 체외수정 및 배아이식이 가능

함을 알 수 있었다.

그리고 이러한 TESE-ICSI에서 β -hCG 양성 반응을 보인 15주기에서 13주기(86.7%)가 on-going pregnancy로 진행되어, 남성 요인에 의한 불임에서 임신 유지율이 높게 나타남을 보여주었다.

고환 정자는 사정 정자에 비해 전체적으로 운동성이 약하고 형태에 있어 두부의 모양, 세포질 잔기의 여부 등에서 차이를 보이지만, ICSI를 이용하면 체외수정 및 배아이식이 가능하며, 고환 조직내의 정자 상태가 매우 불량하더라도 TESE-ICSI를 성공적으로 수행할 수 있음을 알 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 TESE 방법으로 채취한 고환 정자의 상태를 정상적인 운동성 정자의 수를 기준으로 양호 정자군(GS group, 12예), 보통 정자군(MS group 19예), 빈약 정자군(PS group 9예) 등으로 구분하고, 이러한 정자를 이용하여 ICSI를 시행한 후 체외수정 및 배아이식술의 결과를 비교하였다.

1. 각각의 정자군에서 대상 환자의 나이는 차이가 없었으며, ICSI 후 수정률은 GS군(79.3%)과 MS군(75.9%)에서 PS군(60.2%)에 비해 유의하게 ($p<0.005$) 높았다.

2. 배아이식 후 임상적 임신율을 GS군(41.7%)에서 MS군(31.6%)과 PS군(33.3%)에 비해 높은 경향을 보였다.

이상의 결과에서 TESE-ICSI 후 고환 정자의 상태에 따라 수정률은 차이가 있었지만 임신율은 차이가 없었으며, 고환 정자의 상태가 매우 불량하더라도 성공적인 체외수정 및 배아이식이 가능함을 알 수 있었다.

인 용 문 헌

- 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.
- 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.
- 전진현, 이호준, 김정옥, 박용석, 이유식, 홍재엽, 손일표, 전종영: 체외수정 및 배아이식술에서 세포질내 정자주입술(ICSI)의 수정률과 임신율. 대한불임학회잡지 1994, 21, 247-252.
- Kim YC, HJ, Oum KB, Oh HJ, Park JY, Han SY, Han SY, Choi DH, Yoon TK, Cha KY: Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: an implication of aspiration site on epididymis(Abstract). *J Assist Reprod Genet* 1995, 12(suppl), 92s.
- 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.
- Palermo G, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rosenwaks Z: Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. *Fertil Steril* 1995, 63, 820-827.
- Payne D, Flaherty S, Jeffrey R, Warnes G, Matthews C: Successful treatment of severe male factor infertility in 100 consecutive cycles using intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994, 9, 2051-2057.
- Silber S, Van Steirteghem, 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.
- Tucker M, Wright G, Morton P, Mayer M, In-gargiola P, Jones A: 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 A, Nazy W, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P: High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993, 8, 1061-1066.