

고환조직 정자채취술과 세포질내 정자주입술을 이용한 고환 조직 정자의 수정률과 임신율

삼성제일병원 불임연구실, 비뇨기과¹, 산부인과²

박용석 · 서주태¹ · 전진현 · 변혜경 · 김종현¹ · 이유식¹ · 손일표² · 강인수² · 이호준

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

Yong-Seog Park, Ju Tae Seo¹, Jin-Hyun Jun, Hye-Kyung Byun, Jong Hyun Kim¹, You Sik Lee¹, Il Pyo Son², Inn Soo Kang² and Ho-Joon Lee

Infertility Research Laboratory, Department of Urology¹, Department of Obstetrics and Gynecology², Samsung Cheil Hospital & Women's Healthcare Center, Seoul, Korea

= Abstract =

This study was carried to determine the possibility of finding motile spermatozoa and fertilization, pregnancy rate after testicular sperm extraction(TESE) with ICSI in obstructive and non-obstructive azoospermic patients. In 154 cases(132 patients), obstructive azoospermia was 77 cases and non-obstructive azoospermia was 77 cases. In obstructive azoospermia, patients generally showed normal spermatogenesis and included vas agenesis(n=8), multiple vas obstruction(n=7), epididymal obstruction (n=54). Total of 982 retrieved oocytes were obtained and 84.4% were injected. The fertilization rates with 2 PN and cleavage rate were 72.5% and 62.3%, respectively. 30 pregnancies(38.9%) were achieved and the ongoing pregnancies were 22 cases (28.6%). In non-obstructive azoospermia, patients showed hypospermatogenesis(n=49), maturation arrest(n=4), Sertoli cell only syndrome (n=24). The various stages of spermatogenic cell could be retrieved by TESE and could be reached normal fertilization and embryo development with ICSI. Total of 1072 retrieved oocytes obtained and 80.2% were injected. The fertilization rates with 2 PN and cleavage rate were 52.8% and 68.9%, respectively. 22 pregnancies(30.1%) were achieved and the ongoing pregnancies were 19 cases(26.0%). Conclusively, the combination of TESE with ICSI using testicular spermatozoa can achieve normal fertilization and pregnancy rate and effective method in obstructive and non-obstructive azoospermic patients.

Key Words: Non-obstructive azoospermia, Obstructive azoospermia, TESE, ICSI.

서 론

세포질내 정자주입술(intracytoplasmic sperm injection; ICSI)이 보조생식술(Assisted Reproductive Technology; ART)에 도입된 후 일반적인 체외수

정방법으로 수정이 거의 불가능한 남성불임 환자에서 선천성 정관형성부전증이나 수술로써 교정이 불가능한 폐쇄성 정로장애로 인한 무정자증 환자의 부고환에서 정자를 흡입하는 미세수술적 부고환 정자흡입술(microsurgical epididymal sperm aspiration; MESA)과 인공정액낭 정자흡입

술(artificial spermatocele sperm aspiration;ASSA)을 ICSI와 병행하여 높은 수정률과 임신율을 얻었으며(Tourmaye 등, 1994; 손일표 등, 1994; 박용석 등, 1995), 최근의 보고에 의하면 고환조직 정자 채취술(testicular sperm extraction; TESE)을 이용하여 추출된 정자의 경우 수와 운동성은 저조하지만 ICSI를 이용하여 수정률과 임신율을 높일 수 있다(Schoysman 등, 1993; Devroey 등, 1994; Bourne 등, 1995; Craft와 Tsigotis, 1995; Nagy 등, 1995; Silber 등, 1995; 이유식 등, 1995; 전진현 등, 1995). 그러나 무정자증 환자중 폐쇄성 무정자증 환자의 경우 이러한 보조생식술을 이용하여 많은 문제를 극복하였으나 무정자형성이나 정자형성결함으로 인한 비폐쇄성 무정자증 환자의 경우 해결해야 할 문제로 남아있다. 비폐쇄성 무정자증 환자의 경우는 고환 조직의 일부에서만 정자가 생성되거나 발달 단계가 정지하는 경우가 있으므로 수정을 위한 충분히 성숙된 정자를 고환으로부터 얻는데 있어 문제가 있다.

이에 본 연구에서는 부고환에서 정자를 채취할 수 없거나 부고환에서 정자는 채취되었으나 활동성이 없어 수정에 부적합한 것으로 판단된 폐쇄성 무정자증 환자와 조직검사 소견상 정자 발육부전으로 인한 비폐쇄성 무정자증 환자에서 고환조직정자채취술과 세포질내 정자주입술(TESE-ICSI)을 시행하여 수정률과 임신율을 조사하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 1996년 1월부터 1996년 12월까지 삼성제일병원 불임클리닉을 내원한 남성 불임환자중 부고환에서 정자를 채취할 수 없거나 채취된 정자가 활동성이 없는 폐쇄성 무정자증 환자 69명(77례)와 조직 검사 소견상 maturation arrest, hypospermatogenesis, Sertoli cell only syndrome을 보인 비폐쇄성 무정자증 환자 62명(77례)를 대상으로 실시하였으며 이들의 평균 연령은 36.6±3.8세였으며 부인의 평균 연령은 32.8±3.2세였다.

2. 남성불임 진단

환자의 병력과 이학적 검사를 일정한 양식에 따라 확인하였으며, 정액검사, 호르몬검사, Immunobead test, 고환조직검사 등을 시행하였다.

폐쇄성 무정자증 환자는 선천성 정관형성부전증이나 정관폐색, 부고환폐색으로 인해 정관-정관문합술, 부고환-정관문합술이나 MESA와 ASSA를 시행 후 임신에 실패하였을 경우, 부고환에서도 정자를 채취할 수 없거나 회수된 정자의 운동성이 없는 경우, 심한 비정상 형태의 두부를 가진 정자가 회수된 경우 고환조직 정자채취술(testicular sperm extraction; TESE, 이하 TESE)을 시행하였다. 비폐쇄성 무정자증 환자는 조직 검사 소견상 회소정자형성증(hypospermatogenesis) 환자의 경우 정관 및 부고환의 폐색이 없음을 확인한 후 TESE를 시행하였고 정자형성발달정지(maturation arrest), 서틀리세포유일층후군(Sertoli cell only syndrome) 환자는 전시술없이 바로 TESE를 시행하였다.

3. 고환조직 정자채취술(testicular sperm extraction;TESE)

국소마취하에 음낭 및 초막(tunica vaginalis)을 약 3 cm 절개한 후 백막(tunica albuginea)을 0.5 cm 정도 절개하여 고환조직을 추출하였다. 비폐쇄성 무정자증 환자의 경우는 백막을 여러 곳 절개하여 조직을 얻는 다중적 고환조직 정자채취술(multiple TESE)을 시행하였다. 추출된 고환조직을 0.4% BSA가 첨가된 Ham's F-10-HEPES 배양액이 담긴 Petri dish로 옮겨 해부현미경하(12x-20x)에서 조심스럽게 세정관을 미세검자로 짜내어(squeezing) 추출물을 얻은 후 200배 현미경하에서 정자의 존재 여부를 확인하였다.

4. 정자세포의 판정

정자세포를 발달단계별로 구분하기 위하여 회수된 세정관내 추출물을 0.1% collagenase로 처리하여 간질세포를 분리하였으며 0.25% trypsin 처리하여 cytoplasmic bridge를 끊음으로서 pipetting으로 인한 손상을 줄이며 정자세포의 발달단계를 구분, 회수하였으며 Papanicolaou 염색법으로 회수된 발달단계를 확인하였다(Clermont 등, 1963; Forest 등, 1992; WHO, 1992; 김묘경 등, 1996).

5. 과배란 유도 및 난자 준비

난자 채취를 위한 과배란 유도는 FSH/hMG와 GnRH agonist를 병용하였으며, hCG 주사 후 34시간에 질식 초음파를 이용하여 난자를 채취

하였다. 채취한 난자-난구 복합체는 성숙도를 판정하고, 3-5 시간 동안 배양한 후에 0.1% hyaluronidase를 처리하여 난구세포를 제거하였다. ICSI를 시행하기 직전에 난자의 성숙 정도를 현미경하에서 판정하여 제1극체가 방출된 제2감수분열 중기의 난자만을 ICSI에 사용하였다.

6. 세포질내 정자주입술

세포질내 정자주입술을 위해 회수된 정자는 1500 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet에 0.3-0.5 ml의 배양액을 첨가, 섞은 후 배양기에서 3-5 시간 동안 배양한 후 도립현미경(Nikon, Diaphot 300)에 장착된 1쌍의 미세조작기(Narishige, NT-88)를 이용하여 ICSI를 수행하였으며, holding pipette과 injection pipette은 내경이 각각 15-20 μm 와 4-5 μm 인 것을 사용하였다. 고환 정자는 일차적으로 배양액 drop에서 운동성 정자를 회수하고, 이들을 10% polyvinylpyrrolidone(PVP) drop으로 옮겨 운동성을 감소시키고, injection pipette으로 운동성 정자에 물리적 힘을 가하여 비운동화시킨 후 난자에 주입하였다. 준비된 난자는 제1극체가 12시 또는 6시 방향에 위치하도록 holding pipette으로 고정된 후 injection pipette을 사용하여 정자를 3시 방향에서 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.

7. 배아 이식 및 임신 확인

난자 채취 후 72시간 동안 배양하여 정상적으로 발생된 4-8 세포기 배아를 확인하고, acid Tyrode's solution을 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, 임신낭(gestational sac)이 확인된 경우를 임상적 임신(clinical pregnancy)으로 정의하였으며, 현재까지 임신이 유지된 경우를 ongoing pregnancy로 정의하였다.

8. 분석 및 통계 방법

결과에 대한 통계적 분석은 χ^2 -test를 이용하였

고, p 값이 0.05 이하인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

총 154례의 TESE-ICSI를 시행하였다. 그 중 77례가 비폐쇄성 무정자증이었으며 77례가 폐쇄성 무정자증이였다. 회수된 2081개의 난자중 1719개의 난자에 ICSI를 시행하여(82.6%) 2개의 전핵이 확인된 수정된 난자는 1075개(62.5%)였다. 폐쇄성 무정자증 환자군의 수정률과 이식율은 각각 72.5%와 62.3%였다. 수정란 이식 77례 실시 후 30례에서 임신이 확인되었으며(38.9%), 그 중 임상적 임신은 22례(28.6%)였다. 비폐쇄성 무정자증 환자군의 수정률과 이식율은 52.8%와 68.9%를 나타내 수정률이 폐쇄성 무정자증 환자군과 비교해 낮은 것으로 나타났는데 이는 정상 수정에 필요한 성숙된 정자 회수율이 저조하기 때문인 것으로 사료된다. 73례의 수정란 이식을 하여(94.8%) 22례에서 임신이 확인되었으며(30.1%), 임상적 임신은 19례(26%)였다(표 1). 폐쇄성 무정자증 77례중 vas agenesis는 10례, multiple vas obstruction은 8례, epididymal obstruction은 59례였다. 그 중 MESA 시행 중 정자를 발견하지 못하거나 운동성이 없는 정자를 회수하여 TESE를 시행한 경우가 13례, ASSA 시행 후 정자를 발

Table 1. Results of TESE and ICSI in obstructive and non-obstructive azoospermia

	Total	Obstru- ctive (n=69)	Non-obst- ructive (n=62)
No. of cycles	155	77	77
Retrieved oocytes	2081	982	1072
Injected oocytes	1719(82.6)	833(84.8)	860(80.2)
2-PN embryos	1075(62.5)	604(72.5)	454(52.8) ^a
Transferred embryos	694(64.6)	376(62.3)	313(68.9)
No. of ET	150	77	73
No. of pregnancies	53(35.3)	30(38.9)	22(30.1)
No. of ongoing pregnancies	41(27.3)	22(28.6)	19(26.0)

The values in parentheses are percentages

^a p < 0.01

견하지 못하여 TESE를 시행한 경우가 2례, vaso-vasostomy 실패 후 13례, vasoepididymostomy 실패 후 19례, 전주기에서 MESA 또는 ASSA를 시행 후 임신에 실패하여 다음 주기에 TESE를 시행한 경우가 12례였다. 각 군의 수정률은 vas agenesis 76.9%, multiple vas obstruction 78.4%, epididymal obstruction 70.9%를 나타내 epididymal obstruction 환자군의 수정률이 다소 낮게 나타났으나 평균 72.5%의 수정률을 보여 전체 수정률에서는 차이가 없는 것으로 관찰되었으며 임상적 임신은 각각 2례(20%), 3례(37.5%), 17례(28.8%)를 나타냈

Table 2. Results of TESE and ICSI in obstructive azoospermia

	VA* (n=8)	MVO* (n=7)	EO* (n=54)
No. of cycles	10	8	59
Retrieved oocytes	108	119	755
Injected oocytes	91(84.3)	102(85.7)	640(84.8)
2-PN embryos	70(76.9)	80(78.4) ^a	454(70.9) ^a
Transferred embryos	51(72.9)	44(55.0)	281(61.9)
No. of ET	10	8	59
No. of pregnancies	3(30.0)	3(37.5)	24(40.7)
No. of ongoing pregnancies	2(20.0)	3(37.5)	17(28.8)

The values in parentheses are percentages
 *VA=Vas Agenesis, MVO=Multiple vas obstruction, EO=Epididymal obstruction
^a p < 0.05

다. 따라서 폐쇄성 무정자증 환자의 정자를 이용한 TESE는 미성숙 난자 회수와 같은 요인을 배제한다면 양호한 수정률과 임신율을 얻을 수 있는 것으로 사료된다(표 2). 비폐쇄성 무정자증 77례중 hypospermatogenesis는 49례, maturation arrest는 4례, Sertoli cell only syndrome은 24례였으며 Sertoli cell only syndrome 중 12례는 여러 단계의 정자세포도 발견할 수 없어서 donor sperm을 사용하였다. Hypospermatogenesis, maturation arrest와 Sertoli cell only syndrome군에서 2개의 전핵이 확인된 수정률은 각각 53.1%, 60%, 30.1%로 Sertoli cell only syndrome의 경우 다른 군에 비해 수정률이 현저하게 낮았는데 이는 미성숙 정자세포의 주입에 기인한 것으로 사료된다. 또한 이식된 수정란의 수는 Sertoli cell only syndrome의 경우 수정 관찰 당시 1개의 전핵(1 PN)만이 관찰되었으나 수정란 이식 당시 배발달이 이루어진 수정란들과 배발생이 정상적으로 이루어지지 않았더라도 수정란 이식을 시행하였다. 각 군당 임신은 hypospermatogenesis 15례(32.6%), maturation arrest 1례(25%), Sertoli cell only syndrome 2례(16.7%)였으며 임상적 임신은 각각 14례, 1례, 2례로 임신율에 있어서도 Sertoli cell only syndrome군이 낮은 것으로 관찰되었다(표 3). 각 군간 serum FSH 농도를 비교해 본 결과 비폐쇄성 무정자증 환자군과 폐쇄성 무정자증 환자군에서 각각 13.6과 19.0으로 폐쇄성 무정자증 환자군의 농도가 높았으며, 이들 각 군의 정자 회수율은 각각 98.7%와 62.3%를 나타내었다. 비폐쇄성 무정자증 환자군의 경우 serum FSH 농도는 hypospermatogenesis 16.2 mIU/ml, maturation arrest

Table 3. Results of TESE and ICSI in non-obstructive azoospermia

	HS* (n=39)	MA* (n=3)	SCO* (n=20)	Donor (n=11)
No. of cycles	49	4	12	12
Retrieved oocytes	742	46	160	124
Injected oocytes	601(80.9)	35(76.1)	133(83.1)	91(73.4)
2-PN embryos	319(53.1) ^a	21(60.0) ^b	40(30.1) ^{ab}	74(81.3)
Transferred embryos	215(67.4)	14(66.7)	48	36(48.6)
No. of ET	46	4	12	11
No. of pregnancies	15(32.6)	1(25.0)	2(16.7)	4(36.4)
No. of ongoing pregnancies	14(30.4)	1(25.0)	2(16.7)	2(18.2)

The values in parentheses are percentages
 *HS=Hypospermatogenesis, MA=Maturation arrest, SCO=Sertoli cell only syndrome
^a p < 0.05, ^b p < 0.01

Table 4. FSH concentrations and sperm retrieval result in non-obstructive azoospermia

	FSH (mIU/ml)	No. of sperm obtained(%)
Obstructive	13.6	76/77(98.7)
Non-obstructive	19.0	48/77(62.3)
HS*	16.2	43/49(87.8)
MA*	17.0	2/4(50.0)
SCO*	25.3	3/24(12.5)

The values in parentheses are percentages
 *HS=Hypospermatogenesis, MA=Maturation arrest, SCO=Sertoli cell only syndrome

Table 5. Cases of sperm retrieval and inject spermatogenic cell in non-obstructive azoospermia

Case	Sperma- tozoa	Spermatid	Sperma- toocyte	No sperm	
HS*	49	43	3	3	-
MA*	4	2	-	2	-
SCO*	24	3	2	7	12

*HS=Hypospermatogenesis, MA=Maturation arrest, SCO=Sertoli cell only syndrome

17.0 mIU/ml, Sertoli cell only syndrome 25.3 mIU/ml를 나타내 Sertoli cell only syndrome군이 hypospermatogenesis와 maturation arrest군에 비해 serum FSH 농도가 유의하게 높은 것으로 나타났다. 최근 보고에 의하면 serum FSH 농도가 정자형성기능을 절대적으로 반영하는 것은 아니라고 하였지만 본 연구에서의 정자의 회수율은 hypospermatogenesis 87.8%, maturation arrest 50%, Sertoli cell only syndrome 12.5%로 각 군에서 유의한 차가 인정되었다(표 4).

TESE-ICSI에 이용한 여러 발달 단계의 정자세포를 구분하였다. hypospermatogenesis군에서 총 49례 중 spermatozoa 43례, spermatid 3례, spermatocyte 3례가 확인되었으며, maturation arrest군은 4례 중 spermatozoa 2례, spermatocyte 2례로 두 군에서 정자세포 획득에 실패한 경우는 없었다. 그러나 Sertoli cell only syndrome군에서는 총 24례 중 spermatozoa 3례, spermatid 2례, spermatocyte 7례였으며, 그 중 정자세포 획득에 실패한 12례는 환자와 배우자의 동의하에 donor sperm을 이용하여 ICSI를 시행하였다(표 5). 비폐

Table 6. Results of spermatogenic cell injection in non-obstructive azoospermia

	Sperma- tozoa	Sperma- tid	Sperma- toocyte
Retrieved oocytes	744	56	148
Injected oocytes	600(80.6)	48(85.7)	121(81.8)
2-PN embryos	336(56.0) ^b	18(37.5) ^a	26(21.5) ^{a,b}
Transferred embryos	221(65.8)	24	32
No. of pregnancies	18(37.5)	-	-
No. of ongoing pregnancies	18(37.5)	-	-

The values in parentheses are percentages

^a p < 0.05, ^b p < 0.01

쇄성 무정자증 환자에서 Sertoli cell only syndrome 환자 중 donor sperm을 이용해 ICSI를 시행한 12례를 제외한 65례에서 각 단계별 정자세포를 총 948개의 회수된 난자중 769개의 난자에 ICSI 시행후 수정률과 이식율을 관찰하였다. Spermatozoa와 spermatid, spermatocyte의 수정률은 각각 56%, 37.5%, 21.5%를 나타내 Sertoli cell only syndrome군의 수정률이 다른군과 유의한 차이를 나타냈다. Spermatid와 spermatocyte를 주입한 경우 수정률이 spermatozoa와 비교했을 때 현저하게 낮았으나 이식 가능한 배발달이 관찰되었으며 수정 관찰 당시 1개의 전핵(1 PN)만이 관찰되었으나 수정란 이식 당시 배발달이 이루어진 수정란들은 모두 이식에 포함하였다(표 6). 그러나 이들 정자세포를 이용한 경우 임신이 이루어지지지는 않았다.

고 찰

초기 남성불임에서 부정소가 손상되었거나 양측정관형성이상으로 인한 폐쇄성 무정자증 환자를 대상으로 ICSI를 시행하여 많은 문제를 극복하였으나 해결해야 할 과제는 무정자형성이나 정자형성결함으로 인한 비폐쇄성 무정자증이다. 따라서 현재는 폐쇄성 무정자증 환자의 경우 임신에 도달하지 못하는 경우는 없다(Silber등, 1996).

Maturation arrest는 Nagpal등(1983)에 의하면 정상 크기의 고환과 초기 정자형성과정을 보이고 감수분열이나 pachytene spermatocytes에서 haploid spermatid 발달 단계까지의 세포분열 정지

를 나타낼 때로 정의하였지만, Silber등(1996)은 이러한 maturation arrest 현상은 pachytene spermatocyte level의 첫번째 감수분열 종료 직전에 나타난다고 하였다. Maturation arrest의 경우에도 Sertoli cell only syndrome이 보였으며(Silber등, 1995; Devroey등, 1995), Sertoli cell only syndrome의 상당수가 정자형성과정 발달정지를 보인 세정관이 관찰하였으며 정소의 매우 적은 부위에서 정자 생산이 관찰되는 것을 많은 연구자가 보고하였으며(Silber, 1995; Devroey등, 1995; Silber등, 1995), Tournaye등(1995)은 활력 정자와 발달 단계의 정자세포의 회수율을 각각 10.7%와 50%라 보고하였다.

Maturation arrest, Sertoli cell only syndrome, normal spermatogenesis의 수정률, 배발달율과 착상율의 관계는 Devroey등(1994)과 Silber등(1994)은 폐쇄성 무정자증 환자와 비폐쇄성 무정자증 환자 사이의 수정률에 있어서 유의한 차가 보이지 않았으나 Kahraman등(1996)은 폐쇄성 무정자증 환자의 경우 정상 정자형성과정을 거치기 때문에 수정률이 유의하게 높은 반면 비폐쇄성 무정자증 환자에서는 완전히 성숙되지 않은 미성숙 정자때문에 수정률이 낮다고 보고하였다. 본 연구에서도 폐쇄성과 비폐쇄성 무정자증 환자에서 testicular sperm을 이용하여 ICSI를 시행한 후 수정률을 관찰한 결과 두 그룹 사이에서 유의한 차이가 관찰되었다.

Serum FSH 농도, 정상 고환 용적과 정자형성의 관계는 FSH 농도가 높거나 고환 용적이 감소될 경우는 고환조직 생검시 정자를 발견할 수 없다고 알려졌지만 최근 들어 무정자증 환자에서 높은 FSH 농도가 항상 고환 기능 이상을 나타내는 것은 아니며 심한 정자형성과정 결함이 나타난 경우에도 FSH 농도는 정상으로 나타난다고 보고되고 있으며(Devroey등, 1995) 무정자증 환자의 48%에서 FSH 농도가 30 mIU/ml 이상일 경우에도 성숙 정자를 관찰하였다(Gilbaugh등, 1994). Martin-du-Pan등(1995)과 Lewin등(1996)은 정자형성과정과 serum FSH 농도와의 관계에서 상승된 serum FSH 농도가 germinal epithelium의 손상과 정소실질(testicular parenchyme)의 부분적 손상이나 제거에 대한 보상 작용을 항상 나타내는 것이 아니기 때문에 기능적 정소 이상을 언제나 진단할 수 있는 방법은 아니라고 보고하였다. Silber등(1995)은 조직학적 검사 소견상 무정자형성으

로 판정된 비폐쇄성 무정자증 환자의 조직에서 활력정자와 발달 단계의 정자세포가 발견되는 경우를 국소적 정자형성과정이 일어나기 때문이라고 하였다. 따라서 정자와 정자세포를 찾기 위한 세심한 관찰이 필요하며 일부 조직만으로는 정자형성과정을 확인하기 어렵기 때문에 더 많은 부위의 조직을 검사할 필요가 있다. 또한 needle aspiration biopsy 방법인 testicular sperm aspiration (TESA)이 보고되어 고환절개 조직검사에 대체할 수 있는 방법으로 시도되었지만(Craft와 Tsirigotis, 1995; Craft등, 1995; Tsirigotis등, 1995) 정자형성의 전과정을 파악하기에는 부적합할 수 있다(Mallidis와 Baker, 1994; Gottschalk-Sabag와 Weiss, 1995; Kessar와 Wasserman, 1995). 따라서 정상적인 정자형성과정을 가진 환자에서는 needle biopsy를 적용해도 무난하나 비폐쇄성 무정자증과 정자형성과정에 이상이 있는 환자의 경우에는 고환절개 생검방법이 고환내 정자와 발달 단계의 정자세포를 획득하는데 더 적절한 방법이라 하겠다.

ICSI와 round spermatid injection(ROSI) technique이 폐쇄성 무정자증 환자의 치료에 도입, 개발되면서 임신 가능성이 보고되어(Edwards등, 1994; Ogura등, 1994; Fishel등, 1995; Nagy와 Liu, 1995; Silber등, 1995; Tournayes등, 1995), ICSI와 round spermatid nucleus injection(ROSN)이 불임 시술에서 확립만 된다면 비폐쇄성 무정자증 환자 특히 심각한 초기 정자형성기능이상 환자에서도 임신에 이를 수 있을 것이다(Chen등, 1996).

또한 TESE후 고환내 정자세포를 동결-융해한 후 수정률과 임신율이 보고되었으나(Fisher등, 1996; Gil-Salom등, 1996; Hovatta등, 1996; Verheyen등, 1997) 그 결과는 저조하였는데 이는 회수된 고환정자의 수와 운동성이 저조하고 정자세포의 미성숙때문이라 하였으며 본 연구에서도 1례에서 TESE 후 고환내 정자를 동결-융해 후 임신에 성공하였으나 임상적 임신에 도달하지는 못하였다. 또한 3례에서 고환내 정자를 수정 후 수정란을 동결 보존시킨 후 다음 주기에서 융해, 이식하여 임신에 성공하였다. 그러므로, 고환내 정자의 동결 보존은 정자 회수장소가 고환이 유일한 환자에서 반복적, 다중적 TESE로 인한 부담을 줄일 수 있으며 고환내 정자의 수정 기전을 관찰할 수 있는 또 다른 방법이므로 이에 대한 연구가 더 진행되어야 하겠다.

결 론

부고환에서 정자를 채취할 수 없거나 부고환에서 정자는 채취되었으나 활동성이 없어 수정에 부적합한 것으로 판단된 경우 등으로 인한 폐쇄성 무정자증 환자와 조직검사 소견상 무정자형성이나 정자발육부전으로 인한 비폐쇄성 무정자증 환자에서 고환조직정자채취술과 세포질내정자주입술(TESE-ICSI)을 시행하여 수정률과 임신율을 조사하였으며 그 결과는 아래와 같다.

1. 총 154례의 TESE-ICSI를 시행하였으며 77례가 비폐쇄성 무정자증이었으며 77례가 폐쇄성 무정자증이였다. 폐쇄성 무정자증 환자군의 수정률과 이식율은 각각 72.5%와 62.3%였으며 임상적 임신은 28.6%였다. 비폐쇄성 무정자증 환자군의 수정률과 이식율은 52.8%와 68.9%를 나타냈으며 임상적 임신은 26%였다.

2. 폐쇄성 무정자증 77례중 vas agenesis는 10례, multiple vas obstruction은 8례, epididymal obstruction은 59례였다. 각 군의 수정률은 vas agenesis 76.9%, multiple vas obstruction 78.4%, epididymal obstruction 70.9%로 평균 72.5%의 수정률을 보였으며 임상적 임신은 각각 2례(20%), 3례(37.5%), 17례(28.8%)를 나타냈다.

3. 비폐쇄성 무정자증 77례중 hypospermatogenesis는 49례, maturation arrest는 4례, Sertoli cell only syndrome은 24례였다. Hypospermatogenesis, maturation arrest와 Sertoli cell only syndrome군의 수정률은 각각 53.1%, 60%, 30.1%였다. 각 군당 임신은 hypospermatogenesis 15례(32.6%), maturation arrest 1례(25%), Sertoli cell only syndrome 2례(16.7%)였으며 임상적 임신은 각각 14례, 1례, 2례를 나타냈다.

4. 각 군간 serum FSH 농도는 비폐쇄성 무정자증 환자군과 폐쇄성 무정자증 환자군에서 각각 13.6과 19.0으로 폐쇄성 무정자증 환자군의 농도가 높았으며, 이들 각 군의 정자 회수율은 각각 98.7%와 62.3%를 나타냈다. 비폐쇄성 무정자증 환자군의 경우 serum FSH 농도는 hypospermatogenesis 16.2 mIU/ml, maturation arrest 17.0 mIU/ml, Sertoli cell only syndrome 25.3 mIU/ml를 나타냈으며 정자의 회수율은 hypospermatogenesis 87.8%, maturation arrest 50%, Sertoli cell only syndrome 12.5%였다.

5. TESE-ICSI에 이용한 발달 단계의 정자세포를 구분하면 hypospermatogenesis군에서 총 49례 중 spermatozoa 43례, spermatid 3례, spermatocyte 3례가 확인되었으며, maturation arrest군은 4례 중 spermatozoa 2례, spermatocyte 2례였으며 Sertoli cell only syndrome군에서는 총 24례 중 spermatozoa 3례, spermatid 2례, spermatocyte 7례였으며, 그 중 12례는 정자세포 획득에 실패하여 donor sperm을 이용하였다.

6. 각 단계별 정자세포를 ICSI 시행후 수정률과 이식율을 관찰하였다. Spermatozoa와 spermatid, spermatocyte의 수정률은 각각 56%, 37.5%, 21.5%를 나타내 Sertoli cell only syndrome군의 수정률이 다른 군보다 낮았으며 수정란 이식 당시 배발달이 이루어진 수정란들은 모두 이식에 포함하였다.

이상의 결과에서 고환조직 정자에 TESE-ICSI를 이용하면 정자 회수율과 수정률, 임신율은 폐쇄성 무정자증 환자와 비폐쇄성 무정자증 환자의 차이가 있었지만 폐쇄성 무정자증 환자뿐만 아니라 비폐쇄성 무정자증 환자에서도 정자가 회수되며 미성숙 정자라 할지라도 정상적인 수정과 배발생에 도달할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서 비폐쇄성 무정자증 환자에서 회수된 미성숙 정자세포의 분리, 배양 및 이식술이 확립된다면 정자형성기능이상 환자의 임신을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

- Bourne H, Watkins W, Speirs A, Baker HWG: Pregnancies after intracytoplasmic injection of sperm collected by fine needle biopsy of the testis. *Fertil Steril* 1995, 64, 433-436.
- Chen CS, Chu SH, Lai YM, Wang ML, Chan PR: Reconsideration of testicular biopsy and follicle stimulating hormone measurement in the era of intracytoplasmic sperm injection for non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1996, 11, 2176-2179.
- Clermont Y: The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 1963, 112, 35-51.
- Craft I, Tsigotis M: Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1995, 10, 1623-1627.

- Craft I, Khalifa Y, Boulos A, Pelekanos M, Foster C, Tsirigotis M: Factors influencing the outcome of in vitro fertilization with percutaneous aspirated epididymal spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection in azoospermic men. *Hum Reprod* 1995, 10, 1791-1794.
- Craft I, Tsirigotis M, Shrivastav P: Value of percutaneous epididymal sperm aspiration? *Fertil Steril* 1995, 63, 208-209.
- 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, 639-641.
- Devroey P, Liu J, Nagy Z, Goossens A, Tournaye H, Camus M, Van Steirteghem A, Silber S: Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995, 10, 1457-1460.
- Edwards RG, Tarin JJ, Dean N, Hirsch A, Tan SL: Are spermatid injections into human oocytes now mandatory? *Hum Reprod* 1994, 9, 2217-2219.
- Fishel SB, Thornton S: The use of assisted reproductive technology(ART) for achieving conception in male infertility. *Br J Urol* 1995, 75(Suppl. 1), 50-56.
- Foresta C, Varotto A, Scandellari C: Assessment of testicular cytology by fine needle aspiration as a diagnostic parameter in the evaluation of the azoospermic subject. *Fertil Steril* 1992, 57, 858-865.
- Gilbaugh JH, Patil VR, Turek PJ, Lipshultz LI: Testis biopsy findings in azoospermic patients with markedly elevated serum FSH levels. Presented at the 50th Annual Meeting of the American Fertility Society, San Antonio, 5-10 November, p. S63.
- Gottschalk-Sabag S, Weiss DB: Is one testicular specimen sufficient for quantitative evaluation of spermatogenesis. *Fertil Steril* 1995, 64, 399-402.
- 전진현, 김정옥, 박용석, 이호준, 서주태, 이유식, 손일표, 전종영: 고환조직 정자채취술 (TESE) 의 정자 상태에 따른 세포질내 정자주입술 (ICSI)의 수정률과 임신율. 대한불임 학회잡지 1995, 22, 149-153.
- Kahraman S, Ozgur S, Alatas C, Aksoy S, Tasdemir M, Nuhoglu A, Tasdemir I, Balaban B, Biberoglu K, Schoysman R, Nijs M, Vanderzwalmen P: Fertility with testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod* 1996, 11, 756-760.
- Kessaris DN, Wasserman P: Histopathological and cytopathological correlations of percutaneous testis biopsy and open testis biopsy in infertile men. *J Uro* 1995, 153, 1151-1155.
- 김묘경, 김진희, 이상민, 정혜숙, 이훈택, 정길생: 생쥐 정자세포의 분리와 체외배양에 관한 연구. 한국가축번식학회지 1996, 20, 43-52.
- 이유식, 고영수, 서주태, 박용석, 전진현, 이호준, 손일표, 홍재엽: 고환조직에서 추출한 정자로 난자 세포질내 정자주입술을 시행한 후 수정률과 임신율. 대한비뇨기과학회지 1995, 36, 949-955.
- Mallidis C, Baker HWG: Fine needle tissue aspiration biopsy of the testis. *Fertil Steril* 1994, 61, 367-375.
- Martin-du-Pan RC, Bischof P: Increased follicle stimulating hormone in infertile men: is increased plasma FSH always due to damaged germinal epithelium? *Hum Reprod* 1995, 10, 1940-1944.
- Nagpal BL, Manjari M, Kapoor K, Dhaliwal US: Testicle biopsies in cases of male infertility: a retrospective study. *J Indian Med Assoc* 1993, 91, 171-174.
- Nagy Z, Liu J: 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.
- Ogura A, Matsuda J, Yanagimachi R: Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91, 7460-7462.
- 박용석, 전진현, 김정옥, 이호준, 서주태, 이유식, 홍재엽, 손일표, 전종영: 미세수술적 부고학

- 회잡지 1995, 22, 267-272.
- Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, Van Roosendaal E, Schoysman D: Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. *Lancet* 1993, 342, 1237.
- Silber SJ, Nagy Z, Liu J, Godoy H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Conventional IVF versus ICSI for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod* 1994, 9, 1705-1709.
- Silber SJ, Van Steirteghem AC, Devroey P: Sertoli cell only revisited. *Hum Reprod* 1995, 10, 1031-1032.
- Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P: High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with sperm obtained from testicle 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.
- 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.
- Tournaye H, Nagy Z, Devroey P, Lissens W, Liu J, Van Steirteghem A: 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.
- Tournaye H, Camus M, Goossens A: Recent concepts in the management of infertility because of non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995, 10(Supl.1), 115-119.
- World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.