

비폐쇄성 무정자증 환자에서 난자내 원형정세포 주입에 의한 임신 및 분만 1례

영동제일병원 불임의학연구소

조정현 · 심현남 · 서주태 · 이동률 · 윤현수 · 백혜란 · 노성일

A Case of Pregnancy and Delivery by Round Spermatic Injection into Oocytes in Nonobstructive Azoospermia Patient

J.H. Cho, H.N. Shim, J.T. Seo, D.R. Lee, H.S. Yoon, H.R. Paik and S.I. Roh

Infertility Research Center, Jeil Women's Hospital

=Abstract=

Normal fertilization and pregnancy by round spermatid was achieved from nonobstructive azoospermia patient to be believed untreatable. Therefore, it is suggested that application of round spermatid in human ART program seems to be new treatment of male infertility. Also, it will be needed further research for evaluated fertilization mechanism by round spermatid injection.

서 론

1988년 Lanzendorf 등에 의해 인간의 불임치료를 도입된 난자의 세포질내 정자직접주입술 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)은 1992년 Palermo 등에 의해 임신성공이 보고되었고, 최근에는 남성요인(Van Steirteghem et al., 1993 a,b) 뿐만 아니라 여러 원인불명의 불임치료를 적용되고 있다(이동률 등 1996). ICSI에 의한 수정은 정자의 수나 운동성 부족, 그리고 형태적 기형에도 관계없이 정상적인 수정이 가능한 것으로 보고되고 있다(Van Steirteghem et al., 1993a).

ICSI 방법은 성숙과정에 있는 부고환내 정자나, 고환에서 채취된 정자라도 정상적인 수정이 가능하므로 선천적 또는 후천적인 요인에 의해 정관이 없거나 막혀있는 폐쇄성 무정자증 환자에서도 임신을 가능하게 한다(Silber et al., 1994; Devroey et al., 1995). 한편 남성불임환자의 약 15%를 차지하는 비폐쇄성 무정자증 환자는 여러 원인에 의해 고환 내에서 정원세포(spermatogonia)

로부터의 감수분열과정이나 정자로의 분화 과정이 정지되어 정자를 형성하지 못한다. 1996년 Silber 등은 이러한 환자의 고환에서도 국부적으로 정자가 형성되기 때문에 multiple testicular sperm extraction(multiple-TESE) 방법으로 약 50%에서 정자를 채취할 수 있었고 이를 이용하여 정상적인 수정과 임신을 얻을 수 있는 것으로 보고하였다. 그러나 이 방법은 장시간의 수술시간과 많은 고환조직의 소실이 유발되며, 환자의 고환 상태에 따라 정자의 채취 성공률은 달라질 수 있는데, 본 연구팀의 결과에 의하면 약 20-30%의 환자에서 정자를 채취할 수 있었다(unpublish data). 또한 이 과정에서 채취된 정자의 대부분은 형태나 운동성이 정상적인 정자에 비해 떨어진다.

생쥐와 햄스터의 난자에 원형정세포(round spermatid)를 주입하여 정상적인 수정과 출산이 보고되었으며(Ogura et al., 1993; Kimura & Yanagimachi, 1995a), 1996년 Sofikitis 등에 의해 토끼에서도 수정과 출산이 보고되었다. 또한 사람에게서 원형정세포에서 정자로의 분화직전의 상

태인 elongated 정세포(Fishel et al, 1995)와, 정액 내의 원형정세포(Tesarik et al., 1995)를 이용하여 정상적인 수정과 임신, 출산에 성공하였고, 이로써 정자의 분화과정이 원형정세포에서 정지된 남성불임환자에서도 임신이 가능하게 되었다.

본 연구는 고환내 정자의 형성과정이 원형정세포에서 정지된 환자의 생검된 조직에서 채취한 원형정세포의 난자내 주입(round spermatid injection, ROSI)을 통해 정상적인 수정과 임신, 그리고 분만사례 1례를 보고하고자 한다.

증 례

환자: 양 OO, 29세

출산력 및 월경력: O-O-O-O, 초경은 16세이고, 주기는 28일형으로 규칙적이며 지속기간은 3일이고, 양은 중등도이고 월경통은 없었다.

가족력과 과거력: 32세의 남편은 다른 병원에서 시행한 정액검사상 무정자증을 보였고 호르몬 수치는 정상치였다. 고환조직검사상 hypospermatogenesis를 보였으며 불임치료를 위해 본원으로 전원 되었다. 환자부부는 불임기간이 1년 6개월이었다.

주소: 남편 정액검사상 무정자증을 보였으며, 환자 및 남편 모두 의학적 소견상 특이사항은 없었다. 남편의 무정자증에 의한 남성불임으로 진단되었다.

불임치료

1. 난자의 준비

환자의 최종월경일은 1995년 12월 28일이었으며 long protocol에 의한 GnRH-agonist/ FSH/hMG 과배란 유도를 시행하여 hCG주사 35시간 후에 질식초음파를 이용하여 19개의 난자를 채취하였다. 채취된 난자를 0.1% hyaluronidase(Sigma Chemical Co. St. Louis, USA)가 포함된 human tubal fluid medium(HTF, Quinn et al., 1985)에 3분간 처리하여 난구복합체를 제거한 후 성숙여부를 확인하고, 0.5% human serum albumin(HSA, Sigma)이 포함된 HTF에서 ROSI를 시행할때까지 배양하였다.

2. 원형정세포의 채취

국부마취후 남편의 고환으로부터 채취된 조각을 phosphate buffer saline에서 세척하여 혈액과 불순물을 제거한 후, 0.5% HSA가 함유된 HTF로

옮겨 각각의 세정관을 분리하였다. 분리된 세정관은 forcep을 이용한 squeeze out 방법으로 세정관내 spermatogenic cell을 채취하였다. 채취된 세포들을 현미경(x400)으로 관찰한 결과 정자가 존재하지 않았으며, 원형정세포를 이용한 수정을 결정하고 이를 위해 50% human follicular fluid가 함유된 배양액으로 옮겨 ROSI를 시행할 때까지 배양하였다.

3. ROSI 시행

미세조작은 독립현미경(Diaphot 300, Nikon, Japan)에 장착된 미세조작기(NT-88, Narishige, Japan)를 사용하였다. ROSI에 사용된 holding pipette은 microforge(MF-9, Narishige, Japan)를 이용하여 외경 100-120로 내경은 15-20 μ m로 만들어 사용하였다. Injection pipette은 microgrinder(EG-6, Narishige, Japan)로 외경이 10-12 μ m로 같고, microforge로 'spike'를 만들어 사용하였다. Injection pipette을 이용하여 원형정세포를 흡입하여 그들의 원형질막을 터뜨린 후 난자에 주입하였다. 원형정세포의 주입이 끝난 난자는 10% synthetic serum substitute(Irvine Scientific, USA)를 첨가한 HTF로 옮겨 배양하였다.

4. 수정란의 배양 및 이식

총 19개의 채취된 난자중 12개가 성숙되어 ROSI를 시행하였다. ROSI 실시 후 16시간째 전핵을 관찰하여 수정여부를 확인하였다. ROSI결과 5개에서 1pronucleus(PN)이, 6개에서 2PN이, 그리고 1개에서 3PN이 관찰되었으며, 이중 2PN이 관찰된 6개만을 48시간 배양하여 배아발달 상태가 양호한 5개의 배아를 자궁내에 이식하였다.

5. 임신확인 및 분만

자궁에 이식 후 10일째 혈청내 β -hCG양이 227 mIU/ml로서 양성을 나타내었고, 1996년 2월 6일 질식초음파로 2개의 태상과 정상심박동의 태아를 확인할 수 있었다. 1996년 9월 20일 제왕절개술로 2.5Kg, 2.8Kg의 건강한 여아 쌍생아를 분만하였다.

고 찰

사춘기에 이르러 고환내의 정자 형성과정은 시작된다. 고환내의 정원세포는 stem cell로서 체세포 분열방식으로 증식이 이루어지고, 그 중 일부는 분화하여 제1정모세포(primary spermatocyte)를

형성한 후 감수분열을 시작하게 된다. DNA 합성에 의해 제1정모세포는 2N4C의 핵상을 가지며 1차 감수분열을 통해 1N2C의 핵상을 가진 제2정모세포(secondary spermatocyte)로 분열을 하게 된다. 제2정모세포는 2차 감수분열을 통해 1N1C의 핵상을 가지는 원형정세포로 분화된 후, 정자완성과정(spermiogenesis)을 거쳐 정자를 형성하게 된다. 고환에서 형성된 정자는 부고환을 통과하면서 성숙이 일어나고, 여성의 생식수관계나 배양액에 노출되어 그들의 원형질막의 생화학적 구조의 변화를 통해 수정능력을 획득하게 된다. 그러나 ICSI 방법으로 부고환이나 고환내의 정자를 수정시켰을 때 일반적인 체외수정이나 사정된 정자를 이용한 ICSI와 비슷한 수정률과 임신률이 보고되어(Silber et al., 1994; Devroey et al., 1995), 부고환내 정자의 성숙과정은 수정 이후의 배아 발생에는 영향을 주지 않는 것으로 알려지고 있다. 또한 정자로 분화되기 전 단계인 원형정세포와 제2정모세포에 의한 수정성공과 산자의 획득이 생쥐와 햄스터 그리고 토끼에서 보고된 바 있다(Ogura et al, 1993; Kimura & Yanagimachi, 1995a,b; Sofikitis et al., 1996). 이는 수정 이후 배아발생에 영향을 줄 것이라고 알려진 gamete의 genomic imprinting이 적어도 제2정모세포 이전의 시기에 완료되어지는 것으로 여겨지며(Kimura & Yanagimach, 1995b), 이시기 이후의 생식세포의 이용 가능성이 제시되었다.

남성요인 불임의 약 15%를 차지하는 비폐쇄성 무정자증은 국부적으로 정자가 형성되는 hypospermatogenesis, 정자의 형성과정이 특정 시점에서 멈추어진 maturation arrest, 고환 세정관내에 생식세포가 존재하지 않는 Sertoli cell only syndrome으로 구분할 수 있다. 그런데 남성불임 환자는 일반적으로 혈액내 호르몬 검사와 조직검사를 통해 진단을 시행한다. 그러나 호르몬의 수치와는 별 개연성이 없고, 고환의 생검은 조직의 일부분에서 시행하므로 전체적으로 정확한 진단이 어렵다. Silber 등(1996)에 의하면 여러 번의 조직생검을 통해 이들 환자의 약 50%에서 정자를 관찰할 수 있었고 이를 이용하여 수정과 임신을 얻었다고 보고하였으나 본 연구진은 약 20-30%의 환자에서 정자를 확인할 수 있었다. 이러한 경우 채취된 정자의 상태는 대부분 불량하였고, 수정과 임신이 가능하였으나 장시간의 수술 시간과 고환조직의 손실을 유발할 수 있다. 고환

의 조직병리학적 소견상 hypospermatogenesis 혹은 maturation arrest로 진단 받은 환자의 대부분에서 정액과 고환조직내에서 원형정세포를 관찰할 수 있었고, Sertoli cell only syndrome으로 진단 받은 환자의 일부에서 원형정세포를 관찰할 수 있었다. 실험동물에서 보고된 바와 같이 사람에서도 정액내의 원형정세포를 이용한 수정과 임신이 가능한 것으로 보고되고 있으며(Tesarik et al., 1995), 본 연구진에서도 비폐쇄성 무정자증으로 진단 받은 환자의 고환조직내에서 원형정세포를 분리하여 그들의 세포막을 터뜨린 후 난자의 세포질 내로 주입하였고 성숙된 난자 12개중 5개가 1PN, 6개가 2PN, 1개가 3PN을 보였다. 이중 2PN에서 발생이 진행된 배아를 자궁에 이식하여 임신에 성공하였으며 여아 쌍생아의 출산을 얻을 수 있었다.

생쥐의 원형정세포는 난자 내에 주입되어 난자를 활성화할 수 있는 능력이 없으므로 생쥐의 난자 내에 원형정세포 주입을 통한 수정시 난자를 활성화할 수 있는 화학적이나 전기적인 자극이 필요하다고 제안되었다(Kimura & Yanagimachi, 1995a). 이와는 달리 사람의 원형정세포는 별도의 외부적인 자극이 없이도 난자를 수정시킬 수 있어 정세포 내부에 난자를 활성화시킬 수 있는 물질이 있을 것으로 추측되고 있다(Fishel et al., 1996). 그러나 ROSI는 ICSI에 비하여 저조한 수정률과 임신률을 얻고 있다. 이는 원형정세포가 정자와는 달리 세포주기가 G2 phase로 난자의 M stage와 다르며 이들의 불일치에 의해 수정이 실패하거나 비정상적인 수정이 많이 유발되는 것으로 추론되고 있다. 그러나 생쥐 고환내 원형정세포를 이용한 Kimura and Yanagimachi(1995)에 의한 연구와 인간에서 Tesarik 등(1995, 1996)의 연구는 세포주기의 불일치가 수정과 발생에 큰 영향을 주지 않는다고 제안한다(Fishel et al., 1996). 이외에 성숙된 난자에는 maturation promoting factor(MPF)가 많이 존재하여 protamine과 결합되어 보호받는 정자의 chromatin과 달리, 주입된 원형정세포의 핵막을 붕괴시키고, 그들의 chromatin을 premature chromosome condensation시켜 수정과 발생을 멈추게 하는 것으로 여겨지며 이 MPF를 줄이기 위해 ROSI의 시행되기 이전에 인위적인 활성화가 제안되고 있다. 그리고 오직 activation되어 metaphase와 telophase사이에 있는 난자가 정자의 핵막을 붕괴시킬 수 있고

(Szollosi et al., 1988), 정자의 핵이 세포막에 둘러싸여 있을 경우 핵막의 붕괴가 일어나지 않는다고 보고되고 있다(Ogura et al 1993). 따라서 ROSI 시행시 원형질막이 그대로 인체로 난자내에 주입되었을때 수정이 일어나지 않으므로 세포막의 터뜨림이 필요할 것이다.

비폐쇄성 무정자증의 원인은 대부분 원인미상이며, 최근 약 15%가 Y염색체상에 미세결실을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Reijo et al., 1995). 이러한 미세결실은 비폐쇄성 무정자증환자에게만 존재하는 것이 아니라 severe oligoasthenoteratozoospermia(OATS) 환자에게서도 발견되며(윤현수등, 1996), 따라서 ROSI나 ICSI를 통해 임신하여 남아를 출산하였을 때 남성불임은 후손에게 전달될 수 있다. 따라서 이를 극복하기 위해서는 분자유전학적인 진단과 착상전 유전진단이 필요할 것이다. 또한 ROSI에 의한 수정과정은 아직도 그 기작이 알려져 있지 않으므로 이를 밝히는 연구가 필요하며, 저조한 수정률과 임신률을 극복하기 위한 많은 연구가 필요할 것이다.

결 론

비폐쇄성 무정자증환자에서 정자로 분화되기 전 단계인 원형정세포가 존재한다면 이를 이용하여 정상적인 수정과 임신이 가능하여 남성불임 치료의 폭이 넓어졌다. 또한 원형정세포에 의한 수정기작이 정확히 밝혀지지 않았으므로 이에 대한 연구가 필요하다.

인 용 문 헌

- Devroey P, Liu Z, 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.
- Fishel S, Green S, Bishop M, Thornton S, Hunter A, Fleming S, Al-Hassen S: Pregnancy after intracytoplasmic injection of spermatid. *Lancet* 1995, 345, 1641-1642.
- Fishel S, Aslam I, Tesarik J: Spermatid conception: a stage too early, or a time too soon? *Hum Reprod* 1996, 11, 1371-1375.
- Kimura Y, Yanagimachi: Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development* 1995a, 121, 2397-2405.
- Kimura Y, Yanagimachi: Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biol Reprod* 1995b, 53, 855-862.
- Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, Slusser J, Hodgen GD, Rosenwaks Z: A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril* 1988, 49, 835-842.
- 이동률, 윤현수, 백혜란, 심현남, 전종식, 이승현, 조정현, 노성일: Polycystic ovarian syndrome 및 severe endometriosis를 가진 불임환자에서 세포질내 정자주입술에 의한 수정률과 임신률의 증진. *대한불임학회잡지* 1996, 23, 137-143.
- Ogura A, Yanagimachi R, Usui N: Behavior of hamster and mouse round spermatid nuclei incorporated into mature oocytes by electrofusion. *Zygote* 1993, 1, 1-8.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992, 340, 17-18.
- Quinn P, Kerin JF, Warness GM: Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 1985, 44, 493-498.
- Reijo R, Lee T-Y, Salo P, Alagappan R, et al.: Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Natl Gen* 1995, 10, 383-393.
- Silber SJ, Nagy ZP, Liu Z, Godoy H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod* 1994, 9, 1705-1709.
- Silber SJ, Van Steirteghem AC, Nagy Z, Liu Z, 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.
- Sofikitis NV, Toda T, Miyagawa I, Zavos P, Pasyianos P, Mastelou E: Beneficial effects of electrical stimulation before round spermatid nuclei injections into rabbit oocytes on fertilization and subsequent embryonic development. *Fertil Steril*, 1996, 66,176-185.
- Szollosi D, Czolowska R, Szollosi M, Tarkowski AK: Remodelling of mouse thymocyte nuclei depends on the time of their transfer into activated, homologous oocytes. *J Cell Sci* 1988, 91, 603-613.
- Tesarik J, Mendoza C, Testart J: Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *New Engl J Med* 1995, 333, 525.
- Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenwillen C, Tournaye H, Derde MP, Van Assche E, Devroey P: High success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. A report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod* 1993a, 8, 1055-1060.
- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu Z, Staessen C, Smitz J, Wisanto A, Devroey P: High fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993b, 8, 1061-1066.
- 윤현수, 이정현, 서주태, 김해정, 이동률, 전종식, 조정현, 김문규, 이무상, 노성일: 한국인 남성 불임환자에서 Y염색체내 미세결실의 분자유전학적 분석. *대한불임학회잡지* 1996(투고중).