# 원형정자세포의 주입에 의한 임신과 분만 1례

하나병원 불임연구실, *대구대학교 공과대학, **건국대학교 축산대학
이상민, 정지영, 한용태, 박해택, 박흠대*, 정길생**, 이기영

# Pregnancy and Delivery by Round Spermatid Injection into Oocytes in Human

**S.M. Lee, J.Y. Jung, Y.T. Han, H.T. Park, H.D. Park*, K.S. Chung** and K.Y. Lee**

*Infertility Research Center, Hana Women's Hospital, *College of Engineering, Daegu University, **College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University*

**Abstract**

We demonstrated that the normal pregnancy and delivery by round spermatid injection(ROSI) into oocytes was achieved from nonobstructive azoospermia patient. In this case, the normal fertilization rate was 50%. All of the two-pronuclear stage embryos cleaved and were transferred to the patient's uterus. A singleton pregnancy was achieved and resulted in the birth of normal female infant. This result show that intracytoplasmic injection of round spermatid seems to be new treatment of nonobstructive azoospermia male infertility. Further research is needed to evaluate the required culture conditions to induce progression of the round spermatid into a more elongated stage.

## 서 론

미세보조 수정기술로서는 투명대의 일부를 절개하는 partial zona dissection(PZD), 난자의 위란강내에 정자를 주입하는 subzonal sperm insertion(SUZI), 그리고 정자를 난자의 세포질 내에 직접 주입하는 intracytoplasmic sperm injection (ICSI)이 도입되어 체외수정시술에서 임신의 성공율을 향상시켰다. 특히 그중에서도 ICSI 방법은 1992년 Palermo등이 처음으로 인간에 적용하여 불임치료에 응용한 이래, 많은 연구자가 ICSI의 임상적 유용성과 우월성을 입증하였으며, 앞으로도 이 방법이 인간의 불임치료에 대표적인 보조 생식술로서 그 기대를 모으고 있다. 또한 ICSI와 부고환 정자 흡입술(microsurgical epididymal sperm aspiration, MESA)및 고환조직 정자채취술 (testicular sperm extraction, TESE)을 각각 병행하여 높은 임신 성공률을 보고하였다(Van Steirteghem 등, 1993; Silber 등, 1995a; Devroey 등, 1995). 실제 남성불임중 고환의 정자형성기능은 정상적이지만 폐쇄성 무정자증 환자의 치료에 이러한 MESA-ICSI, TESE-ICSI방법이 주로 이용되고 있다. 한편 인간에서의 고환조직은 내분비기능과 정자형성의 각 발생단계별 유전자 발현에 의하여 조절되어 형성되는 정자는 매우

복잡한 분화과정을 거쳐 완성되는데 정조세포(spermatogonium)로부터 성숙정자로 분화하는 과정에서 여러 가지 요인으로 인하여 장애를 나타내는 비폐쇄성 무정자증환자의 경우는 multiple-TESE(Silber 등, 1996b)나 round spermatid injection(ROSI; Tesarik과 Mendoza, 1996a)방법등이 이용되고 있다.

정자 발생과정중에서 정자로의 분화직전인 elongated spermatid를 이용하여 정상적인 수정과 분만에 성공하였지만 (Fishel 등, 1997; Vanderzwalmen 등, 1997), 이보다 전단계인 원형정자세포를 이용하여 인간 (Tesarik 등, 1996b; 조정현 등, 1996; Vanderzwalmen 등, 1997)을 비롯한 생쥐 (Ogura 등, 1994; Kimura 와 Yanagimach, 1995b), 토끼(Sofikitis 등, 1996)등에서도 정상적인 수정과 산자를 생산하였다. 나아가서 생쥐에서 동결-융해한 원형정자세포를 미세주입하여 산자생산에 성공하였으며(Ogura 등, 1996), 제2정모세포 (secondary spermatocyte)를 주입하여 산자까지 생산을 보고하였다 (Kimura and Yanagimach, 1995a). 또한 Goto등은 소의 제2정모세포를 체외배양하여 생산된 원형정자 세포를 주입하여 배반포 단계까지의 배발생을 보고하였다. 이와같이 정자 형성과정중 원형정자세포에서 정지된 경우에도 정상적인 임신이 가능하다.

따라서 본 연구에서는 정자형성과정이 원형정자세포에서 정지된 비폐쇄성 무정자증 환자의 고환조직으로부터 이들 세포를 추출하여 미수정란에 주입함으로써 정상적인 수정과 임신, 그리고 분만에 성공한 사례를 보고하고자 한다.

## 증 례

환자:조 ○○, 32세

출산력 및 월경력: ○-○-○-○-○

초경은 14세이고, 주기는 30일형으로 규칙적이며 지속기간은 5일이고, 량은 보통이며 월경통은 없었다.

가족력과 과거력: 37세의 남편은 다른 병원에서 시행한 정액검사상 무정자증으로 확인되었으며, 호르몬 수치는 정상이었으나 고환조직검사상 severe hypospermatogenesis로 확인되었기 때문에 불임치료를 위해 본원으로 전원되었다. 환자부부의 불임기간은 58개월이었다.

주소: 남편은 정액검사상 무정자증으로서, 결핵으로 인한 고환절제와 고환염으로 인한 정자형성과정에 장애가 있는 것으로 판명되었다. 그러나 부인의 경우는 의학적 소견상 특이사항은 없었다.

## 방 법

### 1. 과배란 유도 및 난자의 준비

대상환자에서 GnRH-agonist(Busererin, Suprefact, Hoechst, Germany)와 FSH/hMG를 병용한 황체기 장기투여법(luteal phase long protocol)으로 과배란 유도를 시행하였으며, 성숙된 난포난의 채취는 hCG 주사 후 36시간째 질식초음파를 이용하여 실시하였다. 채취된 난자는 0.1% hyaluronidase(Sigma, St. Louis, USA)를 처리하여 난구세포를 제거한 후 난자의 성숙도를 판정하여 제 1극체가 방출된 제2감수분열 중기의 난자만 사용하였다.

### 2. 원형정자세포의 채취

국부마취후 고환으로부터 절개된 조직을 10% hFF(human follicular fluid) 함유 Ham's F-10 배양액이 담긴 petri dish로 옮겨 각각의 세정관을 분리, 세절한 후 pipetting으로써 세정관내 spermatogenic 세포를 추출하였다. 이 세포부유액으로부터 정자의 존재 여부를 확인하였다.

### 3. 세포질내 원형정자세포 주입

ROSI는 성숙한 정자를 이용하여 미세주입하는 통상의 ICSI 방법에 준하여 실시하였다. 원형정자세포를 주입하기전에 전처리 과정으로 내경이 약 2μm의 유리피펫으로 난자의 세포질을 심하게 반복 흡입하였다. 고환조직으로부터 추출한 원형정자세포를 injection 피펫으로 흡입하면서 그 막을 터뜨리고 난자에 최대한 물리적 손상을 줄이면서 주입을 완료하였다(Fig 1). 원형정자세포 주입 30분 후 난자를 10μM Ca-ionophore A23187(Sigma, St. Louis, USA) 함유 배양액에서 약 10분간 처리하였다. 그리고 난자를 신선한 배양액으로 세척한 후 10% hFF 함유 배양액으로 옮겨 37℃, 5% $CO_2$ 배양기에서 배양하였다. 수정 여부는 배양 15-18시간째에 제2극체 방출과 전핵형성 유무로 확인하였다.

### 4. 수정란의 이식 및 임신 확인

전핵이 확인된 수정란을 50-52시간동안 체외배양하여 환자의 자궁에 이식하였다. 수정란 이식 후 10일째에 혈청내 β-hCG농도가 10mIU/ml 이상이고, 추적검사에서 혈중 β-hCG의 상승을 나타내며, 임신 제5-6주경에 실시한 질식초음파에서 태낭(gestational sac)과 태아의 심박동이 확인된 경우를 임상적 임신으로 정의하였다. 또한 생화학적 임신(biochemical pregnancy)은 혈중 β-hCG 농도가 상승한 후 감소를 보이는 경우로서 이것은 임상적 임신에서 제외하였다.

Fig. 1. Round spermatid (arrow) injection into human oocyte.

Insertion of an injection pipette into an oocyte and the aspiration of a small amount of oocyte cytoplasm into an injection pipette to break cytoplasmic membrane. Both spermatid cytoplasm and nucleus were injected.

## 결 과

채취한 총 10개의 난자중 8개의 성숙난자에 원형정자세포를 주입한 결과 1 pronucleus(PN)가 1개, 2PN이 4개, 3PN이 1개이였다. 이들중 정상 수정란으로 판명된 2PN 난자는 모두 분할하였으며, 상태도 아주 양호하였다. 체외에서 배양하여 분할된 정상 수정란 4개를 자궁에 이식하였다. 이식후 10일째 혈중 β-hCG가 76.36 mIU/ml이였으며, 1997년 2월 20일 질식초음파로 태낭과 정상태아의 심박동을 확인할 수 있었다. 1997년 10월 10일 제왕절개시술로 3.35kg의 건강하고 정상적인 여아를 분만하였다.

## 고 찰

체외수정시술에 영향을 미치는 요인들은 많이 있으며, 그 중에서도 정자의 결함에 의한 경우도 대단히 중요한 부분을 차지하고 있다. 1988년부터 남성요인 불임에 대한 여러 종류의 미세보조 수정기술을 이용하기 시작하였고, 이것과 더불어 보조생식기술도 더욱 발달하게 되었다. 정자는 고환조직내에서 제2정모세포의 감수분열에 의해 반수체(haploid)인 원형정자세포로 발생된 후, 정자완성단계(spermiogenesis)를 거쳐 완전히 성숙하게 된다.

폐쇄성 무정자증 환자에서는 MESA-ICSI나 TESE-ICSI 방법을 이용하여 임신과 분만이 가능하지만 (Silber 등, 1995b), 비폐쇄성 무정자증 환자는 고환에서 정자형성과정에 장애가 있기 때문에 이 방법으로는 임신이 불가능하다. 남성요인 불임의 약 15%를 차지하는 비폐쇄성 무정자증 환자의 (Dubin and Amelar, 1971) 조직학적인 측면은 세정관내에 생식세포가 존재하지 않는 Sertoli cell only syndrome(Del Castilo 등, 1947)인 경우, 정자형성과정중 pachytene spermatocyte에서 spermatid까지 세포분열이 특정단계에서 정지한 maturation arrest(Nagpal 등, 1993)인 경우, 국부적으로 정상적인 정자형성과정이 일어나는 hypospermatogenesis인 경우 등의 소견이 있다 (Wong 등, 1978). 그러나 비록 조직검사에서 이러한 환자의 경우일지라도 정자를 형성하는 세정관은 있으며, 또 수정과 임신도 가능하다고 주장하는 연구자도 있다(Devroey 등, 1995; Silber 등, 1996; 서주태 등, 1996; 박용석 등, 1996). 그러나 이러한 경우는 정자와 정자세포를 찾기 위하여 조직을 정밀하게 검사하고 소수의 조직이 아닌 더 많은 부위의 조직을 필요로 하기 때문에 장시간의 수술과 고환조직의 손실이 불가피하다는 것이 단점이다. 한편 ROSI는 ICSI보다 수정율과 임신율이 대단히 낮다. 이는 원형정자세포의 정확한 선별이 어렵고 원형정자세포와 성숙된 난자사이의 세포주기가 다르기 때문일 것으로 생각하며, 따라서 이것을 해결하기 위해서는 원형정자세포의 정확한 선별과 난자의 활성을 조절하여야 한다고 생각한다. 실제로 동물종에 따라 약간의 차이는 있지만, 생쥐와 토끼의 경우 전기자극으로 난자 활성화를 먼저 유도하였을 경우 수정율과 임신율이 현저히 증가하는 것을 알 수 있다(Kimura 와 Yanagimachi, 1995; Sofikitis 등, 1996; Vanderzwalmen 등, 1997). 반면 Fishel 등(1996)은 사람의 원형정자세포는 난자를 활성화시킬수 있는 물질이 있어 세포주기의 불일치가 수정과 배발달에 영향을 주지 않는다고 보고하였다.

비폐쇄성 무정자증환자의 원인은 거의 밝혀져 있지 않지만, 최근에 Y염색체상에 미세결실이 그 원인으로 일부 보고되고 있는바(Reijo 등, 1995; 윤현수 등, 1996), 체외수정 난자유래

의 임신일 경우는 그 후손에게 남성불임이 유전될 가능성이 있기 때문에 앞으로 유전학적 진단 및 착상전 유전진단등 더 많은 연구가 필요하다고 생각한다. 만약 ROSI 기술이 불임 치료 목적으로 확립된다면 무정자증 환자의 치료의 폭이 넓어질 수 있으며, 난자내 전핵형성 및 미세소관의 이동등 원형정자세포의 수정기전에 대해서  많은 연구가 이루어져야 할것으로 사료된다.

## 결 론

본원에 내원한 비폐쇄성 무정자증 환자의 고환조직내에서 원형정자세포를 분리하여 난자의 세포질내로 주입하였다. 총 8개의 난자중 5개가 수정되었으며 (62.5%), 이중 정상적인 수정인 2개의 전핵과 제2극체를 가진 난자는 4개였다. 이들 정상 수정란 4개를 환자의 자궁으로 이식한 결과, 1명의 건강한 여아를 출산하였다. 이와같이 정자형성과정중에 있는 원형정자세포도 일반사출 정자와 같이 웅성배우자로서의 이용이 가능하다. 따라서 미성숙 원형정자세포의 체외배양이 가능해진다면 좀 더 발생단계를 거친 정자세포를 이용하여 효율적인 정상 수정 및 임신을 유도할 수 있을 것으로 생각된다.

## 인 용 문 헌


Del Castillo EB, Trabucco A, De La Balze FA: Syndrome produced by absenced of the germinal epithelium without impairment of the Sertoli of Leydig cells. J Clin Endocrilol 1947, 7, 493-502.

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 nonobstructive azoospermia. Hum Reprod 1995, 10, 1457-1460.

Dubin L, Amelar R: Etiologic factors in 1294 consecutive case of male infertility. Fertil Steril 1971, 22, 469-474.

Fishel S, Aslam I, Tesarik J: Spermatid conception: a stage too early, or a time too soon? Hum Reprod 1996, 11, 1371-1375.

Fishel S, Green S, Hunter A, Lisi F, Rinaldi L, Lisi R, McDermott H: Human fertilization with round and elongated spermatids. Hum Reprod 1997, 12, 336-340.

Goto K, Kinoshita A, Nakanishi Y, Ogawa K: Blastocyst formation following intracytoplasmic injection of in-vitro derived spermatids into bovine oocytes. Hum Reprod 1996, 11, 824-829.

Kimura Y, Yanagimachi R: Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. Biol Reprod 1995a, 855-862.

Kimura Y, Yanagimachi R: Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. Development 1995b, 121, 2397-2405.

Nagpal BL, Manjari M, Kapoor K, Dhaliwal US: Testicular biopsies in cases of male infertility:a retrospective study. J Indian Med Assoc 1993, 91, 171-174.

Ogura A, Matsuda J, Asano T, Suzuki O, Yanagimachi R: Mouse oocytes injected with cryopreserved round spermatids can develop into mormal offspring. J Ass Reprod Gen 1996, 13, 431-433.

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.

Reijo R, Alagappan R, Patrizio P, Page DC: Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. Lancet 1996, 347, 1290-1293.

Silber SJ, Van Steirteghem AC, Devroey P: Sertoli cell only revisited. Hum Reprod 1995a, 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 1995b, 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.

Sofikitis N, 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.

Tesarik J, Mendoza C: Spermatid injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development. Hum Reprod 1996a, 11,772-779.

Tesarik J, Rolet F, Brami C, Sedbon E, Thorel J, Tibi C, Thebault A: Spermatid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due to nonobstructive azoospermia. Hum Reprod 1996b, 11, 780-783.

Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, Wistano A, Devroey P: Higher fertilization and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1993, 8, 1061-1066.

Vanderzwalmen P, Zech H, Birkenfeld A, Yemini M, Bertin G, Lejeune B, Nijs M, Segal L, Stecher A, Vandamme B, van Roosendaal E, Schoysman R: Intracytoplasmic injection of spermatids retrieved from testicular tissue: influence of testicular pathology, type of selected spermatids and oocyte activation. Hum Reprod 1997, 12, 1203-1213.

Wong TW, Straus FH, Jones TM, Warner NE: Pathological aspects of the infertile testes. Urol Clin North Am 1978, 5, 503.

박용석, 서주태, 전진현, 변혜경, 김종현, 이유식, 손일표, 강인수, 이호준: 고환조직 정자채취술과 세포질내 정자주입술을 이용한 고환 조직 정자의 수정률과 임신율. 대한불임학회지 1997, 24, 101-109.

서주태, 박용석, 김종현, 이유식, 전진현, 이호준, 손일표, 강인수, 전종영: 비폐쇄성 무정자증의 치료. 대한불임학회지 1997, 24, 95-99.

윤현수, 이정은, 서주태, 김해정, 이동률, 전종식, 조정현, 김문규, 이무상, 노성일: 한국인 남성불임 환자에서 Y염색체내 미세결실의 분자유전학적 분석. 대한불임학회지 1996, 23, 367-377.

조정현, 심현남, 서주태, 이동률, 윤현수, 백혜란, 노성일: 비폐쇄성 무정자증 환자에서 난자내 원형정세포 주입에 의한 임신 및 분만 1례. 1996, 23, 327-331.