

ICSI 프로그램에서 생쥐 투명대를 이용한 고환조직내 정자의 동결

가야자모병원 불임·유전연구소, 카톨릭의과대학교 의과학연구원*,
진주산업대학교 낙농자원학과**

서태광·전병균·류은경·이은숙·류재웅*·손시환**·문진수·김광철

Cryopreservation of Testicular Spermatozoa using Mouse Zona Pellucida in Intracytoplasmic Sperm Injection Program

Tae Kwang Suh, Byeong Gyun Jeon, Eun Kyung Ryu, Eun Sook Lee,
Zae Yoong Ryoo*, Sea Hwan Sohn**, Jin Soo Moon
and Kwang Chull Kim

*Institute of Infertility and Cytogenetics, Kaya Mother-Child's Hospital, Chinju, Korea
Catholic Research Institute of Medical Science, College of Medicine, Catholic University,
Seoul, Korea* Department of Dairy Science & Technology, Chinju National University,
Chinju, Korea***

= Abstract =

The survival rate and motility recovered after cryopreservation of testicular spermatozoa in testicular sperm extraction (TESE)-ICSI program is low. The purpose of this study was to assess the availability and efficiency of mouse empty zona pellucida in cryopreserving human TESE spermatozoa.

Mouse empty zonae pellucidae were obtained by extraction of cytoplasm with or without cytochalasin B treatment. Motile sperm from proven-fertile donor and two azoospermic patients after TESE were individually inserted into empty zona pellucida and cryopreserved. Two to five days after cyropreservation, the frozen sperm were thawed and the rates of recovery and motility were observed. The ooplasmic extraction rates of control (N=80) and cytochalasin B treated oocytes (N=80) were 94.0% and 96.2%, respectively ($p>0.05$). The post-thaw recovery rates of spermatozoa and rates of motility recovery of ejaculate (N=70) and testicular (N=70) sperm were 97.1%, 97.1% and 95.7%, 94.3%, respectively ($p>0.05$).

The results of this study showed that the mouse zona pellucida is useful for cryostorage of single testicular spermatozoa.

Key Words: Testicular sperm extraction (TESE), Spermatozoa, Cryopreservation, Zona pellucida, ICSI

서 론

남성원인의 불임 극복에 성공적으로 도입되어

첫 임신례가 보고된 이후 (Palermo *et al.*, 1992) ICSI는 정자의 수적, 질적 결함 등에 의해 IVF로는 해결하지 못하는 수정에 관한 문제점을 극복 하였으며, 심각한 정자 결함 (severe oligoastheno-

teratozoospermia) 뿐만 아니라 부고환 이상에 의한 무정자증과 비폐쇄성 무정자증에 있어서도 임신이 이루어짐으로써 (Van Steirteghem *et al.*, 1993; Tournaye *et al.*, 1994; Silber *et al.*, 1995a,b), 현재에는 ICSI에 의해 해결되지 못하는 남성불임은 없다고 까지 보고되고 있다 (Silber, 1995). 무정자증에 있어서 매년 ICSI 시술당 정자를 얻기 위한 조직채취는 매우 침윤적이며, 생리적 장애 유발도 가능하기 때문에 무정자증에 있어서 고환조직 채취후 얻어지는 정자 (testicular sperm extraction, TESE)의 이용효율을 높이기 위해 TESE후 정자를 동결보존하여 시술에 이용하고자 하는 시도가 성공적으로 이루어 졌다 (Khalifeh *et al.*, 1997). 그러나 고환조직내 정자의 생존율 및 활력회복율은 낮은 실정이며 (Verheyen *et al.*, 1997), 보다 효율적인 고환조직내 정자의 동결 보존 방법이 요구된다.

본 연구는 생쥐 빈 투명대를 이용한 고환조직내 정자의 동결 보존을 시도하여 투명대 이용을 위한 난자내 세포질 제거방법 및 투명대를 이용한 동결융해 후 정자회수율, 활력회복율 등을 조사함으로써 ICSI에서 이용할 수 있는 기초 자료를 얻고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

폐쇄성 무정자증으로서 고환조직내 정자를 이용한 ICSI 2례를 시술후 잔여정자 및 가임력이 입증된 남성의 정자를 이용하였다.

2. 정자의 준비

가임력이 입증된 남성의 정상 정액은 수음에 의해 채취, 액화 후 80%, 40% percoll 이중층에 넣고 원심 분리하여 활력이 높은 정자 pellet을 분리하였다. 분리된 pellet은 5% synthetic serum substitute (SSS)가 함유된 10 ml의 mHTF-Hepes 배양액 (Quinn, 1995)에 재부유하여 원심세척 후, 상층액은 버리고 하층의 pellet을 연구에 이용하였다. 폐쇄성 무정자 환자에서는 고환조직의 일부를 잘라내어 조직을 채취하였다. 채취된 조직은 erythrocyte lysing buffer (ELB)에서 2~3분간 처리 후 미세 펀셋으로 잘게 짜내는 방법 (squeezing and mincing)으로 정자를 분리하였다. 정자와 조직의 부유액은 5 ml의 mHTF-Hepes 배양액

으로 300 g에서 10분간 원심세척 하였으며, 상층액은 버리고 하층의 pellet은 0.1 ml의 배양액으로 재부유시켜 37°C 배양기에 보관하였다가 ICSI에 이용하였다. ICSI후 남은 정자부유액 내에서 활동성이 있는 정자를 플라 연구에 이용하였다.

3. 생쥐 투명대의 준비

6~8 주령의 자성 생쥐는 5 IU의 PMSG와 48시간 후 5 IU의 hCG를 복강내 주사함으로써 과배란을 유도하였고, 16시간후 도살, 난관적출 및 난관 관류를 실시하여 난자를 회수하였다. 회수된 난자는 0.1% hyaluronidase에 10초간 처리 후 배양액으로 세척하여 주위의 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 난자는 내경 10 µm, 외경 80 µm의 holding pipet으로 고정 후 내경 20 µm의 pipet을 난자내로 주입하여 음압을 가함으로써 세포질을 제거하였다. 세포질이 제거된 투명대는 20 µl mHTF 배양액 소적에 보관하였다.

4. 미세조작

미세조작용 배양 접시 (Falcon 3002, USA)는 중앙에 5 µl의 정자보관용 소적을 2~3개 만들고 주위에 각 4 µl의 미세조작용 소적을 여럿개 만든 후 각 소적에 빈 투명대를 한 개씩 넣고 mineral oil로 피복하여 미세조작 준비를 하였다. 그 후 holding pipet으로 빈 투명대를 9시 방향에서 고정하고 세포질 제거시 생긴 구멍 (slit)이 3시 방향에 오게 하여 투명대를 고정하였다. 정자 주입용 ICSI pipet (ID 5 µm, OD 7 µm, Humagon, USA)으로 운동성이 있는 정자만을 플라 반복 흡입배출 방법으로 immobilization 시킨후, 피펫으로 흡입한 다음 투명대의 구멍을 통하여 각 투명대내에 1마리의 정자를 주입하였다.

5. 정자의 동결

정자가 주입된 투명대는 8% glycerol과 3% human serum albumin (HSA)이 첨가된 PBS에 넣고 0.25 ml straw내에 loading 하였다. 위치 확인을 위해 straw양쪽에 공기층을 만들고 중앙의 배양액층에 2~3개의 정자가 주입된 투명대를 넣었으며 straw를 PVA로 밀봉하였다. 그후 액체질소탱크의 vapor 상층에서 5분간 정치하여 cooling후 서서히 액체질소 내로 침지하는 간이동결방법으로 동결하였으며 (modified static vapor phase cooling, Mortimer D., 1994) 동결과정은 10분에 걸쳐

실시하였다.

6. 정자의 용해

동결된 정자는 2~5일 후 37°C water bath에서 30초간 침지하여 용해하였으며, 용해 후 straw의 양끝을 잘라내고 투명대가 담긴 배양액층을 배양접시 (Falcon 3001, USA)에 붓고 실체현미경하에서 정자가 들어있는 투명대를 회수하였다. 회수된 투명대는 미리 준비된 배양액에 넣고 5분간 37°C, CO₂ 배양기에서 배양 후 400배의 위상차 현미경하에서 검경하였다.

7. 실험설계 및 결과 분석

생쥐 빈 투명대의 준비에 있어서 cytochalasin B 처리 유무에 따른 세포질 제거의 효율성과, 정상 정자 및 고환조직내 정자를 각각 하나의 투명대에 한 마리씩 주입하여 동결용해 후 정자 회수율, 활력 회수율을 비교조사하였다. 결과 분석은 χ^2 로 분석하였으며 $p < 0.05$ 인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

생쥐 난자의 세포질 제거에 있어서 cytochalasin B 처리유무에 따른 세포질 제거율은 Table 1과 같

Table 1. Extraction rates of mouse egg ooplasm after cytochalasin B treatment

Treatment	No. of oocytes subjected	No.(%) of empty ZP* without ooplasmic remnants
Cytochalasin B (-)	80	75 (94.0)
Cytochalasin B (+)	80	77 (96.2)

• ZP, zona pellucida.
(-), without cytochalasin B treatment.
(+), with cytochalasin B treatment.

Table 2. Post-thaw recovery rates and motility of human spermatozoa individually inserted into mouse zona pellucida

Sperm source	No. of spermatozoa frozen	No. of spermatozoa recovered after thawing	No. of spermatozoa motile
Ejaculate	70	68 (97.1)	68 (97.1)
Testicular	70	67 (95.7)	66 (94.3)

The value in parentheses are percentages.

다. 총 160개의 난자를 각각 80개씩 cytochalasin B 처리 없이 혹은 처리후 세포질을 제거하였을 때 잔여 세포질의 찌꺼기없이 깨끗하게 제거된 빈 투명대의 작출율은 각각 94.0% 및 96.2%로써 차이가 없었다 ($p > 0.05$).

생쥐 빈 투명대에 각각 하나의 정자를 넣어 동결 용해 후 정자 회수율 및 활력 회수율은 Table 2와 같다. 사출 정액 및 고환조직으로부터 각각 70개의 활력있는 정자를 선별하여 반복 흡입배출로 immobilization 시킨 후 생쥐 투명대에 넣고 동결용해 하였을때, 정자회수율과 활력회수율은 각각 97.1%와 97.1%, 95.7%와 94.3%로써 정자회수 및 활력회수율에 있어서 사출정자와 고환조직내 정자간에 차이가 없었다 ($p > 0.05$).

고 찰

고환조직내 정자의 동결은 정자 자체를 동결하거나 (Craft and Tsirigotis, 1995), 조직을 동결하는 방법을 이용하고 있다 (Salzbrunn *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 1996). ICSI에 있어서 고환조직내 정자 또는 조직의 동결 보존은 난자 채취 당일 TESE도 해야 하는 시술의 부담 및 시술당일 정자회수에 실패하여 ICSI 자체가 실패할 가능성을 줄이고, ICSI 시술당 새로이 조직채취를 해야하는 불편함, 비용 등을 줄일 수 있으며 (Salzbrunn *et al.*, 1996), 수회의 조직 채취에 따른 일시적 혹은 영구적인 생리적 장애를 방지할 수 있으나 (Cohen *et al.*, 1997) 조직당 얻을 수 있는 정자의 수와 활력이 너무 낮기 때문에 동결 보존이 어렵다고 보고되어 왔다 (Silber *et al.*, 1995b). Craft 등 (1993)에 의하여 고환조직 내 정자의 ICSI에 의한 수정이 보고된 이후, Silber 등 (1995)은 고환 조직에서 수는 비록 적지만 움직임이 있는 정자를 얻었으며 이를 ICSI에 이용하여 높은 수정률과 임신율을 얻었고, Craft와 Tsirigotis (1995)는 고환조직내 정자를 glycerol이 함유된 동결보존액에 넣

어 동결, 융해하였을 때 활력이 있는 정자를 얻을 수 있었다고 보고하였다.

Fischer 등 (1996)은 고환 조직의 동결융해후 추출된 활력있는 정자를 이용하여 13 회의 ICSI 시술에서 52%의 수정율을 얻음으로써 Nagy 등 (1995)이 동결하지 않은 고환내 정자를 이용했을때 얻은 57%의 수정율과 유사하다고 보고하고, 고환 조직내 정자의 동결유무에 관계없이 수정율은 큰 차이가 없다고 보고하였다. Verheyen 등 (1997)은 ICSI에 이용 후 남은 조직 부유액에서 percoll 처리로 정자를 추출하여 동결, 융해시 평균 활력 회수율은 26%, 생존율은 32%로서, 활력과 생존율은 동결과 융해 양 과정에 의해 똑같이 영향을 받는다고 보고하였다. 또한 융해 후 동해방지제의 제거를 위한 percoll 사용은 final sperm quality에 영향을 미치지 않았으며, percoll이 활력있는 생존 정자의 selection을 가능하게는 하나 삼투압 shock에 의한 추가적인 해작용을 유발하고, 사출 정자에 비해 고환조직내 정자는 cooling, freezing 및 thawing 과정에 의해 더 현저한 해작용을 받기 때문에 극히 일부분만이 동결 가능함으로써 효율이 낮다고 보고하였다.

한편, Oates 등 (1997)은 고환조직을 homogenates로 만들어 glycerol이 함유된 동결액으로 동결, 융해후 ICSI를 시행하였을 때, 수정란의 질 (quality)은 신선한 사출 정자를 이용하였을 때와 비교하여 유사하였으며, 고환조직내 정자의 동결과정이 ICSI후 수정란의 발달에는 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. Cohen 등 (1997)은 고환조직내 정자를 사람, 햄스터 및 생쥐의 빈 투명대에 넣어 동결융해하였을 때, 평균 73% (44~93% 범위)의 높은 정자회수율과 평균 82% (65~100% 범위)의 높은 활력회수율을 얻었다고 보고하였다. Cohen 등 (1997)은 빈 투명대의 작출방법이 결과에 영향을 미치며 난자의 양극에 구멍을 내고 세포질을 피펫으로 흡입제거 하는 것이 난자의 위축을 방지하여 적합한 투명대를 만들 수 있다고 하였으나, 본 연구에서는 세포질 제거 과정에서 심각한 난자의 위축현상은 없었으며, cytoskeletal inhibitor인 cytochalasin B를 처리함으로써 세포질이 터지지 않고 깨끗하게 제거되도록 할 수 있었다. Cytochalasin B 처리를 하지 않은 난자도 세포질이 제거되었으나 이 경우 세포질이 투명대내에서 터져 흩어지는 경우가 종종 발생했으며, cytochalasin B를 처리하였을 경우 이러한 문제가 발

생되지 않으므로 생쥐 빈 투명대의 작출에는 cytochalasin B를 처리하는 것이 더 바람직하다고 사료된다. Cohen 등 (1997)은 투명대에 정자를 넣고 동결, 융해시 투명대의 양쪽 구멍을 통하여 정자가 빠져나감으로써 생기는 정자손실율이 10~37%라 보고하였으나, 본 연구에서는 세포질 제거시 작은 구멍 (slit) 하나만 만들었기 때문에 손실율이 5% 이하로 극히 낮았다. 또한 cytochalasin B 처리에 의해 세포질을 완전히 제거함으로써 정자가 세포질 찌꺼기에 들어붙고 정자 회수를 어렵게 하는 저해작용을 방지 할 수 있어서 정자 회수율이 매우 높았다고 사료된다.

고환조직 정자의 동결융해 후 생존율 및 활력은 정자의 질, 동해방지제, 동결융해 방법, 희석 및 세척과정 같은 여러 요인에 의하여 영향을 받으며 (Fischer *et al.*, 1996), 동결 및 융해과정 자체가 정자의 생존에 영향을 미쳐 생존 정자수와 활력을 감소시킨다고 알려져 있으나 (Edirisinghe *et al.*, 1996), 본 연구에서는 생쥐의 빈 투명대를 이용하여 개별적으로 정자를 동결함으로써 매우 효율적인 정자동결이 가능하였다. 이 방법을 이용한 정자동결은 고환조직내 정자를 이용한 ICSI에 있어서 환자와 시술자 모두에게 시술을 관리할 수 있는 편리함을 제공하며 특히 1회 진단목적의 조직채취에서 얻어진 정자를 시술에까지 이용 가능케 해준다 (Oates *et al.*, 1997).

따라서 본 연구에 의하여 고환조직내 정자의 동결에 생쥐 빈 투명대를 이용하는 것이 매우 효율적인 방법임이 입증되었으며 이 방법에 의해 동결, 융해된 정자의 수정율 및 임신율에 대한 추후연구가 더 진행되어야 된다고 사료된다.

결 론

본 연구는 고환조직내 정자 (TESE)의 동결보존에 있어서 생쥐 빈 투명대의 이용 가능성을 조사하기 위하여 실시하였다. 이를 위하여 투명대 작출을 위한 세포질의 제거방법, 빈 투명대를 이용한 사출정자 및 고환조직 정자의 동결융해 후 정자 회수율과 활력 회복율을 비교 조사하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1. 생쥐 난자의 세포질 제거에 있어서 cytochalasin B 처리없이 또는 처리 후 세포질 제거율은 각각 94.0%와 96.2%로서 차이가 없었다.
2. 활력있는 사출정자 및 고환조직내 정자를 반

복 흡입배출로 immobilization 후 생쥐 투명대에 각각 하나씩 넣고 동결 융해하였을 때, 정자회수율 및 활력 회수율은 각각 97.1%와 97.1%, 95.7%와 94.3%로서 정자간에 차이가 없었다.

본 연구의 결과 빈 투명대를 이용한 정자의 동결 융해법은 높은 정자회수율과 활력회수율을 나타내었으며, 이를 고환조직 정자의 동결 보존에 이용한다면 환자 및 시술자 모두에게 도움을 주리라고 사료된다.

참 고 문 헌

- Cohen J, Garrisi GJ, Congedo-Ferrara TA, Kieck KA, Schimmel TW, Scott RT: Cryopreservation of single human spermatozoa. *Hum Reprod* 1997, 12, 994-1001.
- Craft I, Bennett V, Nicholson N: Fertilising ability of testicular spermatozoa. *Lancet* 1993, 342, 864.
- Craft I, Tsirigotis M: Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1995, 10, 1623-1627.
- Edirisinghe WR, Junk SM, Matson PL, Yovich JL: Changes in motility patterns during in-vitro culture of fresh and frozen/thawed testicular and epididymal spermatozoa: implications for planning treatment by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996, 11, 2474-2476.
- Fischer R, Baukloh V, Naether OJ, Schulze W, Salzbrunn A, Benson D: Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of spermatozoa extracted from frozen-thawed testicular biopsy. *Hum Reprod* 1996, 11, 2197-2199.
- Khalifeh FA, Sarraf M, Dabit ST: Full-term delivery following intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa extracted from frozen-thawed testicular tissue. *Hum Reprod* 1997, 12, 87-88.
- Mortimer D: Semen cryopreservation. In: Mortimer D, eds. *Practical laboratory andrology*. New York: Oxford University Press, 1994, 14, 306-311.
- Nagy Z, Liu J, Janssenwillen C, Silber S, Devroey P, 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.
- Oates RD, Mulhall J, Burgess C, Cunningham D, Carson R: Fertilization and pregnancy using intentionally cryopreserved testicular tissue as the sperm source for intracytoplasmic sperm injection in 10 men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997, 12, 734-739.
- 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: Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *J Assist Reprod Genet* 1995, 12, 97-105.
- Salzbrunn A, Benson DM, Holstein A, Schulze W: A new concept for the extraction of testicular spermatozoa as a tool for assisted fertilization (ICSI). *Hum Reprod* 1996, 11, 752-755.
- Silber SJ: The use of epididymal and testicular spermatozoa with intracytoplasmic sperm injection. *11th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology*, Hamburg, Germany, June 1995, abs 055.
- Silber SJ, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Lissens W, Ferec C, Liebaers I, Devroey P, Van Steirteghem AC: The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility. *Hum Reprod* 1995a, 10, 2031-2043.
- Silber SJ, Van Steirteghem AC, 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* 1995b, 10, 148-152.
- Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, 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.
- Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenwillen C, Tournaye H, Derde MP, Van Assche E, Devroey P: Higher Success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subz-

onal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Repr Iod* 1993, 8, 1055-1060.

Verheyen G, Nagy Z, Joris H, Croo ID, Tournaye H, Van Steirteghem A: Quality of frozen-thawed

testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into in vitro-matured germinal-vesicle stage oocytes. *Fertil Steril* 1997, 67, 74-80.