

체외수정의 예후지표로서 정자의 Zona-Free Hamster Ovum Penetration 분석에 관한 연구

연세대학교 의과대학 산부인과학교실

황 동 훈 · 이 윤 호

The Human Sperm Zona-Free Hamster Ovum Penetration Assay as a Prognostic Indicator in a Human In-vitro Fertilization Program

Dong Hoon Hwang, M.D. and Yoon Ho Lee M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

= Abstract =

Defective or inadequate semen quality, usually presenting as low sperm count or poor sperm motility, is recognizable by semen analysis. However, the ability of spermatozoa to fertilize an ovum is not determined used in various experiments. In this study, hamster oocyte sperm penetration assay was used to determine the fertilizing capacity of sperms in 20 subjects which divided into two groups, group A with 10 normal fertile men, and group B with 10 infertile men. The % penetration in group A and group B were 61% and 35% respectively, which showed statistically not significant but fertilization index was significantly different between group A (FI=2.24) and group B (FI=0.05). Additionally it seemed that the percentage of sperm penetraton was influenced more by the motility of spermatozoa than by the number.

서 론

최근 불임환자의 궁극적인 치료 방법으로 체외수정술이 널리 이용됨에 따라 임신율을 높이기 위한 여러가지 방법들이 시도되고 있다. 체외수정에 의한 임신 성공율은 대체로 15-25% 수준으로 불임의 원인에 따라 조금씩 차이가 있다. 임신율을 저해하는 가장 큰 요인중 남성 원인에 의한 불임은 그치료 방법이 별로 없으며 정자에 의한 불임은 정자의 수, 활동성 등에 의해 결정 될 수 있다. 또한 정자의 수정능력을 미리 알아냄으로써 불임치료에 도움을 주고자 정자에 대한 여러가지 실험들이 동물난자(Mintz 등, 1962, Yanagimachi, 1972, Handa 등, 1972)를 이용하여 행하여졌다.

1976년 Yanagimachi등에 의해 인간정자를 Hamster Oocyte에 Penetration 시켜서 정상적인

86-CMB-YUHAN(5) 연구비에 의하여 완성 되었음.

전핵(Pronucleus)형성을 확인함으로써 정자의 수정능력을 측정할 수 있게 되었다. 체외 수정술의 발달이 여성 불임 치료에는 상당한 발전을 가져왔으나 수정이 되지 않거나 임신이 잘 되지 않는 경우 원인을 분석하기에는 용이하지 않다.

정자의 분석은 정자의 수와 활동성으로서 평가하고 있으나, 이러한 결과들이 가임(Fertile)과 불임(Infertile)을 평가하기에는 부족한 점이 많다. 대부분 정상소견을 보이는 정자들은 가임을 나타낸다고 보고있으나, 정상적인 형태와 활동성을 가지고 있고, 숫자도 정상적임에도 불구하고 임신되지 않는 경우에는(Ehud J. Margalioth 등, 1983), 정상인보다 수정률이 떨어지는 것을 알 수 있었다.

본 실험은 불임치료에 있어, Hamster Oocyte의 Sperm Penetration Assay를 통해 사전에 정자의 수정능력을 평가함으로써 불임의 원인을 밝혀내고 또한 수정이 일어나지 않는 환자에 대해서는 새로운 방법들을 통한 치료를 해줌으

로써 불임치료에 도움을 주고자 이 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 동물은 연세대의 중앙 동물사육실에서 사육된 Chinese Golden Hamster를 사용하였다. 생후 3개월된 Hamster 암컷으로부터 과배란(Superovulation)을 유도하기 위하여, 복강에 PMSG(Sigma Co.)를 35 iu 주사하고, 58-60시간이 지난 다음 hCG(Sigma, Co.)를 35 iu 주사하였으며, 16-18시간이 지난 후 경추 파열로 도살한 다음, 수란관으로부터 난자를 추출하였다. 한 마리당 추출된 난자는 30-40개 정도였다.

본 병원을 찾은 불임환자 중 정액검사를 받은 환자에서 정상치($20 \times 10^6/\text{ml} > 60\% >$)와 비정상치($20 \times 10^6/\text{ml} < 60\% <$)를 나타내는 환자를 대상으로 하였다. 정자의 전처리과정은 Swim up Method에 의해 처리하였고, 수정(Insemination) 숫자는 $5-10 \times 10^6/\text{ml}$ 의 정자를 넣어 주었다.

사용된 배양액은 BWW(Biggers, Whitten and Whittingham)를 사용하였으며, 수란관으로부터 얻은 난자들은 Cumulus 제거를 위해 0.1% Hyaluronidase(Sigma, Co.)에 녹여 난자를 2분간 처리하였고, Zona-pellucida를 제거하기 위해 0.1% Trypsin(Merck, Co.)에서 2-3분간 처리한 뒤, 0.4% BSA(Bovine serum albumin, Sigma, Co.)를 섞은 배양액에서 3번 씻은 후 4-well dish(Nunc, Co.)에 난자를 옮겨 놓았다. 1 well당 20개씩의 난자를 넣었으며, 배양조건은

5% 이산화탄소, 95% 공기상태의 배양기에서 배양하였다. 정자의 숫자는 $5-10 \times 10^6/\text{ml}$ 개씩 넣어 5-6시간 배양한 후 슬라이드 위에 고정시킨 다음, 이 슬라이드를 고정액 Carnoy's Soln(Acetic acid:Alconho=1:3)에서 12시간 고정시킨 후 0.25% Lacmoid Staining Soln에 염색하였다.

염색된 난자는 현미경 아래에서 검경하여 전핵의 숫자를 계산하여 정자의 Penetration 숫자를 계산하였다.

통계처리는 X²-Analysis를 행하였다.

결 과

정상군의 % penetration 결과는 10예의 정상치가 penetration 되었으며 8번 환자에서는 정자가 정상적인 소견을 보였으나 penetration되지 않았다(Table 1). 비정상군에서의 % penetration 결과는 정자숫자의 부족에도 불구하고 활동성이 정상치를 나타낸 환자에서는 정상군과 같은 penetration을 보여 7예에서 penetration 되었다(Table 2). 정상군과 비정상군을 비교해보면 % penetration에서는 각각 61%와 35%로 나타났으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었으며($p > 0.05$), FI(Fertilization Index)는 2.24와 0.91로서 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다($p < 0.05$)(Table 3).

고 찰

Hamster oocyte의 sperm penetration assay (SPA)가 정자의 수정 능력을 평가할 수 있는

Table 1. Sperm Characters of Fertile(Normal) Men

No.	Vol. (ml)	Sperm count ($\times 10^6/\text{ml}$)	Motility (%)	Penetration (%)
1	1.7	31.1	80.6	100
2	3.0	56.6	61.5	70
3	5.0	85.8	55.6	55
4	2.0	130.5	87.9	100
5	4.1	67.1	75.8	85
6	4.3	66.5	83.3	40
7	2.5	107.4	80.1	80
8	1.0	121.6	65.2	0
9	4.0	195.4	74.7	35
10	1.2	158.8	75.6	45

Table 2. Sperm Characters of Infertile(Abnormal) Men

No.	Vol. (ml)	Sperm count ($\times 10^6/\text{ml}$)	Motility (%)	Penetration (%)
1	1.8	18.5	72.1	70
2	2.5	13.4	35.4	20
3	1.5	2.5	14.3	0
4	3.0	16.5	15.8	25
5	5.0	18.9	46.3	30
6	1.3	12.1	60.4	100
7	1.0	15.1	53.3	60
8	4.7	18.5	40.7	45
9	0.9	11.0	43.5	0
10	2.0	18.9	25.0	0

Table 3. Semen Parameters. Averages and Ranges of Clinically Fertile(Group A) and Clinically Infertile(Group B) Men

	Sperm count($\times 10^6$ /ml)	Motility(%)	Penetration ^a (%)	Fertilization \times (F1) ^b
Group A(n=10)	102.1(31.3-195.4)	740(55.6-87.9)	61(0-100)	2.24(0-4.5)
Group B(n=10)	14.5(2.5-18.9)	40.6(14.3-72.1)	35(0-100)	0.91(0-2/7)

a; $p > 0.05$, b; $p < 0.05$

F1(Fertilization Index or Penetration Index) =

$$\frac{\text{No. of Total Pronucleus}}{\text{No. of Inseminated Oocyte}}$$

척도로서의 역할에 대해서는 아직 논란이 되고 있으며 일반적으로 종래의 정자분석(semen analysis)보다는 가음성율(false negative)과 가양성율(false positive)의 빈도가 낮아 임상적으로 남성의 가임능력을 나타내는 지표로서 알려져 있으나 SPA를 행하는데에 있어 정자의 Penetration 숫자는 전배양(Preincubation) 시간에 의해 크게 영향을 미치는 것은 활동성있는 정자(Motile sperm)의 수정 농도(Insemination concentration)로써, 보통 $5-10 \times 10^6$ /ml 정도로 보고되어 있으나, 정자감소증(Oligospermia) 또는 운동부전증(Asthenospermia)환자에 있어서는 활동성있는 정자를 농축시켜 숫자를 조절하기에는 오차가 너무 크게 나타난다. 따라서 이러한 영향을 주는 요인들을 변화시킴에 따라 다른 결과를 초래할 수 있다.

% penetration의 수정능력에 대한 경계(Criteria)는 보고자에 따라 다르게 발표하고 있다. Perreault등(1982)은 15% 이상의 Penetration 율을 가지면 가임(Fertile)이라 보고하였으며, Roger(1979)는 10% 이상에서는 임상적으로 가임한다고 보고하였으나, 본 실험에서는 비정상군에서도 35% 이상의 높은 %를 나타내었는데 이는 활동성이 정상치 범위에 있는 환자 타내었고 불임 남자도 0-100%의 범위를 나타냄으로써 통계학적인 유의성을 나타내지 못하며, Rogers(1983)는 SPA의 결과가 양성인 것은 가임 능력의 잠재성이 있다는 것을 나타낸다고 시사하였다.

인 것은 가임 능력의 잠재성이 있다는 것을 나타낸다고 시사하였다.

Group A에서는 False negative(비정상인데 가임남자)를 나타내는 환자는 1명 있었으며, Group B에서는 false positive(정상인데 불임남자)를 나타내는 환자는 7명이 있었다. 이러한 결과는 정자의 정상치의 기준이 남자의 수정율과 정확히 일치하지 않는다는 것을 의미한다.

SPA와 SA의 상관관계에 있어 Martin과 Taylor 등(1982)은 penetration율과 종래의 정액검사와는 관련성이 없으며, Cohen등(1982)도 SPA와 정자의 농도, 정자의 운동성, 형태학적으로 정상적인 정자와의 커다란 의의는 없다고 하였으나 Berger등(1982)은 SPA와 정자의 숫자 및 정자의 운동성과 형태학적으로 정상적인 정자 사이에는 유의한 상관관계가 있음을 발표하였다. Fertilization index는 Roger(1985)에 의하면 정상군에서는 0.56, 비정상군에서는 0.01로서 무척 낮게 나타난 반면, 본 실험결과는 2.24와 0.91로 나타났는데 이는, 배양시간을 길게 하였으며 수정(insemination) 정자의 숫자가 많았기 때문에 나타난 결과로 사료된다.

일반적으로 수정능력은 Gametes의 질적수준이 중요하며 이중에서도 정자의 수, 운동성 및 형태학적 평가가 매우 중요하다. 최근의 보고에 의하면 oligospermia에서 정자의 운동성이 결정적인 요인으로 주목받고 있으며 또한 최근의 IVF-ET의 성공율의 향상여부도 이 운동성을 증가시키는데 주력하고 있다. 본 교실의 보고에 의하면 정자 배양액내 Fructose첨가시에 정자운동성 유지에 중요함이 발표되었다(한 등, 1987). 정액검사에서 정상소견을 보이더라도 수정이 이루어지지 않는 경우가 있으며 이의 대표적 요인으로 지론되는 것이 면역학적 요인이며, 박 등(1989)의 보고에서도 국소적으로 분비되는 IgA가 중요한 인자로 지목되었다. 요약하면 정자의 수정능력평가에는 일반정액검사, 항정자항체검사, 내분비검사가 선행되고 뒤이어 수정여부의 최종점검에는 Sperm Penetration Assay(SPA) 즉 zona-free hamster egg penetration(ZFHEP)등을 시행할 수 있겠다. 전술한 바와 같이 많은 보고자들에 의해 ZFHEP의 유용성에 대해 다양한 보고를 하고 있으나 본 연구에서 주목할 사항은 운동성이 매우 중요한자임이 확인되었다. 이에 quality control의

한 방법으로서 실제 IVF-ET에서 수정율과를 비교하였으며 이 방법은 다른 보고 자들에 의해 많은 보고가 있었다(Wolf 등, 1982; Johnston 등, 1984; Johnston 등, 1985_a; Johnston 등, 1985_b; Syms 등, 1985). ZFHEP에서 % penetration과 IVF의 상관관계에서 그 criteria는 역시 다른 보고자들에서와 마찬가지로 차이점이 발견되었다. 요약하면 정상 정액검사소견을 보인 가임 남성, 비정상 정액검사소견을 보인 불임남성에서 상호결과를 비교분석하면 정자의 수, 운동성 및 % penetration에서 가시적인 차이는 뚜렷했으나 통계적인 유의성이 없었으며 이는 자료의 크기에 기인할 수도 있을 것으로 사료된다. 그러나 수정율에서는 유의있는 차이를 보였고 이는 운동성이 보다 더 상관성이 있었다. 대체로 ZFHEP는 각 연구자들 주관에 따라 일반적으로 선호하는 경향이 있으며 본 보고자들도 이에 동조한다. Lamb등(1989)의 보고에서도 sperm capacitation의 index로서 ZFHEP를 인정하고 있으며 또한 capacitation을 야기하는 swim up과도 상관성이 있음을 보고 하였다. 최근의 추세는 정자의 motility의 증가에 많은 연구가 진행되고 있으며 이의 효과여부를 ZFHEP를 통해 검정하고 임상에 적용하는 경향이 있다. Haesungcharen등(1973), Bunge(1973), Dougherty등(1976) 및 Cai등(1989)은 caffeine과 정자를 동시배양함으로써 ZFHEP에서 양호한 결과를 보고하였으며 이의 기본적인 기전으로 정자세포내 cAMP의 증가를 제시했다 본 보고자의 견해도도 현재 불임분야의 가장 큰 장애요인인 정자의 운동성증가가 큰 과제이며 이의 중요한 검사로서 ZFHEP test는 일익을 담당할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

Berger, R.E., Karp, L.E., Williamson, R.A., Koehler, J., Moore, D.E., Holmes, K.K.: *The relationship of polyspermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as reflected in the sperm penetration assay. Fertil Steril* 37: 557, 1982.

Bunge, R.G.: *Caffeine stimulation of ejaculated human spermatozoa. Urology* 1: 371, 1973.

Cai, Z. and Marik, J.J.: *Improving penetrating capacity of spermatozoa with poor motility by addition of caffeine at coincubation with zona-*

free hamster. Fertil Steril 24: 662, 1973.

Cohen, J., Mooyaart, M., Vreeburg, J.T.M., Zeilmaker, G.H.: *Fertilization of hamster ova by human spermatozoa in relation to other semen parameters. Int J Androl* 5: 210, 1982.

Dougherty, K.A., Cockett, A.T.K. and Urry, R.L.: *Caffeine, theophylline and human sperm motility. Fertil Steril* 27: 541, 1976.

Ehud, J., Margalioth, Daniel Novot, Neri Laufer, Shimo Mor Yosef, Ron Rabinowitz, Shaul Yarkoni, Joseph and Schenker, G.: *Zona-free hamster ovum penetration assay as a screening procedure for in vitro fertilization. Fertil Steril* 40: 386-388, 1983.

Lamb, D.J., Johnston, A.R. and Bassham, B.L.: *How the sperm penetration assay diagnoses Infertility* 33(1): 108, 1989.

Martin, R.H., Taylor, P.J.: *Reliability and accuracy of the zona-free hamster ova assay in assessment of male fertility. Br J Obstet Gynaecol* 89: 951, 1982.

Mintz, B.: *Experimental study of the developing mammalian egg: Removal of the zona pellucida. Science* 138: 594, 1982.

Haesungcharen, A., Chulavatnol, M.: *Stimulation of human spermatozoal motility by caffeine. Fertil Steril* 24: 662, 1973.

Hanada, A. and Chang, M.C.: *Penetration of Zona-free eggs by spermatozoa of different species. Biol Reprod* 6: 300, 1972.

한형장, 박기현, 박병하, 박경득, 박찬규: 정자배양시 모체혈청이 정자운동성에 미치는 영향. 대한산부인과지 제30권 7호. 988, 1987.

Johnston, A.R., Lipshultz, L.I. et al.: *Conditions influencing Human sperm capacitation and penetration of zona-free hamster ova. Fertil Steril* 42-603, 1984.

Johnston, A.R., Syms, A.J., Lipshultz, L.I. et al.: *Thermal shock to spermatozoa stored at 4°C optimizes capacitation. J Urol* 133: 74, 1985.

Johnston, A.R., Lipshultz, L.I. et al.: *Cryopreservation of sperm for use as a standard in the sperm penetration assay. J Androl* 6: 137, 1985.

박기현, 이병석, 이보연, 박찬규: 불임여성의 경관점액에 있어서 항정자항체에 관한 연구. 대한 산부인과지 제32권 8호. 1032, 1989.

Perreault, S.D. and Rogers, B.J.: *Capacitation pat-*

- tern of human spermatozoa. Fertil Steril 38: 258, 1982.*
- Rogers, B.J. Van Campen, H., Ueno, M., Lambert, H., Bronson, R. and Hale, R.: *Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-sperm penetration bioassay. J Andrology 3:445, 1982.*
- Yanagimachi, R.: *Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster eggs in vitro. J Reprod Fertil 28:477, 1972.*
- Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers, B. *free ova. Fertil Steril 32:664, 1979.*
- Rogers, G. Jane: *The sperm penetration assay: its usefulness reevaluated. Fertil Steril 43:821-840, 1983.*
- Wolf, D.P., Sokoloski, J.E.: *Characterization of the J.: The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol Reprod 15: 471, 1976.*
-