

## 항정자 항체 검출을 위한 CIA 및 ELISA 개발을 위한 기초 연구

중앙대학교 의과대학 비뇨기과학교실\*, 건국대학교 축산대학

김세철\* · 이기순 · 김윤규 · 김창규 · 최경호 · 권오중 · 김종배

### Development of Chemiluminescence Immunoassay(CIA) & ELISA for the Detection of Anti-sperm Antibodies in Male Serum

S.C. Kim\*, K.S. Lee, Y.K. Kim, C.K. Kim, K.H. Choi, O.J. Kwon, J.B. Kim

*Department of Urology, College of Medicine, Chung-Ang University College of Animal Husbandry,  
Kon-Kuk University*

#### = Abstract =

New immunoassay systems for the detection of anti-sperm antibodies were developed. For this, sperm surface protein was purified by the immunoaffinity column prepared by the coupling of rabbit anti-human IgG antibodies to Sepharose-4B. Fraction eluted by tris-HCl buffer containing SDS showed a single band having molecular weight of about 60KD on electrophoresis. Enzyme HRP labelled goat anti-human IgG and chemiluminescence aminobutylethyl-isoluminol(ABEI) labelled rabbit anti-human IgG were used for ELISA and CIA, respectively. These two labelled conjugate bound well with human IgG.

When serum dilution curves were made to titrate positive serums, two kinds of curves with steep and sluggish slopes were obtained

Serum samples were categorized into 3 groups: positive, weak positive and negative based on slope of curve and O.D. values at 1:160 dilution of serum.

When ELISA and CIA were compared to conventional method Kibrick test by the determinations of 62 male serums with different diagnosis, the results of ELISA and CIA agreed well, but both disagreed with that of Kibrick test.

This study showed that purified sperm surface antigen can be used to develop solid-phase immunoassay systems such as ELISA and CIA which may eliminate the problems encountered the immobilization of living sperm in other tests.

**Key Words:** Chemiluminescence immunoassay, ELISA, Sperm surface antigen, Immunoaffinity chromatography, Kibrick test.

#### 서 론

1954년 Wilson과 Rümke가 각기 처음으로 인체에서 정자에 대한 자가면역현상을 보고한 이래 이에 대한 많은 연구가 이루어져 왔으며

본 논문은 1989년도 학술진흥재단의 학술연구조성비의 지원으로 이루어진 것임.

원인 불명 불임증의 10~20%가 바로 항정자 항체와 같은 면역학적 요소에 기인된다고 하며 (Haas, 1980) 특히 항정자항체가 정상 수정과정을 방해할 수 있다는 사실이 동물실험을 통해 여러 연구자들에 의해 입증된 후 (Yanagimachi et al., 1981; O'Rand et al., 1984) 원인 불임증환자 진단을 위해 혈청내의 항정자항체를 검사하고자 여러방법들이 개발되었다(김

세철, 1985).

지금까지 개발된 방법들로서는 Gelatin정자 응집 검사법(Kibrick et al., 1952), capillary tube 응집검사(Rose et al., 1976), Friberg등(1974)의 tyay응집항체검사, Franklin과 Dukes(1964)가 개발한 tube-slide 응집검사법과 Isojima등(1972)이 개발한 정자부동화 항체검사법들이 초기에는 많이 사용되었으나 이들 방법들은 대부분 정자자체를 매번 사용해야 한다는 근본적인 어려움과, 결과를 판독하는데 주관성이 개입되어 보고자에 따라 결과가 상이한 단점이 있다(김세철, 1985; 이규백과 김세철, 1985). 그래서 최근에는 조작이 비교적 간단하면서 감도가 좋고 객관적인 판독이 가능한 각종 면역분석법 개발에 많은 연구를 하게 되었다(Gripenberg & Kurki, 1986).

항정자항체 검출을 위한 면역분석법으로는 면역형광검사법(Hjort & Hansen, 1971), 방사성면역분석법(Hass et al., 1982) 및 효소면역분석법(Paul et al., 1983; Raymond et al., 1984)등이 주로 개발, 이용되어 왔으나 면역형광검사법도 지금까지 일반적인 인정을 못받고 있으며, 동위원소를 이용한 방사성면역분석법은 그 특이성과 감도(sensitivity)가 좋은 점은 인정되고 있으나 방사성동위원소사용에서 야기되는 갖가지 문제점(Kim, 1983)등으로 인해 그 이용이 제한되고 있다. 또한 ELISA와 같은 효소면역분석법도 판독이 객관적이라고 하나 그 결과가 기존 상법으로 이용되어 온 정자응집검사법이나 정자부동화검사법등과의 상관관계가 낮은 경우가 흔히 있어 그 결과 해석에 어려움이 있어 이방법이 상법으로서의 표준화에 난점이 있었다. 또한 면역분석법이 널리 이용되지 못하는 이유의 하나는 정자를 균일하게 tube나 glass에 고정시킬 수 있는 방법이 확립되지 못한 점이라 할 수 있다.

이에 본 연구에서는 상기문제를 해결할 수 있는 방법으로, immunoaffinity chromatography로 정자표면항원(sperm surface protein)을 분리·정제하여 이를 plastic tube에 고정화 시킨 것을 사용한 ELISA법과, 새로운 비방사성 면역분석법으로 화학 발광체를 이용한 chemiluminescence immunoassay(CIA: Kim, 1983)을 개발하여 기존방법의 하나인 Kibrick test와 비교함으로써 그 이용가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 항정자항체 생산과 항체의 분리 정제

$10^8$  Cells/ml 정도의 정자를 phosphate buffered saline(PBS; 0.05M, pH 7.0)로 3회 세척한 후 complete Freund's adjuvant(Miles, USA)와 혼합하여 2주간격으로 intradermal injection으로 3회 주사한 후 1주후 마지막 보조주사(booster)로 incomplete Freund's adjuvant로 혼합한 것을 같은 방법으로 주사하고 1주후 채혈하여 항혈청을 준비하였다. 항체의 분리·정제는 Sepharose-CL 4B-Protein-A affinity column을 사용하여 Kim(1983)의 방법에 따라 실시하였다.

### 2. Immunoaffinity column 준비

Protein-A affinity column으로 분리·정제된 항정자항체 35mg을 먼저 coupling buffer(0.01M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8.3, 0.5M NaCl)에 대하여 투석시켜 1.5g의 CNBr-activated 4B(Pharmacia, Sweden)을 1mM HCl에 녹인것과 함께 합하여 실온에서 2시간 반응시키고 coupling buffer로 2-3회 세척하고 Tris-HCl buffer(0.01M, pH 8.0)로 실온에서 2시간 방치하고 연속적으로 0.1M acetate buffer(pH 4.0, 0.5M NaCl)와 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0, 0.5M NaCl)로서 세척한 후 사용할때까지 4°C에서 보관하였다.

### 3. 정자 표면 항원(sperm surface antigen)의 분리 정제, 및 전기영동

정자( $10^9$  Cells/ml)를 PBS(0.01M, pH 7.0)로 세척한후 균질하여 27,000g로 15분간 원심분리하여 1% deoxycholate와 1% Nonidet P40을 함유하는 20ml PBS에 다시 부유시켜 실온에서 1시간 교반시키고 다시 27,000g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 60ml되게 Tris-HCl buffer로 조정하였다. 이렇게 준비된 용액을 Tris-HCl buffer로 평형시킨 항정자항체로 coupling된 immunoaffinity column과 충분히 반응시킨 후 1% SDS를 함유하는 Tris-HCl buffer로 용출시켰으며 각 분획을 280nm에서 O.D가로 확인하였다. 용출된 분획은 PBS(0.05M, pH 7.4)로 투석시켜 다음 실험에 사용하였다. 전기영동은 정(1988)의 방법에 따라 Phast Gel Gradient 10-15(Code. No. 17-0540-01, Pharmacia)를 사용하여 실시하였다.

#### 4. ELISA 과정

그림 1에 제시된 원리에 따라, 먼저 분리·정제된 정자표면항원을 coating buffer(0.05M sodium carbonate buffer, pH 9.6)에 녹여 0.2ml씩 microtiter plate(Nunc, Denmark)에 분주하여 4°C에서 overnight 반응시키므로써 coating시키고 3% BSA로 1시간 실온에서 추가 반응시키므로써 정자표면항원을 고정화시켰다. 여기에 적절히 희석된 환자의 혈청 0.2ml을 분주하여 4°C에서 overnight 혹은 37°C에서 2시간 반응시켜 PBS로 2회 세척하고 다시 효소 HRP(Horse radish peroxidase: Sigma, USA)를 이차항체인 Goat anti-human IgG(H+L)(Sigma, USA)에 conjugation시킨 Goat anti-human IgG-HRP conjugate를 첨가하여 37°C에서 2시간 추가 반응시켰다. 반응이 끝난후 PBS로 2-3회 세척한 후 HRP의 기질인 OPD(O-phenylenediamine dihydrochloride; Merk, W. Germany) 용액 0.2ml(40mg/100ml)을 첨가 37°C에서 30분 반응시킨 후 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(2N) 50μl를 첨가함으로써 효소·기질반응을 중지시켜서 490nm에서 Minireader II (Dynatech, Lab. Inc., USA)로 O.D.를 측정하였다.

#### 5. CIA 과정

기본적인 과정은 ELISA와 동일하나 항원·항체반응이 끝난 후 화학발광체인 Aminobutylethyl-isoluminol hemisuccinate(ABEI-H; LKB, Wallac, Finland)로 그림 2에 나타난 순서대로 이차항체인 Goat anti-human IgG에 coupling시킨 conjugate를 첨가하여 반응을 시키고 2-3회 세척한 후 Clinilumat luminometer(Berthold, W. Germany)를 사용하여 0.3ml(1mg/ml)의 microperoxidase(MPII; Sigma, USA)와 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>용액을 동시에 주입함으로써 발생하는 빛의 양을 10초간 적분함으로써 측정하였다.

#### 6. ELISA 및 CIA에 의한 남성 혈청 중 항정자항체 조사

중앙대학교 의과대학 부속병원 및 중앙대학교 부속 용산병원 비뇨기과에 내원한 환자중 정계정맥류 20례, 원인불명의 무정자증 12례, 원인불명의 펄정자증 4례, 정관절제수술 9례, 부고환염 5례, 정류고환 5례, 고환과열 2례, 고환염전 1례, 전립선은도파열 및 요로감염 1례, 선천성 무정관증 1례, 음낭좌상 1례, 발기부전

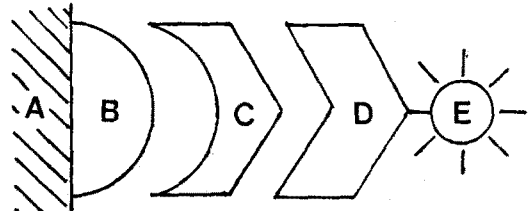


Fig. 1. Schematic presentation of ELISA and CIA for the assay of anti-sperm antibody.

- A: Microtiter plate
- B: Purified sperm surface antigen
- C: Sperm autoantibody in serum
- D: Goat anti-human IgG
- E: HRP or ABEI-H

- I. Preparation of activated ABEI-H ester  
 $ABEI-H(4mg) + N-HS(4mg) + DCC(4mg)$   
 $+ 0.2ml \text{ of DMF}$   
 ↓  
 Stirring at Room temperature for 2hrs  
 ↓  
 Centrifugation at 2000 r.p.m for 10min and removing the resulting urea(S-1)
- II. Conjugation of anti-sperm antibody to the activated ABEI-H ester  
 Adding goat anti-human IgG(1mg/ml) prepared in 0.13M NaHCO<sub>3</sub>(pH 8.0) to 10μl of S-1.  
 ↓  
 Stirring at Room temperature for 2hrs  
 ↓  
 Dialysis against PBS(0.05M, pH 7.4)  
 ↓  
 Keeping at -20°C until required

Fig. 2. Preparation of goat anti-human IgG coupled to chemiluminescence marker ABEI-H.

증 4례, 단소음경 1례의 혈액을 채취하고 혈청을 분리한뒤 -20°C에서 냉동 보존하였다가 필요에 따라 ELISA와 CIA 그리고 Kibrick(이규백과 김세철, 1985)법으로 분석하여 상호 비교하였다.

## 결 과

### 1. 정자에 대한 항혈청 생산

정자의 표면항원 분리를 위한 immunoaffinity column을 만들기 위하여 토끼에 정자를 주사하여 이에 대한 항혈청을 생산하고 항체역가를

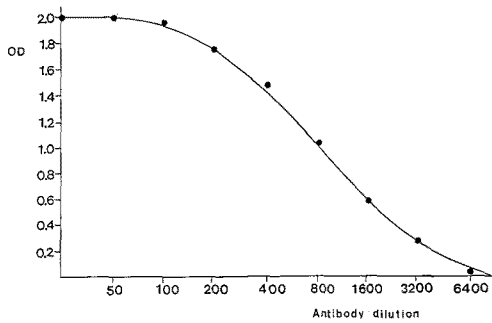


Fig. 3. Titration curve for rabbit anti-sperm antibody in serum with indirect ELISA.

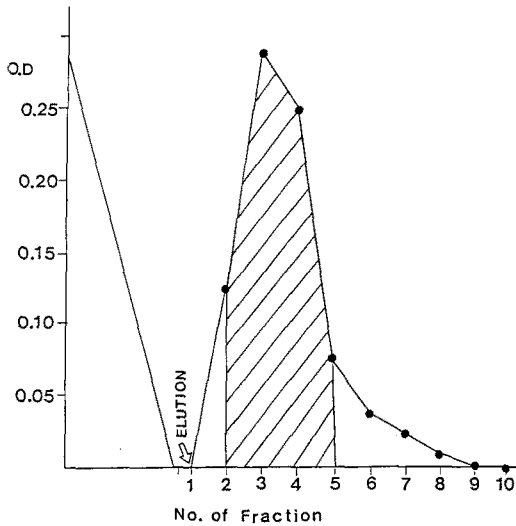


Fig. 4. Chromatogram for the purification of sperm surface antigen with rabbit anti-sperm antibody Sepharose affinity column.

Paul등(1983)의 방법에 따라 정자를 coating시키고 여기에 각기 농도가 다른 일정한 양의 항혈청을 첨가 반응시켜 세척한 후 다시 Goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate와 반응시킨 다음 HRP의 기질인 OPD와 반응시키고 490nm에서 O.D.를 측정하였을때 그림 3과 같은 결과를 얻었다. 항혈청의 희석배율이 높아짐에 따라 O.D.는 낮아져서 6,400배의 희석에서도 반응을 나타내었다.

## 2. 정자의 표면 항원의 분리

토끼에 인간 정자를 면역화시켜 얻은 항혈청으로부터 분리정제된 항정자항체를 Sepharose 4B에 고정화시킨 immunoaffinity column에 균질화된 정자를 통과시키고 1% SDS를 함유하는 Tris-HCl buffer로 용출시켰을 때 그림 4와

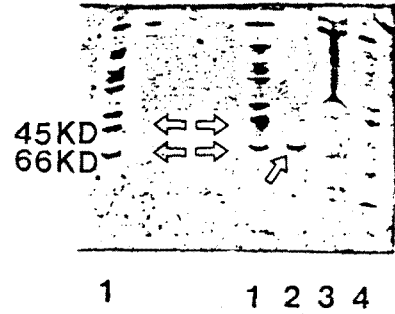


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of sperm surface antigen.

- 1: Molecular weight marker
- 2: Purified sperm surface antigen
- 3: Solubilized semen protein
- 4: Solubilized sperm surface protein

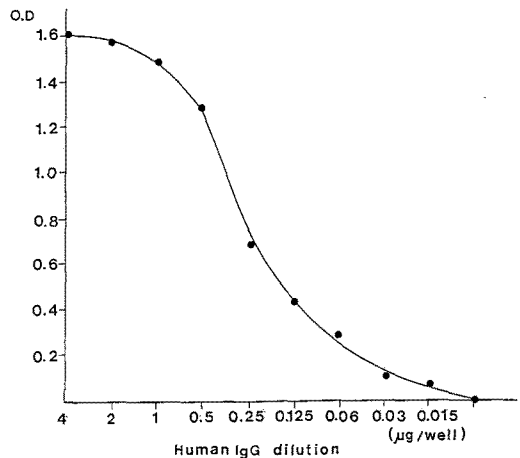


Fig. 6. Activity of HRP-labelled goat anti-human IgG conjugate used in ELISA with various amount of human IgG coated to the microtiter plate.

같은 결과를 나타내었다. 2번째 tube부터 용출되기 시작하여 3번째 tube에서 0.3정도의 O.D.가로서 가장 높았으며 그후 차차 감소하기 시작하여 6번째 tube이후 부터는 매우 낮은 O.D.를 나타내어 2번째에서 5번째 tube에서 거의 다 용출된 것으로 판단되어진다. 이 결과에 따라 2, 3, 4, 5번째 tube을 함께 모아 coating용 및 전기영동을 위한 분석용으로 사용하였다.

SDS-polyacrylamide 전기영동 결과는 그림 5에 나타난 바와 같이 affinity column으로 분리하기 전의 것과 정액내 가용성 단백질의 경우 여러개의 band가 나타났으나 분리·정제된 분획의 경우 단일 band를 나타내었으며 분자량은 약 60KD정도인 것으로 판단된다. 이와 같

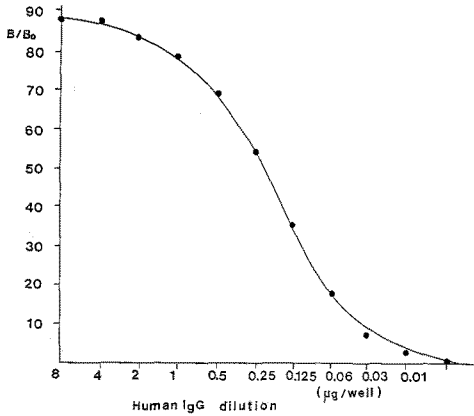


Fig. 7. Activity of chemiluminescence ABEI-H-labelled rabbit anti-human IgG conjugate used in CIA with various amount of human IgG coated to the plastic tube.

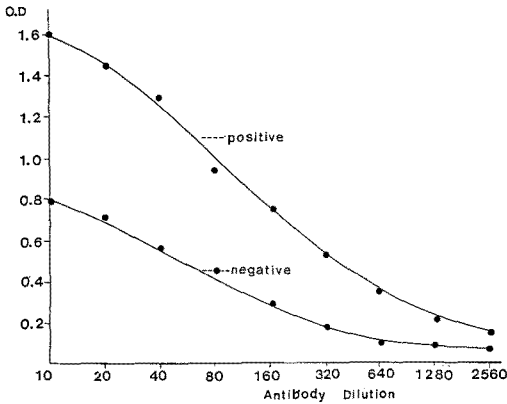


Fig. 8. Titration curves of positive and negative serum samples in ELISA.

은 결과는 Lee등(1984)의 결과와 거의 일치하는 것이다.

### 3. 효소 HRP 및 화학발광체 ABEI-H로 표지된 2차항체의 활성도

ELISA 및 CIA용으로 사용된 두가지의 conjugate 즉 Goat anti-human IgG-HRP 및 Rabbit anti-human IgG-HRP의 활성도를 측정하기 위하여 분리정제된 human IgG를 microtiter plate에 well당  $4\mu\text{g}$ 에서  $0.015\mu\text{g}$ 되게 coating시켜 두 conjugate를 각각 첨가하여 반응시키고 ELISA와 CIA의 측정방법에 따라 조사하였던 바 그림 6 및 그림 7과 같은 결과를 얻었다. 나타난 바와 같이 human IgG의 양이 감소함에 따라 O.D가 및 빛의 양이 감소하는 경향을 나타내어 두 conjugate의 반응 활성도는 매우 좋

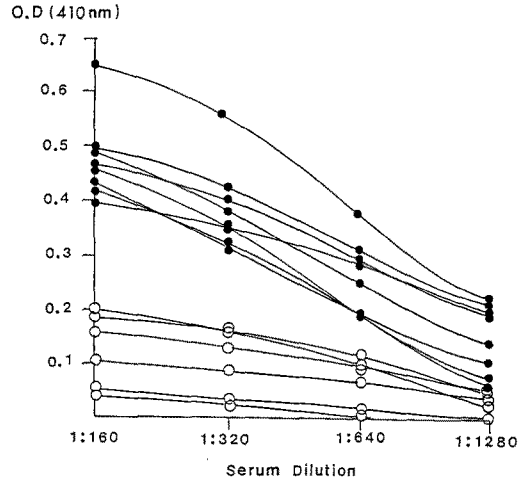


Fig. 9. Serum dilution curves in ELISA.

은 것으로 간주되어지며 항정자항체 검출을 위한 두 방법, 즉 ELISA 및 CIA을 위한 conjugate로 사용될 수 있음을 나타내주는 결과다.

### 4. ELISA에 의한 positive 및 negative 혈청의 titration

Negative control sample로 fetal cord serum을 사용하고, positive반응을 나타내는 sample하나를 임의로 선택하여 두 혈청의 희석곡선을 작성하였던 바 그림 8과 같은 결과를 얻었다. 나타난 바와 같이, positive와 negative간에는 현격한 차이의 반응을 나타내었다. 그러나 negative에서도 항체의 희석치가 높아갈수록 반응 정도가 떨어지는 경향을 나타내어 마치 항정자항체가 fetal cord serum에 존재하여 특이한 반응(specific reaction)을 보여주는듯 하다. 이것은 fetal cord serum내에 있는 항정자항체가 아닌 다른 면역글로부린이 tube표면에 비특이적으로(nonspecific) 흡착되므로 일어나는 소위 'nonspecific binding'(NSB)인 것으로 사료된다.

또한 negative sample과 상대적으로 비교하여 O.D가 혈청이 희석됨에 따라 감소하여 0.1정도의 차이를 나타내는 그 때의 희석치를 'titer'라고 할때 그림 8의 positive sample은 약 1:260의 titer를 나타내었다.

그림 9는 negative인 fetal cord serum이 갖는 NBS의 O.D가를 감한 후 여러 남성환자의 혈청을 1:160에서 1:1280까지 2배 희석하여 정자 표면항원이 이미 coating된 tube와 반응시켜 나타나는 O.D가를 측정한 혈청희석곡선 (serum dilution curve)으로, 혈청이 희석됨에

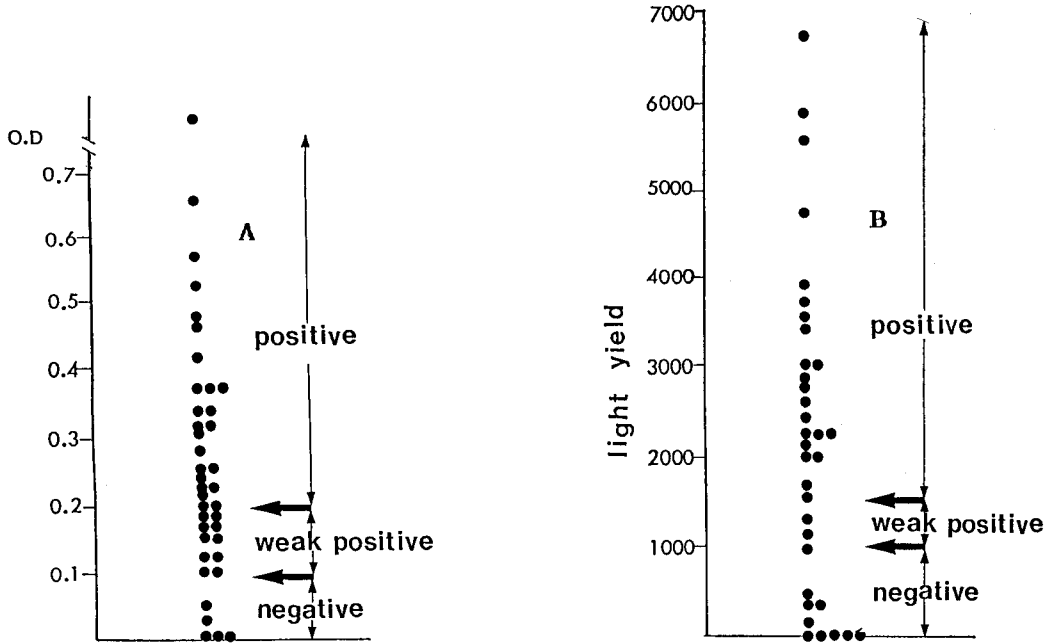


Fig. 10. Distribution of male serum according to the results determined by ELISA(A) and CIA(B) for the detection of anti-sperm antibodies.

따라 비례적으로 O.D.가도 낮아져서 급격한 경사(slope)를 나타내는 군(-●-)과 낮아지는 정도가 현격하지 않은 즉 완만한 경사를 나타내는 군(-○-)으로 대별할 수 있음을 보여준다.

### 5. ELISA에 의한 항정자항체 검사를 위한 기준치 설정과 이에 의한 환자혈청분석

항정자항체 검사에 있어서 가장 문제시 되는 것중의 하나가 positive와 negative를 엄격히 구분할 수 있는 기준치(Threshold)를 설정하는 것이 매우 어렵다는 점이다. 본 연구에는 그림 9의 결과에 따라 크게 3가지로 구분하였다. 즉 첫째, 급격한 경사를 나타내면서 1:160희석치에서 O.D.가 0.2이상을 나타내는 것을 'positive'로, 둘째, 완만한 경사를 나타내지만 0.1이상의 O.D.를 나타내는 것을 'weak positive'로 셋째, 0.1이하의 경우를 'negative'로 대별하였다. 혈청희석치에서 1:160이 절대적인 것은 물론 아니다. 그림 9에 나타난 바와 같다. 1:1280에서도 명확히 구분할 수 있는 sample도 있으나 희석정도가 커짐에 따라 O.D.가도 낮아지기 때문에 시료간의 차이를 구별하기가 어렵기 때문에, 여기서는 NSB도 낮으면서 시료간의 차이를 쉽게 구별할 수 있는 희석치로 1:160을 택했다.

이와 같은 방법으로 임상조건이 각기 다른 62환자로 부터 혈청을 채취해서 분석하였던 바 그림 10(A)에서 보는 바와 같이 O.D.가 2.0이상(over)으로 아주 강한 positive를 나타내는 것이 1례(선천성 무정관증), positive를 나타내는 것이 26례, weak positive가 17례, 18례가 negative를 나타내었다.

### 6. ELISA와 CIA 그리고 Kibrick test와의 상관관계

ELISA와 같은 방법으로 CIA에 있어서도 그림 10(B)에 나타난 대로 3영역, 즉 1,000이하를 'negative'로, 1,000-1,500사이를 'weak positive'로, 1,500이상을 positive로 나누어 세방법의 상관관계를 조사하였다. 표에서 보는 바와 같이 ELISA와 CIA는 73.4%가 일치하는 결과를 보인 반면 ELISA와 Kibrick test와는 43.8%로 오히려 불일치하는 부분이 더 많았다. CIA와 Kibrick test간에 있어서는 56.2%로 ELISA보다는 12%정도 더 높은 일치성을 보였으나 유의성 있는 상관관계라 볼 수 없다. ELISA와 CIA의 비교에서 49례중 13례의 불일치성을 나타내었지만 이중 11례는 'weak positive'로서 명확한 구분을 짓기가 애매한 것이었기에 만약 이것을 'negative'로 간주할 경우 96

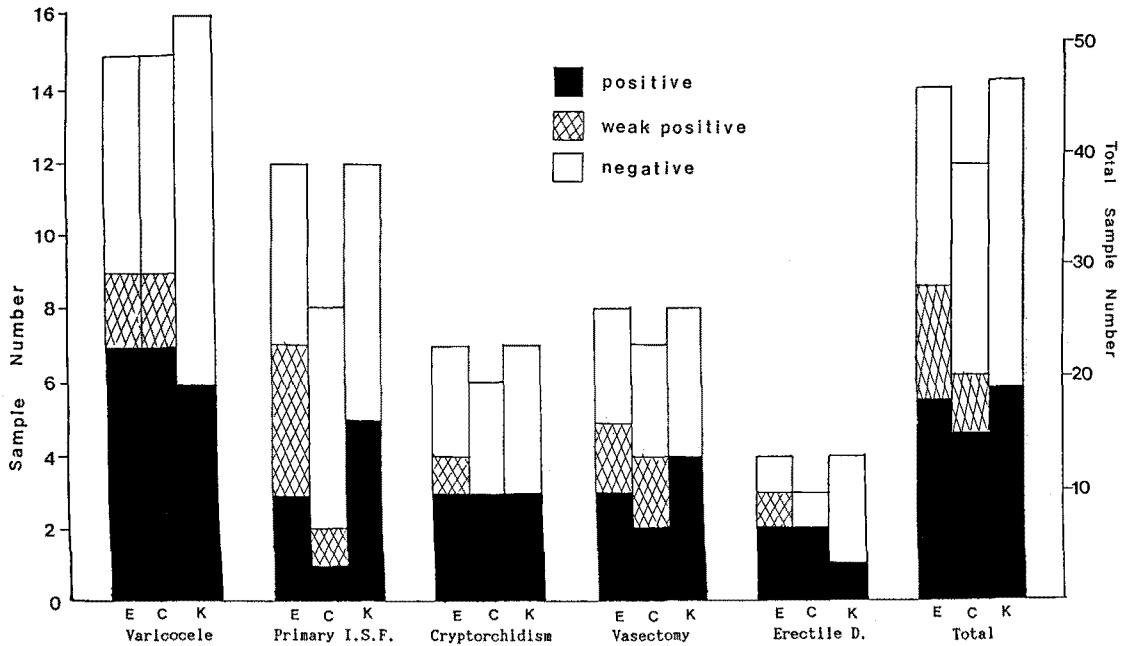


Fig. 11. Comparison of results determined by three different methods, ELISA(E), CIA(C) and Kibrick test(K) with male serums in different diagnoses. I.S.F. stands for idiopathic spermatogenic failure and D. is dysfunction.

%의 높은 일치성을 나타내는 결과로서 거의 같은 결과라고 할 수 있겠다. 이와 같은 결과는 두 방법의 기본 원리가 동일하고 다만 detection 방법에서 ELISA의 경우 효소·기질반응을 CIA에 있어서는 화학발광반응에 의한 빛의 양을 측정하는 것만이 다를 뿐이기 때문이다. 특기할 만한 사실은 정관형성부진 환자의 경우 ELISA결과는 가장 높은 O.D.를 나타내었으나 Kibrick test는 'negative'로 나타났고 또한 정관 절제한 환자의 1례에 있어서 Kibrick test에서 1:512의 아주 강한 양성을 보인 반면 ELISA와 CIA에서는 모두 음성을 나타내어 극단적인 상반되는 결과를 보이기도 했다.

### 7. 임상적 소견에 의한 세방법의 유의성 평가

이론적으로 항정자 항체의 출현을 거의 예측할 수 없는 질환은 발기부전증과 당뇨음경, 고환과열, 그리고 고환과 부고환의 손상이 동반되지 않는 음낭타박상이라 할 수 있겠다(김세철, 1985). 이와 같은 소견을 갖는 7례에서 Kibrick test의 경우 발기부전증환자 1례에서 강한 양성을 보인것 이외에는 모두 음성을 보였으며 ELISA는 4례, 그리고 CIA는 3례가 음성을 보여 Kibrick test가 신빙성이 높은듯 보

였으나 통계적 유의성을 보이기에는 조사 대상수가 적어 보다 체계적인 연구가 필요하다고 본다.

양성과 음성의 출현빈도를 임상소견에 따라 세방법 간의 차이를 그림 11에 나타내었다. 음성에 비해 명확한 양성을 나타내는 비율이 모든 경우에 있어서 대체적으로 낮게 나타났다. 특히 원발성 특발성 정자형성부진 환자의 경우 음성비율이 다른 것에 비해 더욱 낮은 경향을 보였다.

## 고 찰

본 연구의 목적은 항정자항체검사를 위한 면역분석법(immunoassay) 이용에 있어서 가장 큰 문제점의 하나인 정자고정의 불균일성을 극복하기 위하여 항정자항체를 copuling시킨 immunoaffinity column으로 정자표면항원을 분리한 것을 사용하여 균일하게 고정시키고, 또한 면역분석법에 있어서 가장 널리 이용되고 있는 ELISA법 대신에 화학발광반응을 이용한 CIA법을 개발하여 기존방법인 Kibrick법과 비교함으로써 ELISA 혹은 새로운 면역분석법인 CIA의 이용 가능성을 검토하고자 함이었다.

**Table 1.** Comparisons among three different methods for the assays of anti-sperm antibodies in male serum corrected from various patients with different diagnoses.

Diagnosis	Results			Total Number tested
	Comparison group	Argee	Not-agree	
Varicocele	A	8	4	12
	B	5	9	14
	C	7	5	12
Primary	A	6	3	9
	B	6	6	12
	C	7	2	9
Cryptorchidism	A	5	1	6
	B	2	5	7
	C	3	3	6
Vasectomy	A	5	2	7
	B	6	2	8
	C	3	4	7
Epididymitis	A	3	0	3
	B	2	2	4
	C	2	1	3
Others	A	9	3	12
	B	4	8	12
	C	5	6	11
Total	A	36(73.4)	13(36.6)	49(100)
	B	25(43.8)	32(56.2)	57(100)
	C	27(56.2)	31(43.8)	48(100)

A: ELISA vs CIA, B: ELISA vs Kibrick, C: CIA vs Kibrick

정자자체를 Phytohemagglutinin(PHA-M)으로 고정화 시킨 것과 본 연구에서 시도한 분리·정제된 정자표면항원을 coating한 것과 비교하였을 때(결과는 제시되지 않았음) 후자가 반복성이 훨씬 좋았다. 이것은 정자자체에 비해 일정한 양을 균등하게 배분할 수 있고 또한 plastic tube에 coating되는 정도가 균일하게 되기 때문인 것으로 판단된다. 또한 coating과정이 매우 간단하기 때문에 따라서 정자고정화 문제로 야기되는 여러 단점들을 해결할 수 있는 방법으로 이용될 수 있을 것으로 전망된다.

항정자항체를 표준화 또는 객관화 시키는데 있어서 가장 큰 어려움의 하나는 양성과 음성을 구분할 수 있는 명확한 기준설정이 어렵다는 점이다. 이것은 항정자항체의 생리화학적 또는 임상학적인 의미가 아직 완전히 밝혀져 있지 않기 때문에 보고자간에 있어서 판별기준이

다르고 따라서 분석결과도 달랐다고 생각된다. 본 연구에서는 항혈청회석곡선에 나타나는 기울기와 1:160 희석치에서 나타나는 O.D.가로 구분하였는데, 일반적으로 항원·항체반응에서 급경사를 나타낼 경우 항원에 대한 항체의 친화도(affinity)가 높은 것을 의미한다고 한다(Ekins, 1976). 따라서 그림 9의 결과로 보건데 혈청내 존재하는 항정자항체는 친화도가 높은 것과 낮은 것 두가지가 존재한다고 할 수 있겠다. 항정자항체 검사에서 양성을 나타내더라도 남성의 불임과는 상관관계가 없는 경우는 바로 낮은 친화도 때문에 일어나는 결과로도 해석할 수 있다고 본다. 그러나 명확한 결론을 내리기 위해선 보다 체계적인 연구가 있어야겠지만 매우 흥미있는 연구대상이라 믿어진다.

ELISA와 CIA는 원리적으로 동일하기 때문에 비슷한 결과를 얻는다는 것은 충분히 예견될 수 있는 사실이다. 그러나 어느 방법을 선택하느냐에 있어서는 반복성, 간편성, 신속성 또는 경제성을 검토해야겠지만 이와 같은 요인들을 평가하기엔 본 연구의 결과만으론 부족하지만, ELISA와 비교할때 CIA가 갖는 가장 큰 장점은 ELISA에서 marker로 사용되는 효소에 비해 CIA에서 사용되는 화학발광체의 안정도(stability)가 훨씬 높다는 점과(Barnard et al., 1985) 측정되는 단위가 크기 때문에 시료간의 차이를 더욱 명확히 구분할 수 있다는 점이다.

본 연구에서 시도된 방법은 항정자항체 면역글로부린의 isotype을 선별 정량할 수 있는 방법은 아니다. Bronson등(1981)이 개발한 immunobead test(IBT)는 정자의 각 부위에 따른 항체는 물론, 항체의 isotype까지 확인할 수 있는 장점이 있어 최근에는 이 방법을 많이 활용하고 있는 추세다(정동근 등, 1989). 그러나 본 연구에서 개발된 방법으로도 IBT가 갖는 장점을 갖는 방법으로 개선될 수 있다. 즉 정자표면항원 분리 환자의 혈청내에 존재하는 항정자항체를 이용하면 여러가지의 정자표면항원을 분리하여 고정시킬 수가 있어 정자의 각 부위에 따른 항정자항체를 검사할 수가 있다. 또한 면역글로부린의 각기 다른 isotype과 특이하게 반응하는 이차항체를 효소나 화학발광체로 표시시킨 것을 사용하면 항체의 isotype까지 구분해서 확인할 수가 있다. IBT법에 비해 ELISA나 CIA가 갖는 장점은 살아있는 정자를 사용할 필요가 없고 한꺼번에 많은 수의 시료를 채취할 수 있을 뿐만 아니라 결과 자체를



객관화할 수 있고 또한 정량까지 가능하다는 점을 들 수 있겠다(김종배 등, 1990).

이상의 연구결과들을 종합하여 불 때 항정자 항체검사를 위한 방법으로 본 연구에서 시도한 즉, 분리·정제된 정자표면항원을 이용한 ELISA 혹은 CIA를 사용할 수 있다고 사료되나 이 방법을 상법으로 사용하기 위해선 보다많은 그리고 다양한 경우의 시료를 분석하고 평가하는 보다 폭 넓은 연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

항정자항체를 검사할 수 있는 면역분석법 개발을 위하여 immunoaffinity chromatography로 분리·정제한 정자표면항원을 microtiter plate에 고정화 시킨것과 효소와 화학발광제로 표지된 2차항체를 사용하여 ELISA법과 CIA법을 개발하고 이 방법의 이용 가능성을 검토하기 위하여 기존 방법인 Kibrick test법으로 임상조건이 다른 남성혈청을 분석·비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 인간정자 표면항원을 분리하기 위한 immunoaffinity column을 제작키 위하여 인간정자료를 토끼에 주사하여 정자에 대한 항혈청을 생산하였으며 이를 Protein A-Sepharose column으로 분리·정제하여 CNBr activated Sepharose-4B에 coupling시켜 immunoaffinity column을 제작하였다. 이 column에 균질화된 정자를 반응시키고 SDS를 넣은 Tris-HCl buffer로 용출시켰을 때 60KD정도의 분자량을 갖는 분획을 얻었다.

2. 분리·정제된 human IgG를 microtiter plate에 농도를 달리하여 고정화 시키고 ELISA용 Goat anti-human IgG-HRP conjugate와 CIA용 Rabbit anti-human IgG-ABEI-H conjugate와 반응시켜 그 활성도를 측정하였던 바 농도에 따라 반응의 정도가 감소하였다.

3. ELISA법으로 양성혈청의 희석곡선을 작성하였을때 경사가 완만한 것과 급한 것의 두 종류의 경향을 띤 곡선으로 대별되었으며 완만한 경사를 나타내는 것에서 1:160 희석치에서 O.D가 0.1이하를 음성, 0.1이상 0.2이하를 약 양성(weak positive) 그리고 0.2이상을 양성으로 판별하였다.

4. ELISA, CIA 그리고 Kibrick test로 동일 시료를 분석·비교하였던바 ELISA와 CIA는 거의 동일한 상관관계를 보였으나 Kibrick test와

는 50% 수준만 일치함을 보였다.

## 인 용 문 헌

- Barnard GJR, Kim JB, Brockelbank JL, Collins WP: Recent advances in Chemiluminescence immunoassay. In: Van Dyke K(ed) Instrumentation for the detection of Chemiluminescence, 1985.
- Bronson RA, Copper GW, Rosenfeld DL: Ability of antibody-bound human sperm to penetrate zona-free hamster ova *in vitro*. *Fertil Steril* 1981, 36, 778.
- Ekins RP: General principles of hormone assay. In: Loraine JA and Bell ET(eds) Hormone assays and their clinical application. Churchill Livingstone 1976, 1-72.
- Franklin RR, Dukes CD: Antispermatozoal antibody and unexplained infertility. *Am J Obstet Gynecol* 1964, 89, 6.
- Friberg J: A simple and sensitive micro-method for demonstration of sperm-agglutinating activity in serum from infertile men and women. *Acta Obstetrica Gynecologica Scandina* (Suppl 36), 1974, 21.
- Gripenberg M, Kurki P: Demonstration of human autoantibodies by quantitative enzyme immunoassays. *J Immunol Methods* 1986, 92, 145-159.
- Haas GGJr, Cines DB, Schreiber AD: Immunologic infertility: Identification of patients with anti-sperm antibody. *The New Zealand J Med* 1980, 303, 722.
- Haas GGJr, Weiss WR, Wolf DP: Identification of antisperm antibodies on sperm on infertile men. *Fertil Steril* 1982, 38, 54-61.
- Hjort T, Hansen KB: Immunofluorescent studies on human spermatozoa. I. The detection of different spermatozoal antibodies and their occurrence in normal and infertile women. *Clin Exp Immunol* 1971, 8, 9.
- Isojima S, Tsuchiya K, Koyama C, Naka O, Adachi H: Further studies on sperm-immobilizing antibody found in sera of unexplained cases of sterility in women. *Am J Obstet Gynecol* 1972, 112, 119.
- 정동근, 신창재, 문신용, 장윤석: Immunobead

- 검사로 검출된 항정자항체가 인간난자의 체외수정 및 분할에 미치는 영향. 대한불임학회 1989, 16, 2, 153-171.
- 정미경: Immunoaffinity Chromatography에 의한 H-Y antigen의 분리·정제 및 그 정량을 위한 면역분석법 개발에 관한 연구. 건국대학원 석사논문
- Kibrick S, Belding DL, Merrill B: Methods for the detection of antibodies against mammalian spermatozoa. II. A gelatin agglutination test. *Fertil Steril* 1952, 3, 430.
- Kim JB: Development of chemiluminescence immunoassay for the measurement of plasma steroid and urinary steroid glucuronides. Ph.D. thesis London University.
- 김종배, 최경호, 김윤규, 권오중, 김창규, 김세철: Human IgG정량을 위한 indirect CIA 개발. 준비중 1990.
- 김세철: 면역학적 남성불임증. 한국의 과학 1985, 17, 91-102.
- Lee CYG, Wong E, Menge AC: Monoclonal antibodies to rabbit sperm auto-antigens. *Fertil Steril* 1984, 41, 131.
- 이규백, 김세철: 항정자 항체 검출에 있어서 효소면역분석법, gelatin 정자응집검사법 및 정자부동화검사법의 비교관찰. 대한 비뇨기학회지 1985, 26, 5, 445-452.
- O'Rand MG, Irons GP, Porter JP: Monoclonal antibodies to rabbit sperm autoantigens. I. Inhibition of in vitro fertilization and localization on the egg. *Biol Reprod* 1984, 30, 721.
- Paul S, Bankloh V, Mettler L: Enzyme-linked immunosorbent assays for sperm antibody detection and antigenic analysis. *J Immunolog Methods* 1983, 56, 193-199.
- Raymond MY, Ing RMY, Wang S, Brennecke AM, Jones WR: An improved indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of anti-sperm antibodies. *Amer J Reprod Immunol Personal Manuscript*, 1984.
- Rose NR, Hjort T, Rumke P, Haper MJK, Vyazov OE: Technique for detection of iso- and autoantibodies to human spermatozoa. *Clin Exp Immunol* 1976, 23, 175.
- Rümke P: The presence of sperm antibodies in the serum of two patients with oligospermia. *Vox Sang* 1954, 4, 135.
- Wilson L: Sperm agglutinins in human semen and blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954, 84, 642.
- Yanagimachi R, Okada A, Tung KSK: Sperm autoantigens and fertilization. II. Effects of anti-guinea pig sperm autoantibodies on sperm-ovum interactions. *Biol Reprod* 1981, 24, 512.