

# 인간의 체외수정과 투명대제거 햄스터난자의 침투능에 관한 연구

경희대학교 의과대학 산부인과학교실 (불임클리닉)

김재명 · 서병희 · 이재현

건국대학교 축산대학 축산학과

정길생

## Correlation for Human in Vitro Fertilization with the Zona-Free Hamster Penetration Assay

Jae Myeoung Kim, M.S., Byung Hee Suh, M.D. and Jae Hyun Lee, M.D.

*Infertility Clinic Department of Obstetrics and Gynecology, Kyung Hee University, College of Medicine, Seoul, Korea*

Kil Sheng Chung, Ph. D.

*Department of Animal Husbandary, Kon-Kuk University, Seoul, Korea*

### = Abstract =

We compared fertilizing potential measurements by the zona-free hamster egg penetration assay with the in vitro fertilization and embryo transfer program was evaluated for their ability to fertilize zona free hamster egg.

Spermatozoa from 12 presumably fertile donors and from the male partners of 56 infertile couples were evaluated for their ability to fertilizing potentials. Penetration rates of fertile donors were  $36.2 \pm 27.7\%$ ; Fertilization rates of infertile couples between with normal semen parameters and with abnormal semen parameters were  $28.7 \pm 19.1$ ,  $5.7 \pm 8.9\%$ , respectively. Sperm motility of couples with penetration rates between on 15-30% and on  $30 >$  were  $54.1 \pm 4.6$ ,  $55.5 \pm 8.3\%$  respectively.

Hamster penetration rates of couples participating in an in vitro fertilization and embryo transfer program was  $38.9 \pm 29.9\%$ . But in one case, a positive fertility assessment was obtained in the absence of fertilization of the wife's eggs attributable to egg immaturity.

This method may have potential value as a diagnostic tool in evaluation human sperm fertilization capacity which avoids the ethical and logistical problems associated with fertilizing of human eggs in vitro.

### 서론

정자의 수정능력 (fertilizing potential)을 평가하는 검사방법으로서 오래전부터 시행되어 온 정액검사법은 정액량, 정자의 농도, 정자의 운

동성, 기형을 및 정액의 pH를 검사하는 방법으로서 정자회소증, 정자무력증, 정자사멸증과 무정자증과 같은 극단적인 증상을 지닌 경우를 제외하고 정상인의 정액성상을 지닌 불임남성 정자의 수정능력을 평가하기에는 어려움이 있다.

Yanaghimachi등(1976)이 수정능력을 획득한 정자는 투명대를 제거한 햄스터난자와 이종간 체외수정을 실시하면 정자가 난자를 침투하

이 논문은 경희대학병원 특진연구비 보조로 이루어진 것임.

여 이종간의 수정이 발생한다는 보고이래 여러 연구자 (Atiken et al., 1982; Campena, 1981; Karp et al., 1981; Roger, 1979; Tyler et al., 1981)들에 의해서 남성불임의 진단방법으로 이용되고 있다. 즉, 이들 검사법은 정자의 수정능 획득유무 (Roger, 1979), 햄스터난자에 침입한 정자의 핵형검사 (Rudak, 1984), 정자에 대한 자가항체 유무 (Menge and Black, 1979) 및 정상상체정자의 성숙유무 (Moore, 1983) 등을 평가할 수 있는 검사방법으로서 새로운 치료방법을 제시함으로써 남성불임치료에 도움을 줄 수 있는 것으로 사려된다.

그러나 이들 검사법도 검사자들에 따라서 검사방법 및 조건 및 결과치의 해석이 서로 달라서 Overstreet (1980b)에 의하면 불임남성군의 햄스터난자의 침투율이 (이하 HPA, hamster penetration assay) 14-100%, Karp (1981)과 Campena (1981)은 12%, Pryor (1981)과 Tyler 등 (1981)은 2%, Tyler 등 (1981)은 62%, Zausner - Guelman 등 (1981)은 81% 및 Cohen (1982c) 등은 54%를 나타냈다. 한편 정상적으로 아이를 낳은 경험이 있는 남성군에서 위음성 결과 (false negative)를 나타내거나 불임환자에서 위 양성결과 (false positive)를 나타내는 등 아직 이들 검사 방법이 확립되어 있지 않고 결과치의 해석에도 많은 문제를 지니고 있다.

이에 저자들은 체외수정 및 배아이식 프로그램에 적용된 환자를 대상으로 하여 인간난자의 수정여부 및 난활율이 본 크리닉에서 시행되고 있는 HPA의 결과치와 어떠한 관계를 지니고 있는지를 조사하기 위하여 본 실험을 실시하였다.

## 연구 방법

### 1. 연구대상

경희의료원 산부인과 불임클리닉에 내원하는 환자중 불임증을 주소로 본 크리닉에 등록된 후 필요한 검사 치료요법을 받고 있는 환자들로서 자연배란의 정상월경주기를 갖고 있었다.

### 2. 과배란 유도

성선자극 호르몬 (FSH, hMG)을 투여한 경우 생리주기 제 3일부터 첫 이틀동안, 고용량요법은 하루에 2회 2 ampules씩 오전 10시와 오후 4시에, 저용량요법은 오후 4시에 2 ampules를 근육주사하였다. 그후 연속하여 hMG를 2 ampules/day를 근주하여 혈중 E2치가 900 pg/ml

이상이 되면 hMG투여를 중단했고, 그 이하인 경우 자궁경관 점액변화와 우의난포의 직경이 17mm 이상이 되거나, 14mm 이상 난포가 3개 이상이면 hMG투여를 중단하였다. hMG투여후 28-50시간 사이에 hCG 10,000 IU를 근육주사하였다.

### 3. 난자채취 및 수정

hCG주사후 32-36시간 사이에 질식초음파를 이용한 질식난포 천자로 난자채취를 실시하였다. 채취된 난자는 CO<sub>2</sub> incubator내에서 6-10시간동안 전배양 실시한 후 전처리된 정자 (5×10<sup>6</sup>/ml)을 첨가하여 수정을 실시하였다. 수정후 14-17시간 후 수정의 유무를 판별한 뒤 수정된 난자는 추가배양을 실시하여 4-8세포기 배에서 wallace catheter를 사용하여 자궁에 이식하였다.

### 4. 정액검사 및 정자의 처리

2일 이상 금욕을 한 후 수음법으로 멸균된 용기에 사정된 정액을 상온에 30분간 정치시켜 액화를 유도한 후 WHO의 검사방법에 준하여 정액분석기를 이용하여 정자검사를 실시하였다. 정액검사후 일정량의 Ham's-F 10배양액과 혼합한 뒤 1000 rpm의 속도로 8분간 원심분리를 한 후 상층액을 제거한 뒤 재차 배양액을 첨가한 후 원심분리를 하였다. 상층액 제거후 펠렛이 흐트러지지 않게 배양액을 2-3ml 첨가한 후 45°의 각도로 눕혀 CO<sub>2</sub>배양기에서 배양하였다.

### 5. 정자의 동결 및 융해

투명대 제거 햄스터난자를 이용한 인간정자의 수정능 획득시험을 조사하기 위하여 체외수정 및 배아이식 프로그램에 적용된 정자의 일정양을 취하여 동결보존한 후 검사시 융해하여 사용하였다. 정자의 동결은 sucrose와 glycin이 함유되어 있는 항동해제를 분리된 정액과 동량 2-3분 간격으로 서서히 흔들면서 분주한 후 5° 시에서 1시간 정치시킨 후 -20°의 냉동고에서 정자를 동결시킨 후 액체질소탱크에 침지하여 동결보존하였다. 융해는 동결보존된 정자를 37°C의 미온수에 적하시켜 녹인 후 1000 rpm에서 7분간 원심분리하여 항동해제를 제거한 뒤 신선배양액을 분주한 후 일정시간 배양한 후 실험에 사용하였다.

## 6. 햄스터의 다배란 유기 및 투명대제거

다배란을 유기하기 위하여 햄스터의 복강에 30 IU의 PMSG를 주사한 후 52-56시간후에 동량의 hCG를 주사하였다. hCG주사후 14-16시간 사이에 경추과열법으로 도살한 후 난관을 적출하여 소량의 배양액내에서 난자를 채취하였다. 채취된 난자는 0.1%의 hyaluronidase가 함유되어 있는 배양액에 약 5분간 노출시켜 과립세포를 제거시킨 후 신선배양액으로 3회이상 세척하였다. 세척된 난자는 0.1%의 trypsin이 함유되어 있는 배양액에 노출시켜 현미경하에서 투명대가 거의 연화되었을 때 미세피펫을 사용하여 난자를 회수한 후 신선배양액에서 3회 세척하여 투명대를 제거하였다. 투명대가 제거된 난자는 세척후 20-30개씩 paraffin oil 이 피복되어 있는 배양액소적에 적하시킨 후 인간정자와 수정을 시켰다.

## 7. 햄스터난자와 인간정자의 이종간 체외수정 및 수정의 판정

동결보존되어 있는 인간정자는 용해하여 배양한 후  $3-4 \times 10^6/ml$ 의 비율로 조정된 후 투명대가 제거 햄스터난자가 배양되고 있는 미세소적에 첨가하여 CO<sub>2</sub>배양기에서 3시간동안 배양하였다.

배양후 난자는 미세피펫을 사용하여 흡인하

여 3회이상 신선배양액으로 세척하여 정자를 제거하고 slide glass적하시킨 후 cover glass를 덮어 난자가 터지지 않을 정도로 서서히 압박하여 2.5%의 glutaraldehyde를 침투시켜 1차 고정후 10%의 formalin용액에 24시간동안 침적시킨 후에 증류수로 수세하고 95%의 alcohol로 탈수한 후 45% aceto-lacomoid로 염색하고 cover glass주위를 매니큐어로 봉입하여 현미경하에서 수정여부를 판단하였다.

## 결 과

정액성상과 가임능력에 따라 분류하여 HPA치를 조사한 결과는 표 1과 같다. 각 군간에 있어서 정액의 양에는 유의차가 없는 반면 정자수가 운동성에 있어서는 유의하게 유의차가 인정되었다. 또한 HPA치에 있어서도 가임군은 36.2%인 반면 정자회소증을 지닌 불임남성군은 5.7%였고 정상적인 정액성상을 나타낸 불임 남성군도 28.7%로서 유의하게 가임남성군보다 낮은 수치를 나타냈다.

HPA수치에 따른 정액의 성상을 조사한 결과는 표 2와 같다. HPA치가 0%인 경우 정자의 농도는  $1.86 \times 10^6/ml$ , 운동성은 2.71%로서 현저히 낮은 수치를 나타냈으며, 1-15%의 HPA치를 나타낸 군의 정자농도는  $41.9 \times 10^6/ml$  운동성은 44.2%, 16-30%의 HPA치를 나타낸 군

Table 1. Result of zona-free hamster penetration assay according to semen parameters

Subject	Number of donor	Semen volum (ml)	Sperm concentration ( $\times 10^6/ml$ )	Sperm motility (%)	Hamster oocytess penetrated (%)
Fertile	12	2.4 ± 0.8	78.7 ± 14.2 <sup>a</sup>	55.5 ± 6.52 <sup>c</sup>	36.2 ± 27.6 <sup>e</sup>
Infertile*	27	2.7 ± 1.0	4.02 ± 4.44 <sup>a,b</sup>	33.5 ± 16.7 <sup>c,d</sup>	5.7 ± 8.9 <sup>e,f</sup>
Infertile**	41	3.1 ± 2.8	70.9 ± 38.7 <sup>b</sup>	53.4 ± 8.6 <sup>d</sup>	28.7 ± 19.1 <sup>f</sup>

\* : Abnormal semen parameter, \*\* : Normal semen parameter, a, b, c, d, e, f : <0.005.

Table 2. Semen parameters according to range of penetration rates using the zona-free hamster oocytes

% ova penetrated	Number of donor	Semen volume (ml)	Sperm concentration ( $\times 10^6/ml$ )	Total count ( $\times 10^6/ml$ )	Sperm motility (%)
0	18	2.5 ± 1.3	1.86 ± 2.1 <sup>a,b,c</sup>	4.97 ± 4.6	2.71 ± 3.8 <sup>f,g</sup>
1-15	15	2.4 ± 1.3	41.9 ± 40.9 <sup>a,d</sup>	124.7 ± 106.6	44.2 ± 14.1 <sup>f</sup>
16-30	18	2.7 ± 1.1	46.8 ± 24.9 <sup>b</sup>	123.7 ± 92.1	54.1 ± 4.6 <sup>g</sup>
30>	17	2.1 ± 1.3	81.4 ± 47.5 <sup>c,d,e</sup>	184.5 ± 136.5	55.5 ± 8.3 <sup>f</sup>

d, e : p < 0.05, a, b, c, d, f : p < 0.005.

Table 3. Variation of hamster penetration assay on spermatozoa of same donor

Donors	Semen volume (ml)	Sperm concentration ( $\times 10^6$ /ml)	Sperm motility (%)	Hamster oocytes penetrated (%)
A	1.0	34.2	30	0/30 ( 0.0)
	4.0	54.0	60	1/21 ( 4.7)
B	2.0	75.2	58	16/20 (80.0)
	0.8	70.2	60	15/28 (53.5)
C	2.8	70.0	54	9/21 (42.8)
	1.0	105.5	55	8/26 (30.7)
D	1.5	4.1	34	0/20 ( 0.0)
	3.1	1.5	50	0/20 ( 0.0)
	6.0	1.2	31	0/30 ( 0.0)
E	2.0	2.0	10	0/22 ( 0.0)
	1.8	2.0	15	0/20 ( 0.0)
F	1.0	70.3	65	10/18 (55.6) <sup>a</sup>
	3.0	56.2	52	2/22 ( 9.1) <sup>a</sup>

a : df=10.03, b<0.005.

의 정자의 농도는  $81.4 \times 10^6$ /ml 운동성은 55.5%로서 HPA치가 높아질수록 정자의 농도와 운동성이 좋아짐을 알 수 있었다.

한편 동일한 제공자로부터 2일 간격으로 정액을 채취하여 HPA를 시행한 결과의 성적은 표 3과 같다. 동일한 제공자의 정액성상이 여러 변이가 있음을 알 수 있었다. A의 경우 정자운동성, B와 F의 경우 정자의 농도에서 현저한 차이를 나타냈으나 F를 제외하고 HPA치에 있어서 유의차가 나타나지 않았다. F의 경우 현저한 차이가 나타났는데 위음성 또는 위양성 결과에 대한 연구가 시행되어야 할 것으로 사려된다.

표 4는 체외수정 및 배아이식프로그램에 적용된 환자의 정액성상 및 동결보존 후 융해하였을 때의 정자의 운동성에 관한 도표로서 26명의 평균 정액량은  $2.7 \pm 1.2$ ml이었으며, ml당 평균 정자수는  $60.2 \pm 61.4 \times 10^6$ 이며 운동성은  $53.4 \pm 7.9\%$ 로 35-65%의 범위를 나타냈다. 동결보존후 융해하여 정자의 운동성은 조사한 결과 37-81%로서 동결전의 운동성과 유의차가 나타나지 않고 평균  $58.8 \pm 11.5\%$ 의 운동성을 나타냈다. 이는 동결보존시 정자를 swim-up방법에 의해 고효력의 정자만을 분리하여 동결보존을 실시함에 기인하는 것 같다.

표 5는 체외수정율과 분활을 및 HPA치의 상관관계를 조사한 도표로서 2, 14번과 같은 경우 정상적인 정액성상을 나타냄에도 불구하고

고 인간난자의 체외수정에 있어 수정이 이루어지지 않았고 HPA치에 있어서 낮은 수치를 나타냈다. 9번은 채취된 인간난자가 미성숙되어 수정이 이루어지지 않았고, 16번은 정자희소증을 지닌 경우로서 정자의 운동성은 약간 낮은 수치를 나타내나 정자수가 부족해 수정이 이루어지지 않은 것으로 사료된다.

체외수정 및 배아이식 프로그램에 공시된 환자로부터 평균  $3.1 \pm 1.8$ 개의 난자가 채취되어  $2.3 \pm 1.8$ 개의 난자가 수정되었고, 이들 중  $1.9 \pm 1.7$ 개가 분활되어 자궁에 이식되었다. 또한 이들에 각각 햄스터난자가  $22.4 \pm 4.0$ 개가 공시되어 이중간 체외수정이 실시되어 평균  $8.4 \pm 6.5$ 개가 침투되어  $38.9 \pm 29.9\%$ 의 침투율을 나타냈으며 난자당 정자의 평균 침투율은  $0.9 \pm 0.9$ 개였다.

이와 같이 인간난자의 체외수정과 HPA치에 있어서 유의성 있는 상관관계가 존재함을 본 실험을 통해 알 수 있었고 앞으로 체외수정 및 배이식프로그램에 적용되는 환자들을 미리 투명대제거 햄스터난자와 이중간 체외수정을 실시함으로써 체외수정여부를 추측할 수 있는 중요한 실험방법이라고 사료된다.

## 고 찰

남성가임능력의 평가는 사출된 정액의 질 (quality)에 의해서 좌우된다. 그러나 오래전부

**Table 4.** Semen parameters of husbands participating in a human in vitro fertilization and embryo transfer program

Subject No.	Semen analysis				Motility of frozen semen at thawing (%)
	Volume (ml)	Sperm density ( $\times 10^6$ /ml)	Total sperm count ( $\times 10^6$ /ml)	Motility (%)	
1	3.0	62.1	186.3	60	65
2	2.8	82.1	231.3	56	58
3	2.5	180.2	450.5	35	75
4	5.0	89.5	447.5	63	65
5	2.4	69.7	167.3	58	37
6	3.1	71.4	221.3	52	61
7	1.5	56.8	85.2	54	40
8	2.6	62.5	162.5	65	57
9	7.0	69.0	483.0	60	80
10	2.1	16.8	35.3	59	38
11	2.5	80.3	200.6	60	71
12	2.0	20.0	40.0	50	60
13	1.8	18.4	33.1	57	52
14	3.1	73.4	227.5	55	61
15	3.0	82.0	246.0	52	50
16 <sup>a</sup>	2.3	0.15	0.3	40	40
17	5.0	79.5	397.5	60	69
18	3.0	62.1	186.3	60	81
19	2.0	87.0	174.0	58	64
20	2.0	5.0	10.0	45	48
21	2.1	72.4	149.9	55	65
22	1.8	43.0	77.9	45	56
23	2.3	46.8	107.6	35	51
24	1.0	70.3	70.3	53	56
25	2.0	40.0	80.0	55	63
26	2.5	24.0	60.0	48	58
Mean $\pm$ SEM	2.7 $\pm$ 1.2	60.2 $\pm$ 61.4	174.0 $\pm$ 138.6	53.4 $\pm$ 7.9	58.8 $\pm$ 11.5
Range	1.0-7.0	0.15-180.2	0.3-483.0	35-65	37-81

a : Intact sperm.

터 실시되어온 현미경적 정액검사 (Smith et al., 1977)는 정자회소증, 정자사멸증 및 무정자증 등을 제외하고는 남성불임의 원인검사에는 적합하지 않다. 정자의 기능적 활성도를 평가하기 위해 이용될 수 있는 bioassay (Overstreet & Hambree, 1986)는 한계점이 있다. 미수정란, 죽은 난자는 수정능력을 지닌 정자에 의해서 침투되어 정자의 수정능검사로 사용되고 있으나, 이들 난자의 확보 및 보존방법등이 복잡하여 보편적인 정자의 수정능 검사의 적용은 부적당하다. 그 결과 대부분의 실험실에서는 투명대제거 햄스터난자를 이용하여 정자기능의

평가를 검사하고 있다.

즉, 난자내에 침투한 정자의 핵형을 검사하여 정자의 유전학적 조사 (Rudak, 1984), 정소상체 정자의 성숙유무검사 (Moore, 1983) 및 정자의 질을 비교적 정확하게 평가하여 채취된 난자의 체외수정 실시후 수정유무를 평가할 수 있는 것으로 사려된다. Overstreet 등 (1980b)은 정상적인 정액성상을 지녔음에도 수정능을 획득하지 못하는 경우가 있으며, 정상인의 정액성상을 지닌 불임남성군의 HPA치는 14-100%, Karp (1981)은 12%이하라 한 반면, 가임남성군의 HPA치는 Roger (1982)은 56%, Tyler 등

**Table 5.** Correlation between fertilization of human eggs and penetration of zona-free hamster eggs in vitro

Subject No.	Human in vitro fertilization		Hamster penetration assay		
	Eggs fertilized/ Eggs inseminated	Eggs cleaved/ Eggs fertilized	Eggs penetrated/ Eggs inseminated	%	Sperm/Egg
1	5/5	3/5	9/21	42.8	0.5
2	0/1	0/0	1/25	4.0	0.1
3	3/3	3/3	14/20	70.0	1.8
4	3/3	3/3	9/23	39.1	0.5
5	4/5	3/4	20/21	95.2	1.5
6	1/3	1/1	16/24	66.7	1.4
7	3/3	3/3	3/23	13.0	0.1
8	1/1	1/1	2/20	10.0	0.3
9 <sup>a</sup>	0/1	0/0	16/20	80.0	3.6
10	6/6	6/6	1/20	5.0	0.1
11	1/2	1/1	10/20	50.0	0.8
12	1/2	1/1	8/23	34.7	1.0
13	4/6	4/4	26/26	100.0	2.9
14	0/4	0/0	0/20	0.0	0.0
15	2/3	0/2	2/26	7.6	0.1
16 <sup>b</sup>	0/1	0/0	3/25	12.0	0.1
17	3/4	3/3	0/30	0.0	0.0
18	5/5	5/5	6/13	46.1	0.6
19	2/2	2/2	9/30	30.0	0.2
20	1/3	1/1	10/30	33.3	0.5
21	1/1	0/1	13/18	72.2	1.8
22	1/1	1/1	8/21	38.0	0.9
23	2/2	2/2	4/17	23.5	0.4
24	4/6	4/4	12/20	60.0	1.5
25	1/1	1/1	6/25	24.0	0.8
26	6/7	4/6	2/23	8.6	0.2
Mean	2.3±1.8/	1.9±1.7/	8.4±6.5/	38.9	0.9
±SEM	3.1±1.8	2.3±1.8	23.4±4.0	±29.9	±0.9

a : Immature oocyte,      b : Severe oligospermia.

(1981)은 62%, Zausner-Guelman등 (1981)은 81% 및 Cohen(1982c)이 54%의 높은 침투능을 보였다.

SPA검사방법과 일반적 정액검사 사이의 상관관계에 있어서 Martin과 Tylor등 (1982) 및 Cohen (1982)은 상관관계가 없다고 한 반면, Berger (1983b)은 정자의 수, 운동성 사이에는 유의한 상관관계가 있다고 하였다. Trouson과 Wood (1981)는 임상적으로 불임으로 진단된 정자회소증 (<20×10<sup>6</sup>/ml)을 지닌 남성의 소수에서 89%의 높은 SPA치를 나타냈고, Atiken등 (1982c)은 Karta-gener증후군의 남성에서 30

%의 SPA치를 보여, SPA치는 정자농도, 운동성 및 형태학적 정상적인 정자 사이에 큰 의의가 없다고 하였다. Wolf등 (1983)은 체외수정 프로그램과 HPA와의 사이에 연관성을 조사하기 위해서 24명의 환자를 대상으로 실험을 실시한 결과 18명에서 수정이 되었으며 이들 환자의 HPA치는 56±32% (6-100%)인 반면, 수정이 되지않은 6명의 HPA치는 28±21% (5-69%)를 나타내 높은 연관성을 보였다. Hall등 (1983)은 HPA치가 15%이상이면 체외수정프로그램에 적용시 난자를 수정시킬 수 있는 반면, 15%이하의 HPA치를 나타낸 남성군의 80

%가 난자를 수정시키지 못하였다고 하였다.

본 실험에서도 체외수정프로그램에 적용된 26명의 환자중 22명에서 수정이 이루어졌고 수정이 이루어지지 않은 4명중 1명은 미성숙되어 germinal vesicle단계, 1명은 정자회소증으로 인한 정자부족, 그리고 2명은 정상인의 정액성상을 나타내고 난자의 성숙에도 불구하고 수정이 이루어지지 않았으며 또한 HPA치에 있어서도 0%와 4.0%의 낮은 수치를 나타냈다. Overstreet (1976)은 동일조건하에서 사멸한 인간난자와 투명대 제거 햄스터난자에 정자를 수정시킨 결과 85%에서 상관관계를 나타냈으나 15%에서는 사멸한 인간난자를 침투하지 못하였고, Wolf등 (1981)은 25%에서 negative relation을 나타냈는데, 이는 인간난자의 수정을 위해서는 침체반응 뿐만 아니라 최상의 운동성이 요구되는데, 이들 정자는 침체반응이 일어난 반면, 미약한 운동성에 의해 인간난자의 수정이 이루어지지 않은 것 같다고 하였다. 본 실험에서도 정자의 동결 및 융해시 온도충격 및 항동해제의 영향에 의해 정자의 운동성이 저하됨에 따라 몇몇에서 HPA치가 낮은 것으로 사려된다.

Saito등 (1984)은 가임능력을 지닌 남성으로부터 2일 간격으로 4회 정액을 채취하여 HPA를 한 결과, 정액의 채취빈도수가 증가할수록 정액양, ml당 정자의 농도 및 운동성등이 낮았으나 HPA결과치에 있어서는 유의성이 인정되지 않았으며, Rogers (1973) 및 Overstreet (1980b)도 같은 결과를 얻었다고 하였으며 본 실험에서도 한 명을 제외하고 유사한 결과를 얻었다. Berger (1982)에 의하면 정장에 3시간 노출된 정자는 1-2시간 노출된 정자군보다 낮은 HPA치를, Roger (1982)은 30분 이상 노출시에도 낮은 HPA의 결과치를 보인다고 하였고 Cohen (1982c)은 높은 점조성을 띤 정액을 액화시키기 위하여 1시간동안 상온에 방치한 후 처리할 때 보다 배양액을 첨가하여 처리시 높은 HPA결과치를 얻은 반면 Vandervend (1983)은 상반된 결과를 얻었다.

HPA는 검사방법 및 검사자에 따라 다양한 결과를 나타내나 기존의 현미경적 검사방법으로는 불가능한 정자의 기능적 활성도를 측정할 수 있어 체외수정 프로그램에 적용된 환자의 정액을 비교적 객관적으로 평가하여 난자의 수정여부를 예측할 수 있는 검사방법이라 사료되며 앞으로 여러요인에 따른 HPA치를 조사한

후 최상의 조건에서 검사를 실시함으로써 위음성 또는 위양성의 결과를 배제할 수 있는 조건의 설정과 정자기능과 수정의 기전에 대한 기초적인 연구가 병행되어야 할 것이다.

## 결 론

경희산부인과 불임클리닉에 내원한 불임부부를 대상으로 정액성상에 따른 HPA치, 같은 환자로부터 연속적으로 검사한 결과, 인간난자의 체외수정 및 배아이식프로그램에 적용된 환자의 체외수정율, 분할율과 HPA치를 상호 비교 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 가임능력군의 평균 정자수는 ml( $\times 10^6$ )당  $78.7 \pm 38.7$ 이었고 정자의 운동성은 각각  $55.5 \pm 6.52$ ,  $33.5 \pm 16.7$  및  $53.4 \pm 8.6\%$ 를 나타냈으며, HPA치는 각각  $36.2 \pm 27.6$ ,  $5.7 \pm 8.9$  및  $28.7 \pm 19.1\%$ 를 나타냈다 ( $p < 0.005$ ).

2. HPA수치에 따라 정액성상을 조사한 결과 0%에서는 ml( $\times 10^6$ )당 정자수는  $1.86 \pm 2.1$  운동성은  $2.87 \pm 13.8\%$ 를 나타냈고, 1-15% 범위세너는  $41.9 \pm 40.9$ 의 정자수를  $44.2 \pm 14.1\%$ 의 운동성을 16-30%의 범위에서는  $46.8 \pm 24.9$ 의 정자수,  $54.1 \pm 4.6\%$ 의 운동성을 30>의 군에서는  $81.4 \pm 47.5$ 의 정자수  $55.5 \pm 8.3\%$ 의 운동성을 나타냈다 ( $p < 0.05$ ,  $0.005$ ).

3. 6명의 제공자로부터 연속 정액을 채취하여 투명대 제거 햄스터난자와 이종간 체외수정을 실시하여 HPA치를 조사한 결과 5명에서는 유의차가 나타나지 않았으나 1명에서 55.6%와 9.1%로 큰 유의차를 나타냈다 ( $p < 0.005$ ).

4. 26명의 체외수정 및 배이식 프로그램에 공시된 환자의 평균 정액성상은 ml( $\times 10^6$ )당  $60.2 \pm 61.4$ 의 정자수를  $53.4 \pm 7.9\%$ 의 운동성을 동결보존후 융해하였을 때의 운동성은  $58.8 \pm 11.5\%$ 의 운동성을 나타냈다.

5. 체외수정에 공시된 26명 환자로부터 평균  $3.1 \pm 1.8$ 개의 난자가 채취되었고 이중  $2.3 \pm 1.8$ 개의 난자가 수정되었으며  $1.9 \pm 1.7$ 개의 난자가 분할되어 자궁에 이식되었다. 이들 환자의 평균 HPA수치는  $38.9 \pm 29.9\%$ 로였고 난자당 평균 정자 침투수는  $0.9 \pm 0.9$ 개였다.

## 인 용 문 헌

Atiken RJ, Best FSM, Richardson DOW: An analysis of semen quality and sperm func-

- tion in cases of oligospermia. *Fertil Steril* 1982c, 38, 705.
- Berger RE: The relationship of pyospermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as reflecting the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 1982, 37, 557.
- Berger T: Factors affecting human sperm penetration of zona free hamster ova. *Am J Obstet Gynecol* 1983b, 145, 387.
- Campena A: New parameters for selection of A. I.D. patients: Sperm acrosin content and hamster zona free oocyte penetration. *Inserm* 1981, 103, 281.
- Cohen J: In vitro fertilizing capacity of human spermatozoa with the use of zona free hamster ova: Interassay variation and prognostic value. *Fertil Steril* 1982c, 37, 565.
- Hall JL, Marik J, Engel D: Screening for human in vitro fertilization success using hamster zona free ovum test. *Fertil Steril* 1983, 40, 412a.
- Karp LE: Sperm penetration assay: Useful test in evaluation of male fertility. *Obstet Gynecol* 1981, 5, 626.
- Martin RH, Taylor PJ: Reliability and accuracy of the zona hamster ova assay in the assessment of male fertility. *Br J Obstet Gynaecol* 1982, 89, 951.
- Menge AC, Black CS: Effect of antisera on human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Fertil Steril* 1979, 32, 214.
- Moore HDM: Development of oocyte: penetrating capacity of spermatozoa in the human epididymis. *Int J Androl* 1983, 6, 310.
- Overstreet JW, Hambree WC: Penetration of the zona pellucida of nonliving human oocytes by human spermatozoa in vitro. *Fertil Steril* 1976, 27, 815.
- Overstreet JW: Penetration of human spermatozoa into human zona: pellucida and the zona: free, hamster egg: A study of fertile donors and infertile patients. *Fertil Steril* 1980b, 33, 534.
- Pryor JP: The clinical application of electron microscopy and the heterologous ova penetration test to the assessment of spermatozoa from infertile men. *Br J Urol* 1981, 53, 660.
- Roger BF: Re-evaluation of zona-free egg test with regard to its use in human fertility assessment. *Fertil Steril* 1982, 37, 296a.
- Rogers BJ: Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil Steril* 1979, 32, 664.
- Rudak E: Chromosome analysis of multipronuclear human oocytes fertilized in vitro. *Fertil Steril* 1984, 41, 538.
- Saito A, Hoshi K, Yanagimachi R: Capacitation time of human spermatozoa. *Jpn J Fertil Steril* 1984, 29, 88.
- Smith KD, Rodriguez-Rigau LJ, Steinberger E: Relation between indices of semen analysis and pregnancy rate in infertile Couples. *Fertil Steril* 1977, 28, 1314.
- Trounson A, Wood C: Extracorporeal fertilization and embryo transfer. *Clin Obstet Gynecol* 1981, 8, 681.
- Tyler JPP, Pryor JP, Collins WP: Effect of heterologous seminal-plasma on the fertilizing capacity of human spermatozoa as assessed by the zona-free hamster egg test. *Fertil Steril* 1983, 40, 512.
- Wolf DP, Sokoloski JE, Quigley MM: Correlation of human in vitro fertilization with the hamster egg bioassay. *Fertil Steril* 1983, 40, 53.
- Yanagimachi R, Yanagimachi H, Roger BJ: The use of zona free animal ova as a test system for assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1976, 15, 471.
- Zausner-Guelman B, Blasco LO, Wolf DP: Zona-free hamster egg and human sperm penetration capacity: A comparative study of proven fertile donors and infertile patients. *Fertil Steril* 1981, 36, 771.