

Acrobeads Test를 이용한 정자수정능의 평가

부산대학교 의과대학 비뇨기과학교실

박 영 수 · 박 남 철

Evaluation of Sperm Fertilizing Capacity Using Acrobeads Test

Young Soo Park and Nam Cheol Park

Department of Urology, College of Medicine, Pusan National University, Pusan, Korea

= Abstract =

The assessment of acrosomal status is important in evaluating the ability of sperm to fertilize the egg. The acrosomal status of sperm from 47 normal volunteers with proven fertility and 167 subfertile men with not to achieve pregnancy for at least 1 year were evaluated with Acrobeads test(FUSO Pharmaceutical Industries, Ltd, Japan) using immunobeads coated with MH61 monoclonal antibody, which is specific for acrosome-reacted sperm. The mean \pm SD of acrobeads score in 47 volunteer group was 2.8 ± 0.7 , of which 46(97.9%)cases were ≥ 2 . The mean \pm SD of acrobeads score in 167 subfertile group was 1.7 ± 0.8 , of which 73(79.3%)cases were ≤ 1 . The acrobeads score in subfertile group were significantly lower($r=0.294$, $p<0.05$) than those in volunteer group. In subfertile group, acrobeads score were well correlated with the sperm density and motility($r=0.275$, $r=0.281$, $p<0.01$), but not with semen volume($r=0.16$) and serum hormone level(FSH $r=0.084$, LH $r=0.036$, testosterone $r=0.058$, prolactin $r=0.006$ and estradiol $r=0.060$)($p>0.05$). Of 63 subfertile cases with normozoospermia, 22(34.9%)cases showed 0 or 1 of acrobeads score, which means to accompany with a functional defect in spite of normal morphology.

As a results, Acrobeads test is not only a technically simple sensitive procedure with good reproducibility in evaluating the sperm fertilizing capacity but also an useful in the evaluation of effectiveness in the treatment of infertility and the separation of acrosome-reacted sperm in the assisted reproductive technique.

Key Words: Acrobeads test, Sperm fertilizing capacity

서 론

정자의 두부에서 일어나는 선체 반응(acrosomal reaction)은 정자가 수정능을 획득하는데 필수적인 과정으로 알려져 있다. 선체 반응 유무를 이용한 정자의 수정능을 평가하는 방법으로는 triple stain, acridine orange 등의 supravital stain과 형광 표식-PSA(Pisum Sativum Agglutinin)를 이용한 면역형광염색법, Hamster egg를 이용

한 sperm penetration assay(Rogers et al, 1983; Margalioth et al, 1986; Mao & Grimes, 1988)등이 있으나 조작이 복잡하고 숙련이 필요한 점 외에도, 시간과 경비 소요가 많으며 재현성이 없다는 단점이 있어 이를 보완할 수 있는 검사법의 임상적 필요성이 제기되어 왔다.

저자들은 선체 반응이 일어난 정자의 두부에서 발현되는 CD46 항원(Okabe et al, 1992; D'Cruz & Haas, 1993)에 특이한 MH61 단클론항체(Okabe et al, 1990)가 결합된 immunobeads인

MH61-beads(Ohashi et al, 1992)를 이용한 Acrobeads test(Fig. 1)(FUSO Pharmaceutical Industries, Ltd, Japan)로써 불임남성에서 채취된 정자의 선체 반응 정도를 조사하여 Acrobeads test가 정자의 수정능을 평가하는데 sperm penetration assay를 대체할 수 있는 유용한 검사법 인지를 연구하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

불임군은 1년 이상의 불임 병력을 가진 남성 불임 환자 167례와 대조군은 지난 2년 이내에 임신을 경험하였고 정액검사상 정상 소견을 보인 지원자 47례에서 채취된 정액을 실험 재료로 이용하였다. 단 불임군은 부인이 배란 장애나 여성 불임의 원인 질환이 없다면, 남성 불임의 원인에 관계없이 본 연구의 대상으로 하였다.

2. 연구 방법

정액은 3일 이상 금욕 후 용수법으로 멸균 시험관에 채취하여 실온에서 60분간 액화시킨 다음 Makler counting chamber(InferTech, Israel) 또는 컴퓨터정자분석기(SAIS, Medical Supply Co., Ltd. Korea)를 이용하여 정액 검사(WHO 1993)를 시행하였다. 검사시료는 일본 오사카대학 의학부에서 실험용으로 공여된 acrosome reacted sperm detection kit(FUSO Pharmaceutical Industries, Ltd, Japan)를 사용하였다. 검사과정은 먼저 0.3%와 3.5% human serum albumin(HSA)를 함유한 modified Biggers Whitten and Whittingham(mBWW)배양액과 MH61 단클론항체-beads 결합액을 준비하였다. 바닥이 둥근 10ml 멸균 시험관에 0.3% HSA-mBWW배양액 2 ml를 주입한 다음 배양액의 하층에 0.5-1.0ml의 정액을 조심스럽게 주입하여 시험관을 30° 기울여 37°C, 5% CO₂ 배양기에 60분간 배양하였다. 정자가 swim up된 상층액 1.2ml을 원추형 시험관에 채취하여 실온에서 500gm, 5분간 원심 분리하였다. 다시 0.3% HSA-mBWW배양액 4 ml 첨가하여 500gm, 5분간 원심 분리한 후 상층액을 버리고, 3.5% HSA-mBWW 배양액 0.1-0.3 ml을 가하여 정자현탁액의 정자 농도가 4×10^6 /ml 되도록 조정하였다. 멸균된 96-well microplate에 100 μ l의 3.5% HSA-mBWW배양액으로 100 μ l의 정자 현탁액을 각각 1배, 2배,

4배, 8배 희석하였다. Beads현탁액은 0.3% HSA-mBWW배양액 380 μ l에 MH61-beads 20 μ l를 첨가하여 1.5×10^6 /ml의 농도로 만든다. 다음, 희석된 정자 현탁액이 들어 있는 각각의 well에 beads현탁액을 20 μ l씩 가하여 pipette으로 가볍게 혼합한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에 24시간 반응시킨 후 위상차현미경으로 beads정자 응집반응을 관찰하였다.

3. 결과 판정

5개의 현미경시야 중 3개 이상의 시야에서 응집반응이 보일 때 양성 반응으로 정의하였다(Fig. 2). 결과의 판정은 acrobeads점수표를 이용하였으며 1배 2배 4배 8배 희석된 모든 well에서 응집반응이 보이지 않은 경우 0점으로, 1배 2배 4배 8배 희석된 모든 well에서 응집반응을 보인 경우 4점으로 하여 acrobeads점수는 0, 1, 2, 3, 4로 분류하였다(Table 1). 따라서 acrobeads점수가 높을수록 선체 반응이 우수한 것으로 판정하였다.

4. 통계학적 검정

각 군간의 비교는 Student *t*-test를 사용하였으며 p value < 0.05인 경우에 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 정액검사소견: 불임군 167례의 평균정액량은 2.8 ± 0.8 (mean \pm SD)ml이었고 농도 및 운동성은 각각 $37.4 \pm 23.2 \times 10^6$ /ml, $46.1 \pm 14.1\%$ 였으며, 대조군 47례의 평균정액량은 3.2 ± 1.2 (mean \pm SD)ml이었고 농도 및 운동성은 각각 $66.6 \pm 38.0 \times 10^6$ /ml, $63.6 \pm 17.6\%$ 였다(Table 2).

2. Acrobeads 점수: Acrobeads점수는 대조군에서 1례를 제외하고 모두 2 이상이었으며(평균 2.8 ± 0.7), 불임군은 1이하, 2, 3 및 4가 각각 73례(43.7%), 56례(33.5%), 37례(22.2%) 및 1례(0.6%)였다(평균 1.7 ± 0.9). 따라서 acrobeads점수는 불임군에서 대조군보다 유의하게 낮았다($r=0.294$, $p < 0.05$)(Table 2).

3. 정액량과 acrobeads점수: 불임군중 정액량 2ml 이하의 정액량 이상군 5례중 acrobeads점수가 1이하, 2, 3 및 4가 각각 1례(20%), 2례(40%), 2례(40%) 및 0례로써 정액량과 acrobeads점수간에는 유의한 상관관계는 없었다($r=0.16$, $p > 0.5$).

Table 1. Interpretation of Acrobeads Scoring System

Acrobeads Score	Serial Dilution				Results
	1×	2×	4×	8×	Interpretation
	0	-	-	-	
1	+	-	-	-	Positive agglutination at a well of ×1 dilution of sperm
2	+	+	-	-	Positive agglutination at a well of ×1 and ×2 dilution of sperm
3	+	+	+	-	Positive agglutination at a well of ×1 ×2 and ×4 dilution of sperm
4	+	+	+	+	Positive agglutination at all wells

Table 2. Acrobeads Score in Subfertile and Control groups

Subfertile Group			Control Group		
Acrobeads Score	Cases	%	Acrobeads Score	Cases	%
0	13	7.8	0	0	0.0
1	60	35.9	1	1	2.1
2	56	33.5	2	17	36.2
3	37	22.2	3	20	42.6
4	1	0.6	4	9	19.1
Total	167	100.0	Total	47	100.0
Semen volume: 2.8±0.8ml(mean±SD)			Semen volume: 3.1±1.2ml(mean±SD)		
Sperm density: 37.4±23.2×10 ⁶ /ml(mean±SD)			Sperm density: 66.6±38.0×10 ⁶ /ml(mean±SD)		
Motility: 46.1±14.1%(mean±SD)			Motility: 63.5±17.6%(mean±SD)		
Acrobeads score(mean±SD): 1.7±0.9(mean±SD)			Acrobeads score: 2.8±0.7(mean±SD)		

4. 정자 농도와 acrobeads점수: 불임군중 정자 농도 20×10⁶/ml이하의 과정자증 16례중 acrobeads점수가 1이하, 2, 3 및 4가 각각 6례(37.5%), 9례(56.3%), 1례(6.3%) 및 0례로서 대조군과 비교하였을 때 정자 농도와 acrobeads점수간에는 유의한 상관관계를 보였다(r=0.21, p<0.01).

5. 운동성과 acrobeads점수: 불임군중 운동성 50%이하의 정자무력증 58례중 acrobeads점수가 0, 1, 2, 3 및 4가 각각 10례(17.2%), 17례(29.3%), 19례(32.8%), 12례(20.7%) 및 0례로서 대조군과 비교하였을 때 정자의 운동성과 acrobeads점수간에는 유의한 상관관계를 보였다(r=0.281, p<0.01).

6. 정자 농도, 운동성 및 acrobeads점수: 불임군중 과무력정자증 25례중 acrobeads점수가 0, 1, 2, 3 및 4가 각각 1례(4.0%), 16례(64.0%), 6례(24.0%), 2례(8.0%) 및 0례로서 정자 농도, 운동성 및

acrobeads점수간에는 유의한 상관관계를 보였다(r=0.275, p<0.01).

7. 정상 정액검사소견을 가진 불임군에서의 acrobeads점수: 불임군중 정액검사상 정상소견을 보였던 63례중 acrobeads점수가 0, 1, 2, 3 및 4가 각각 2례(3.2%), 20례(31.7%), 20례(31.7%), 20례(31.7%) 및 1례(1.6%)였으며 이들 중 22례(34.9%)에서 acrobeads점수가 1이하로서 선체반응 이상에 의한 정자의 기능적 이상이 동반되었음을 나타내었다.

8. 호르몬 치와 acrobeads점수: RIA법으로 혈청 호르몬치(FSH, LH, Testosterone, Prolactin 및 Estradiol)가 측정된 177례에서 각 Hormone치와 acrobeads점수간에는 유의한 상관관계는 없었다(FSH r=0.084, LH r=0.036, Testosterone r=0.059, Prolactin r=0.006, Estradiol r=0.060, p>0.05).

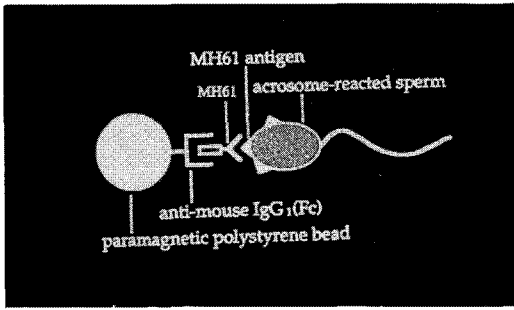


Fig. 1. Principles of Acrobeads Test with MH61-beads conjugate.

고 찰

정액 검사를 통해 알 수 있는 정액량, 정자의 농도, 운동성 및 기형률 등의 형태학적 지표는 수정에 필수적 과정인 정자의 수정능 획득 (capacitation)과 선체 반응에 관한 기능적 정보를 직접적으로 제공하지 못한다. 따라서 정자의 수정능평가를 위해 종래에는 정자두부의 특수 염색법과 sperm penetration assay법 등이 이용되어 왔지만 이들 방법들이 가진 단점에 의해 임상적으로 널리 이용되기에는 한계가 있는 실정이다 (Rogers, 1985). 최근 선체 반응이 일어난 정자에 발현되는 CD46항원 존재와 함께 (Okabe et al, 1992; D'Cruz & Haas, 1993), 항 CD46 단클론항체가 수정을 방해한다는 사실은 정자에서 CD46 항원항체반응을 정자의 수정능평가에 이용할 수 있는 가능성을 제시하게 되었다 (Okabe et al, 1990). Ohashi 등(1992)은 반응이 일어난 정자의 두부에 발현된 membrane cofactor protein인 MH61 항원에 특이적인 단클론항체인 MH61-Ab에 결합된 beads가 항원항체반응에 의해 정자의 두부에 응집되는 것을 관찰함으로써 정자의 수정능을 평가하는 Acrobeads test를 고안하였다. 이 검사법은 염색이나 세정 과정이 없어 실험 과정이 간편하며, 신선관이나 실험동물이 불필요하고, 비용이 저렴하며, 재현성이 우수하여 고도의 숙련이나 시설이 없어도 쉽게 실시할 수 있다는 장점이 있고 최근에는 상업적으로 Kit화된 것을 이용할 수 있게 되므로써 기존의 정자 수정능 평가법을 대체 할 수 있는 방법으로 알려져 있다.

Beads정자결합은 도립위상차현미경을 통해 응집반응으로 관찰되는데 Beads정자결합은 선체 반응이 일어난 정자의 수에 비례하며, acrobeads

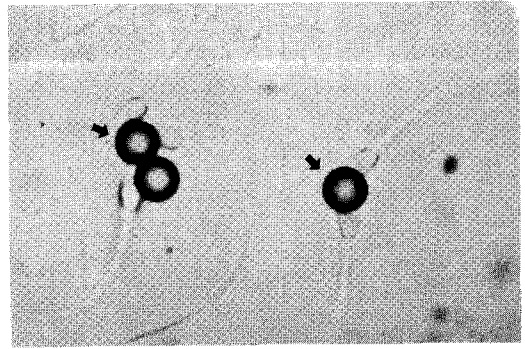


Fig. 2. Microphotography ($\times 400$) of positive agglutination as seen in the Acrobeads test at 24hours of incubation. Black arrows indicate MH61-beads.

접수는 선체 반응이 일어난 정자의 수와 유의한 상관관계가 있으며 (Ohashi et al, 1992), beads부착 능은 zona-free hamster eggs에 발견되는 정자 부착 능력과 연관성이 있다고 보고되고 있다 (Ohashi et al, 1995). Acrobeads접수와 체외수정의 성적에서 Ohashi 등(1992)은 acrobeads접수 1이하인 7명중 6명에서 수정이 관찰되지 않았으며, acrobeads접수 2이상인 13명중 12명에서 최소한 1개 이상의 수정이 관찰되어 acrobeads접수가 낮은 환자에서 수정에 실패할 가능성이 높다고 하였으며 Namiki 등(1995)도 acrobeads접수 1이하 군에서 수정능력이 불량하였으며 2이상 군에서는 양호하다고 하였다. 저자들의 성적에서도 acrobeads접수는 정상대조군에서 1례를 제외한 전례에서 2이상이었으나, 불임군에서는 1이하가 43.7%로서 대조군보다 유의하게 낮은 소견을 나타내어 ($p < 0.05$) acrobeads접수와 수정능은 유의한 상관관계가 있음을 나타내었으며 불임군중 정액 검사상 정상 소견을 보인 63례중 22례(34.9%)에서 acrobeads접수가 1이하로서 정자의 기능적 이상 즉 수정능에 결함이 동반되었음을 시사하고 있다.

Acrobeads test는 정자의 수정능 평가외에도 체외수정시 정상 수정능을 가진 정자의 분리에도 이용될 수 있다. 보조생식술에서 체외수정에 앞서 정상 수정능을 가진 건강한 정자의 성공적인 분리는 수정률을 좌우 할 수 있으므로 매우 중요하다. 즉 부드러운 petting만으로 정자의 두부에 응집된 beads를 정자로부터 분리하므로써 (Ohashi et al, 1994) MH61 immunobeads는 정자에 손상 없이 정상 수정능을 가진 정자를 분리하기 위해 이용될 수 있다.

Acrobeads test는 상업적으로 제조된 Kit를 이용한다면 검사방법이 비교적 쉬우나 검사수행 및 판독 과정에 몇 가지만 주의한다면 실험의 경험 이 적은 임상 의에 의해서도 별 어려움없이 직접 수행 할 수 있을 것으로 생각된다. 검사중 microplate의 well내에 생기는 기포는 결과 판정에 장애가 되므로 배양액이나 beads의 첨가시 기포가 생기지 않도록 하여야 하며, 배양 후 beads 결합 정자가 유주하여 beads가 떨어져 나가는 것을 방지하기 위해 microplate가 진동하지 않도록 하여야 한다. Beads와 정자의 반응은 보통 6-24시간 배양 후에 판단하며 24시간 배양한 경우 12시간 보다 많은 선체반응이 관찰되지만 미세정자 주입술에서는 12시간 배양후 분리된 양성 정자가 보다 높은 수정율을 보이는 것으로 알려져 있다(Ohashi et al, 1994).

결론적으로 Acrobeads test는 일차적으로 정자의 수정능을 평가하는 외에도 불임 치료의 효과 판정 및 보조생식술 등에 이용될 수 있으며, 향후 본 검사가 임상적으로 널리 이용되기 위해서는 검사 결과와 수정, 임신과의 관계 등에 관한 장기적인 추적 관찰이 필요할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서 남성 불임 환자 167례와 정상대조군 47례를 대상으로 Acrobeads test를 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Acrobeads점수는 대조군에서 1례를 제외하고 모두 2이상이었으나(평균 2.8 ± 0.7) 불임군에서는 73례(43.7%)에서 1이하로서(평균 1.7 ± 0.9) 대조군에 비하여 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

2. 불임군에서 acrobeads점수와 정자농도 및 운동성간에는 유의한 상관관계를 보였으나, 정액량 및 호르몬 치와는 유의성이 없었다.

3. 불임군중 정상 정액검사 소견을 보인 63례중 22례(34.9%)에서 acrobeads점수가 1이하로서 이들 정자에서 기능적 이상이 동반되었음을 나타내었다.

이상의 결과로서 Acrobeads test는 비교적 간단하고 감수성이 우수하며 재현성이 높은 정자의 수정능 평가법으로 향후 불임 치료의 효과 판정 및 보조생식술에서 수정 가능한 정자의 선별 등에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

D'Cruz OJ, Haas GG Jr: The expression of the complement regulates CD46, CD55, and CD59 by human sperm does not protect them from anti-sperm antibody and complement-mediated injury. *Fertil Steril* 1993, 59, 876-84.

Mao C, Grimes DA: The sperm penetration assay: Can it discriminate between fertile and infertile men? *Am J Obstet Gynecol* 1988, 159, 279-86.

Margalioth EJ, Navot D, Laufer N, Lewin A, Rabiowitz R, Schenker JG: Correlation between the zona-free hamster egg sperm penetration assay and human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986, 45, 665-70.

Namiki M, Matsumiya K, Takada S, Kitamura M, Kondoh N, Uchida K, Park N-C, Kiyora H and Okuyama A: The acrobeads test for evaluation of sperm function: Clinical application. *Assis Reprod Tech Androl* 1995, 7, 69-72.

Ohashi K, Saji F, Kato M, Okabe M, Mimura T, Tanizawa O: Evaluation of acrosomal status using MH61-beads test and its clinical application. *Fertil Steril* 1992, 58, 803-8.

Ohashi K, Tsutsui T, Saji F, Tomiyama T, Kato M, Tanizawa O: Acrobeads test: a new diagnostic test for assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 1995, 63, 625-30.

Ohashi M, Saji R, Wakimoto A, Tsutsui T, Nakazawa T, Okabe M, Mimura T. and Tanizawa O: Selection of acrosome-reacted sperm with MH61-immunobeads. *J Androl* 1994, 15, 78-82.

Okabe M, Nagira M, Kawai Y, Matzno S, Mimura T, Mayumi T: A human sperm antigen possibly involved in binding and/or fusion with zona-free hamster eggs. *Fertil Steril* 1990, 54, 1121-6

Okabe M, Matzno S, Nagira M, Ying X, Ikawa M, Kohama Y, Mimura T: Collection of acrosome-reacted human sperm using monoclonal antibody-coated paramagnetic beads. *Mol Reprod Dev* 1992, 32, 389-393.

Okabe M, Ying X, Nagira M, Ikawa M, Kohama Y, Mimura T: Homology of an acrosome-reacted sperm-specific antigen to CD46. *J Phar-*

macrobiodyn 1992, 15, 455-9

Rogers BJ, Perreault SD, Bentwood BJ, McCarville C, Hale RW, Soderdahl DW: Variability in the human-hamster in vitro assay for fertility evalu-

ation. *Fertil Steril* 1983, 39, 204-11

Rogers BJ: The sperm penetration assay: its usefulness reevaluated. *Fertil Steril* 1985, 43, 82-1-40.
