

한우에서 Computer aided semen analysis(CASA) 기법을 이용한 수태율 예측에 관한 연구

이강남 · 이병천* · 황우석*

아산동물병원
서울대학교 수의과대학*
(1998년 7월 21일 접수)

Studies on the use of computer aided semen analysis(CASA) technology for fertility prediction in Korean native cattle

Kang-nam Lee, Byeong-chun Lee* , Woo-suk Hwang*

A-san animal hospital
*College of Veterinary Medicine, Seoul National University**
(Received Jul 21, 1998)

Abstract : This experiment was conducted to predict the effects of motional characteristics on the fertility of Korean native cattle(KNC) by using CASA technology and *in vitro* fertilization system.

Twenty-six KNC frozen semen straws were obtained from Korean KNC improvement department, livestock improvement main division, national livestock cooperatives federation in Korea. Specimens were allowed to thaw at 37°C for 30 sec in water bath. Semen analysis was performed on semen image analysis system(SIAS, Medical supply, Korea) adjusted to the gate settings and used the semen droplet (5µl) placed on Makler counting chamber(Sefi medical instrument, Israel) prewarmed at 37°C. The same person used the same micropipette to fill the Makler counting chamber. A total of 150 or more of sperms were analysed in each specimen by a single trained person by scanning at least 5 to 10 fields. The oocytes collection, *in vitro* maturation, IVF, *in vitro* culture and determination of the cleavage rate were performed by the technique, as described by Hwang *et al*(1997). Statistical analysis was done by linear regression with use of the Sigma plot program on a IBM personal computer.

The cleavage rate *in vitro* fertilized oocyte was significantly correlated($P<0.05$) with MOT, VCL, VSL, VAP, ALH, BCF and MAD, but not CON, LIN, STR, WOB, DNM, DNC and HYP in regression analysis.

The results show that some kinematic characteristics of frozen-thawed semen by CASA can be predict the fertility in *in vitro* model system.

Key words : Korean native cattle, semen, CASA, motional kinematics, IVF, cleavage rate.

서 론

수컷 불임의 원인을 진단하기 위한 방법으로는 정액 검사가 가장 바람직한 것으로 인정되어 왔다^{11,69}.

인간과 동물에 있어 종에 따른 차이 및 동일한 종에서도 개체에 따른 정액성상은 다양하며, 가장 중요한 요인인 운동성을 중심으로 한 객관적인 정액검사를 실시하여 정자의 기능을 평가하려는 연구들이 있었다^{20,63,65,69}. 가축개량의 일환으로 인공수정에 전적으로 의존하는 현실에서 종모우의 불임은 다수의 암컷에서 수태율 저하가 초래되는 심각한 경제적 손실을 초래할 수 있으므로 종모우의 번식능력 조기에 평가하여 동결정액 제조에 참조하는 것이 필요하다²⁹.

정액검사는 정액의 양, 냄새 및 색조 등을 조사하는 육안적 검사와 현미경적 및 화학적으로 운동성, 생존율, 형태학적 분석, 산도, 세포학적 분석 및 정장의 내분비 성분의 동정이 포함되어 왔다^{2,23,65}. 육안적 및 현미경적 검사는 실험실 및 검사자의 주관적 기준이 개입되므로 정액검사의 표준화에 어려움이 있다.

현미경적 검사시 정자생존율 측정은 동일한 시료 내에서도 검사자간의 변이계수의 범위는 30~80% 이었다⁴⁰. 정액검사시 Dunphy *et al*²²는 숙련된 검사자도 운동성 측정결과와 변이계수가 약 20%에 이르렀으며 높을 때는 40%를 보여, 실험자간에 10~20%의 변이계수가 이른다 고 하였다. 평균 변이계수는 실험자간에 44%, 동일한 실험자도 변이계수가 33%라고 하였다²². 또한 Jequier와 Ucome⁴⁰은 채취한 정액을 phosphate buffered saline로 부유후 formalin 고정하여 서로 다른 실험실에 검사의뢰 했을 때 실험실간의 변이계수는 평균 37.8% 이었고, 저농도의 정자에서 그 수치가 높아 최대로 73%까지 이르렀으며, 고농도에서 최소치는 23% 이었다고 하였다. 실험자간 변이계수는 정액을 고정후 vortex mixer로 충분히 섞은 동일한 drop내 정액을 2명의 실험자가 검사했을 때

에 2% 이었으나 동일한 시료를 서로 다른 drop을 반복하여 측정하였을 때 실험자간 변이계수가 10% 까지 증가되었으며, 동일한 시료 및 동일한 실험자도 drop간의 평균 변이계수도 8%에 이른다고 하였다. 이러한 결과로 볼 때 Dunphy *et al*²² 고전적인 방법으로는 객관성 및 재현성있는 정자분석에 한계가 있으므로 획기적인 방법이 모색되어야 한다고 하였다.

비록 정액자동분석기가 개발되기 이전에도 정자의 수, 평균속도 및 생존시간(life-time) 등이 수태율과 관련이 있을 것이라는 이론적 개념은 수립되었지만 정확하게 정자의 운동특성을 측정할 수 없었기에 공인되지 못하였다¹¹. 이미 1950년대에 정자의 궤도운동(track motility) 개념이 제안되었으나 1970년대에 이르러서야 소와 사람을 중심으로 이러한 이론이 이용되었다¹¹. 즉, 정액검사를 보다 객관적으로 실시하기 위해 laser light scattering 법, multiple exposure photograph 기법, video micrograph 사용법³⁰ 및 flow cytometric sorting 법^{7,46} 등을 활용한 분석 기법이 소개되었으나 근본적으로 기존의 육안적, 현미경적 방법의 한계를 벗어나지 못하였다.

컴퓨터를 이용한 정액의 분석은 1970년대 말에 몇몇 연구자에 의해 시도되었으나 부정확성으로 인해 인정되지 못하였고, 실제 화면에서 다른 이물질과 구별하여 정자를 인식할 수 있는 기종은 1980년대 후반에 이르러서야 개발되었다¹¹. 이러한 CASA 기법을 응용한 정자의 영상분석법은 정자 운동특성을 탐색하는데 광범위하게 활용되었으며 사람에서는 임상적으로 정액검사 과정을 상당히 개선시켰다¹⁹. 뿐만 아니라 실험자간, 실험실간 및 실험방법에 따른 주관적인 요인을 줄여 정확한 정액 검사를 가능하게 하였다¹.

정액분석기를 사용하면 정자의 농도(concentration; CON), 운동성(percent motile; MOT), 선형운동속도(straightline velocity; VSL), 곡선운동속도(curvilinear velocity; VCL), 평균경로속도(average-path velocity; VAP), 곡선경로 선형도(linearity; LIN), 측두거리(amplitude of lateral head

displacement ; ALH), 평균경로 선형도(straightness ; STR), 총 정자수(total concentration) 및 고활력정자(hyperactivated sperm percent ; HYP)의 운동특성을 정확히 분석할 뿐만 아니라 정자의 운동양태(wobble ; WOB, beat-cross frequency ; BCF, mean angular displacement ; MAD, dance ; DNC, dance-mean ; DNM)를 상세히 계산할 수 있다^{19,68}.

최근까지 정액분석기를 사용한 연구로는 몇가지 개발된 기종간 운동특성 수치 및 재현성의 비교^{1,34,45}, 주변장치, 기종과 육안적·현미경적 방법간의 정확성 검토^{13,32,42,43,44}, 표준화 가능성 제고 및 운영체계의 개선^{18,19}, 측정과정의 정확성 확보노력⁶, 정자의 처리에 따른 운동특성 분석에 관한 응용연구^{10,24,39}, 정자와 이물을 명확히 구분하기 위해 DNA 특이 형광염료(Hoechst bisbenzimidazole)로 IDENT 염색후 CASA를 활용하는 기법⁶² 등이 있었다. 연구대상으로는 사람^{16,36,53,61}, 소^{11,25,26,29,37}, 말⁶⁰, 고양이⁵⁶, 토끼^{25,26} 및 랫트⁵⁷ 등이었다.

국내에서도 개인용 컴퓨터를 사용한 정액분석기가 개발⁶⁹되어 현재 사람을 대상으로 임상에서 유용하게 적용되고 있으나^{64,65,67-69} 동물에서는 소에 기존 정액검사시각 항목의 수치에 대한 단순측정을 시도한 바 있으나 운동특성과 수태율 관련연구 및 표준화 연구는 접할 수 없었다.

정액분석은 남성불임 원인을 밝히고 수태능을 평가하기 위한 목적이며, 운동특성이나 형태학적 검사를 통하여 남성의 수태능을 예측하려는 시도로 비정상정자와 임신율과의 관계⁹, 정액의 질, 기존의 검사법에 의한 결과, 시간대별 photomicrography에 의한 운동성의 측정결과가 수태율에 미치는 영향^{2,3}, 정자의 유영운동 속도 및 다른 요인과 체외수정율의 비교^{31,41}, 정자의 형태학적 성상이 체외수정에 미치는 영향⁴⁷, 형태학적 비정상정자와 다른 분석요인들과 햄스터 난자투과시험 결과와의 관련성^{2,10,48}, CASA로 분석된 신선 및 동결융해 정액의 운동특성과 자궁내 인공수정후 임신결과와 상관성⁵¹, strict criteria 또는 CASA에 의한 정자의 형태학적 평가와 체내 임신과의 관련성이²³ 있었으며, 동물에서는 Budworth *et al*¹¹에 의해 소 동결융해 정액을 인공수정후 수태율과 관련성 분석에 관한 연구가 수행된 바 있다.

정액자동분석기는 현재까지 개발된 장치중 정자의 운동특성을 가장 정확히 분석할 수 있는 장치로서 이를 통해 분석된 남성의 정자 운동성은 수태능에 직·간접적으로 영향을 미치는 것으로 보고되었다^{23,51}.

정액자동분석기를 사용한 정자의 분석은 남성에서는 불임의 진단방법으로 검증되었으며, 정액분석의 표준이 제시된 바 있다⁵⁶. 그러나 남성의 불임판정은 정액성상에 관한 다양한 요소의 분석 즉, 정액의 량, 정자수, 운동성 및 형태를 적절히 고려하여 수정능과 불임판정을 하는 것이 최선의 방법이라고 알려져 있다^{8,41,58}. 또한 동물에서 Budworth *et al*¹¹은 정액자동분석기로 운동특성을 분석하고, 동일한 정자를 인공수정에 공여하여 수태율과의 관련성을 조사한 결과 단순비교할 때에는 유의성이 없었으나 상대적 수태지수와는 관련이 있다고 하였다. 또한 Garner²⁹는 정액자동분석기법은 빠르고 다수의 정자운동특성을 분석해 주지만 사멸정자와 이물을 구별해야 하는 등 몇가지 해결해야 할 문제점은 남아있다고 하였다.

정액자동분석기는 매우 정확하고 객관적인 자료를 얻을 수 있어 소에서 수태여부를 예측할 수 있는지에 대한 연구는 일부 보고되었으나 서로 다른 견해가 제시되어 있으며, 특히 한우에서의 관련 연구는 접하지 못하였다. 따라서 본 연구에서는 동결, 융해후 운동특성이 분석된 한우정액을 체외수정에 공여하여 수정란의 분할율과 운동특성의 상관관계를 분석하여 정자의 기능과 밀접한 관계가 있는 운동특성을 조사하여 정액의 질적 평가 기준지표로 제시하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

정액 분석 :

1) 정액의 채취. 동결 및 융해 : 실험에 공여된 한우 정액은 축산업협동조합중앙회 한우개량사업본부의 종모우에서 동사업소의 방법에 의해 채취 및 동결보존된 정액으로서 실험에 공여시까지 액체질소에 보관하였다. 서로 다른 종모우 정액을 각각 10 straw씩 구입하여 일부는 정액자동분석기로 운동특성을 분석하였으며, 나머지는 도축장유래 한우난자와 체외수정에 공여하여 분할율을 구하였다.

한우정액의 융해는 37℃ 수조에서 straw를 30초간 진탕 융해시키는 급속융해법을 채택하였으며 급속융해후 straw에 담겨있는 정액은 5ml tube에 옮겨 밀봉한 후 37℃ 수조에 배양시키며, 분석하였다. 정액은 희석시키거나 동결보호제를 제거하지 않은 상태로 실험에 공여하였다.

2) 정액의 분석의 기준 : 정액의 분석시 각 운동특성의 정의, 단위, 정액자동분석기의 기준, 측정항목 및 원리는 Davis *et al*¹⁷, Farrell²⁶ 및 이 등⁶⁸의 사항에 준하였다.

정자의 운동성 특성은 위상차 현미경(Olympus BX-50, Japan)과 CCD 카메라(Toshiba, Japan)를 통해 연결된 국내 Medical supply사(sperm image analyse system, SIAS) 장치로 분석하였다. 정액의 운동특성 분석시 대물렌즈의 배율은 10×로, CCD 카메라의 렌즈는 3.3×로 하였으며, Makler counting chamber(Sefi medical, Israel)상의 정 가운데 0.01mm²의 정사각형을 프로그램상의 크기 기준에 일치시켜 계산되는 모든 수치의 기준으로 설정하였다.

정액자동분석기는 실험전에 일정한 크기와 수가 고정되어 있는 accu-bead(Hamilton Thorne research, USA)를 사용하여 측정된 수가 제조사의 오차한계 허용범위내(18M/ml, between 15.5 and 20.5M/ml; 35M/ml, between 30 and 40M/ml)로 되도록 설정하였다.

본 실험에 사용된 SIAS 기종의 초기 설정치는 Table 1과 같다. 분석시 영상처리는 초당 30 frame이었고, 정자의 속도는 두부가 1초에 최소한 10μm 이상을 움직인 경우 운동성이 있는 것으로 정의하였다. 또한 정자의 최대 속도는 250μm/sec로 정의하였다. 한 시야에서 최대 측정 가능한 정자의 수는 400개였으며 한 시료를 10개의 시야(field)까지 분석할 수 있었다. 정자의 두부 크기는 15~80개의 화소로 정의하고, 정자의 속도는 1초에 최소한 10μm 이상 움직인 정자를 운동성이 있는 정자로 정의하였다. 또한 고휘력 정자 이외의 정자 최대속도는 250μm/sec로 정의한 후 운동경로 속도계산에 필요한 윈도우를 설정하였다.

정액분석시 현미경 stage 위에 장착된 Makler counting chamber 내부의 정액의 온도를 37℃로 유지시키기 위해 주 등의 방법⁷⁰에 준하여 micro-warm plate(Kitazato, Japan)를 설치하거나 현미경의 stage 전체의 온도를 유지해주는 Microscope warm stage(LEC instrument, Australia)를 사용하였으며, 현미경의 광원에 의한 온도상승은 1℃ 이하로 하였다.

3) 운동특성 분석 : 시료의 분석은 이 등⁶⁸, Davis와 Katz¹⁶의 방법에 준하여 실시하였다. 검사정보 입력시 정액량은 0.5ml(0.5ml/straw)으로, debris rate 0%로 하였다. 분석시 이물질이 정자로 오인되는 것을 방지하기 위해 화면상에서 실제 정자의 영상과 이진영상을 반복하

여 비교하며 이진영상의 밝기와 대비를 세밀히 조절하였다. 또한 필요시에는 입력된 자료의 곡선이동경로와 평균이동경로를 확인하여 실제 정자만이 인식되었는지를 확인하였다.

정액(5μl)은 미리 가운데되어 37℃로 유지된 Makler counting chamber에 넣은 후 시야당 1초씩 5~10개의 시야를 선택하여 시스템에 입력시켜 1시야가 1초 노출되는 동안 30 frame을 분석하여 평균치를 계산하였다. 측정시 사용된 Makler counting chamber는 시료의 깊이가 10μm로 고정된 것이었다. 시료는 운동특성의 측정시 vortex mixer로 충분히 섞었다. 모든 시료의 분석은 동일한 조건과 숙련된 2인의 실험자가 실시하였다.

정액자동분석기에 의해 분석되는 정자 각각의 운동특성은 Fig 1과 같다. 정자의 실제이동경로인 곡선경로속도(curvilinear velocity; VCL, μm/s), 곡선이동경로에 대한 평균이동을 나타내는 평균경로속도(average-path velocity; VAP, μm/s), 단위시간당 시점에서 종점까지의 속도를 나타내는 직선경로속도(straight line velocity; VSL, μm/s), 평균이동경로와 실제이동경로와의 측방거리차인 측두거리(amplitude of lateral head displacement; ALH, μm), 정자 두부의 이동시 회전각의 절대값(mean angular degree; MAD, degree) 및 실제이동경로가 평균이동경로와 만나는 횟수의 시간당 비율(beat-cross frequency; BCF, Hz)을 측정하였으며, 정자의 이동궤도에 따른 이들의 정의를 정하였다.

또한 자동정액분석기는 상기에 언급한 운동특성들을

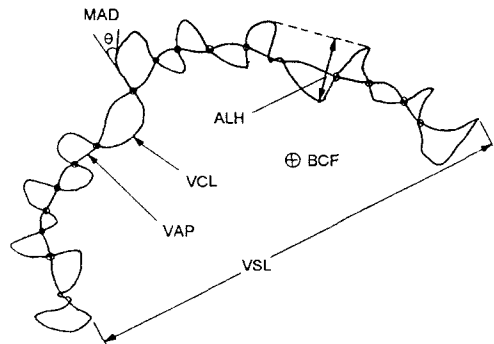


Fig 1. Traditional measures of sperm-head swimming trajectory pattern and vigor. VCL = curvilinear velocity(μm/sec); VSL = straightline velocity(μm/sec); VAP = average pathway velocity(μm/sec); ALH = amplitude of lateral head displacement; BCF = beat-cross frequency; MAD = mean angular displacement.

바탕으로 곡선경로 선형도(linearity; LIN, %), 평균경로 선형도(straightness; STR, %), 곡선진진을 값으로 wobble(WOB, %), 정자운동 모양의 값으로 dance(DNC) 및 dance-mean(DNM, μm)를 그리고 $80\mu\text{m}/\text{sec}$ 이상의 VCL, $6.5\mu\text{m}$ 이상의 ALH 및 65% 이하의 LIN로 정의되는 고탈력정자(hyperactivated sperm; HYP, %)의 요소를 계산하였을 뿐만 아니라 정자의 농도(concentration; CON, million/ml) 및 운동성(motility; MOT, %)을 측정하였다.

난자의 준비 및 체외수정 : 난자의 준비 및 체외수정의 전과정은 황 등⁷¹의 방법에 준하였으며, 주요 단계는 다음과 같이 실시하였다.

1) 난자의 채취 : 난소는 도축된 한우로부터 채취하여 100IU/ml penicillin G(Sigma Chemical Co., USA)와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin(Sigma Chgchemical Co, USA)이 함유된 생리식염수(37 $^{\circ}\text{C}$)에 넣어 실험실로 운반하였다. 난소에서 난자의 채취는 18 gauge 주사침이 부착된 10ml 주사기로 5% 소 태아혈청(fetal calf serum; FCS)이 첨가된 tissue culture medium 199(Life Technologies Inc, USA, TCM199)를 소량 흡인한 후 직경 2, 8mm인 난포에서 미성숙난자를 흡인하였다.

회수된 미성숙난자는 3회 세정하고 육안적 기준에 준해 난구세포가 긴밀하며 2층 이상 부착되어 있고 균질한 난구세포질을 갖는 난자를 선발하여 실험에 공여하였다.

2) 체외성숙 : 기본 배양액은 10% FCS 첨가 TCM 199을 사용하였고 배양액이 분주된 4, well(Nunc, USA)의 각 well에 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FSH(US Department of Agriculture, USA) 및 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estradiol, 17 β (Sigma Chemical Co, USA)를 첨가하였다.

과립막 세포의 채취는 Moor와 Trounson의 방법⁵²에 준하여 육안적으로 정상이라 판단되는 직경 10~15mm의 난포를 적출하여 주변의 결합조직을 제거한 후 난포막을 파열시켜 난포의 내강을 밖으로 노출시켰다. 핀셋을 사용하여 TCM199 배양액 내에서 과립막세포를 채취하였다⁶⁶. 공배양을 위해 과립막 세포는 TCM199으로 3회(700 $\times\text{g}$, 3회) 원심분리하여 세정한 후 각 well당 5×10^6 cells/ml이 되도록 첨가하여 성숙에 공여하였다. 선별된 난자는 각 well당 10~15개씩 첨가하여 39 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다.

3) 체외수정 :

(1) 정자처리 : 정액은 운동특성을 분석한 후 체외수정에 공여하였고, 기본 배양액은 modified Tyrode medium

(Fukui, 1990; TALP)²⁸을 이용하였다.

동결정액은 37 $^{\circ}\text{C}$ 수조에 30초간 담그어 용해시킨 후 정액자동분석기를 이용하여 운동성을 확인하고 육안적인 검사를 실시하였다. 동일한 종모우 유래의 정액에 대한 분할율을 구하기 위하여 동일한 종모우 유래 동결용해 정액 3 straws를 체외수정에 이용하였다. 열개의 12 \times 75mm plastic tube(Falcon, USA)에 capacitation TALP를 0.8ml씩 분주한 후 0.2ml의 용해된 정액을 각각 첨가하여 5% CO₂ 배양기내에서 50분간 배양후 활력이 뛰어난 정자를 선별하는 swim-up 과정을 거쳤다. 플라스틱 튜브의 상층액 0.8ml씩을 하나의 15ml conical tube(Falcon, USA)에 모아 원심분리(500 $\times\text{g}$, 10분)한 후 micropipette을 이용하여 상층액을 제거하였다. 이후 정자의 수정능 획득을 위해 원심관에 들어있는 정액과 동량의 heparin 용액(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가하고 5% CO₂ 배양기에서 15분간 정지하였다.

(2) 난자의 준비 : 정자를 swim-up시키는 동안 *in vitro* fertilization(IVF)용 TALP로 35mm의 petridish에 43 μl 의 drop을 작성한 후 mineral oil을 도포하여 CO₂ 배양기내에서 미리 배양하였다. 배양 24시간 동안 성숙시킨 난자를 세정용 TALP로 3회 세정하여 팽대된 난구세포를 1/3 정도로 벗긴 난자를 각 TALP drop에 5 μl 로 5개씩 첨가하였다.

(3) 체외수정 : 수정능 획득을 위한 heparin 처리후 정자 4 μl 를 수정용 drop에 첨가하여 최종농도가 $2.5\times 10^6/\text{ml}$ 가 되도록 하였으며, 5% CO₂ 배양기내에서 30시간동안 배양하여, 체외수정을 유도하였다.

(4) 분할난자의 검사 : 난자의 분할율 검사는 황 등⁷¹의 방법에 준하여 실시하였다. 체외수정에 공여한 미성숙난자는 30시간 후 난구세포를 mouth pipetting으로 제거한 후 2세포기 이상인 수정란을 분할난자의 수로 계산하였다.

통계학적 분석 : 한우정액의 동결용해후 운동특성과 체외수정후 분할율과의 관계는 linear regression으로 분석 및 F-test에 의해 검증하였다.

결 과

한우수정란의 분할율 : 한우 종모우(n = 26) 유래 동결용해 정액을 체외수정에 공여하였을 때 이용된 난자의 수, 분할 수정란의 수 및 분할율은 Table 1에서 보는 바

와 같다. 분할율은 36.2%에서 89.2% 범위였으며 평균 분할율은 64.1% 였다.

Table 1. Cleavage rates of *in vitro* fertilized oocyte with different semen in Korean native cattle

Semen	No. of oocyte used	No. of oocyte cleaved	Cleavage rates(%)
1	145	53	36.6
2	119	86	72.3
3	128	107	83.6
4	107	75	70.1
5	143	55	38.5
6	129	77	59.7
7	185	154	83.2
8	123	97	78.9
9	105	97	68.8
10	150	60	40.0
11	118	64	54.3
12	116	80	69.0
13	166	148	89.2
14	99	66	66.7
15	180	113	62.8
16	139	75	54.1
17	193	153	79.3
18	151	94	62.3
19	140	56	40.0
20	178	126	70.8
21	188	80	42.6
22	134	95	70.9
23	130	73	56.2
24	158	106	67.1
25	140	72	51.4
26	111	54	48.7

정자의 운동특성과 분할율의 상관관계 : 동결융해 정자의 성장과 여러가지 운동특성을 분석후 동일한 정자를 체외수정에 공여하여 한우 체외수정란의 분할율과의 상관관계를 알아본 결과는 Fig 2에서 Fig 15까지의 그래

프에서 보는 바와 같다.

각각의 Fig에서 R^2 은 상관지수를 표시하며, m은 추세선의 기울기를 의미한다. 그래프의 중앙의 직선은 결과치의 추세선을 의미하며, 양쪽의 곡선은 결과치에 대한 95% 신뢰구간의 구역을 표시하며, 양 곡선사이의 구간은 신뢰구간이다.

1) 분할율과 CON의 상관관계 : 한우동결정액의 융해 직후 정자농도인 CON과 체외수정에 공여하여 얻은 분할율과의 상관관계를 나타낸 결과는 Fig 2에서 보는 바와 같다.

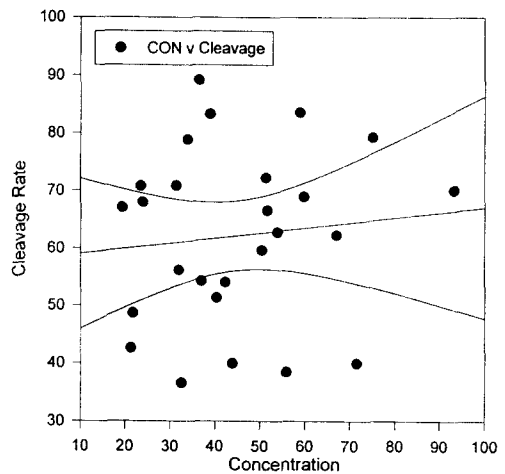


Fig 2. Linear regression analysis of the relationships between cleavage rate and concentration in Korean native cattle semen. R^2 (correlation coefficient) = 0.012(m/slope) = 0.089. The middle lines is the least-squares regression and the outer lines are the 95% confidence interval for regression.

체외수정란의 분할율과 CON을 선형 회귀분석 하였을 때 상관지수인 $R^2 = 0.012$ 였으며, 기울기인 $m = 0.089$ 이었다. 이를 F-test 하였을 때 유의적인 상관관계는 인정되지 않았다.

2) 분할율과 MOT의 상관관계 : 실험에 공여된 한우정액의 체외수정란 분할율과 동결융해 직후의 MOT와의 상관관계의 결과는 Fig 3에서 보는 바와 같다.

분할율과 MOT와의 상관관계를 보았을 때 대부분의 개체는 95% 신뢰구간에 포함되었으며($p < 0.05$), R^2 은 0.159 였다. 또한 $m = 0.369$ 였다.

3) 분할율과 VCL의 상관관계 : 정자의 실제이동경로 속도인 VCL과 체외수정란의 분할율과의 상관관계는 Fig 4에서 보는 바와 같다. 그래프에서와 같이 R^2 은 0.162로

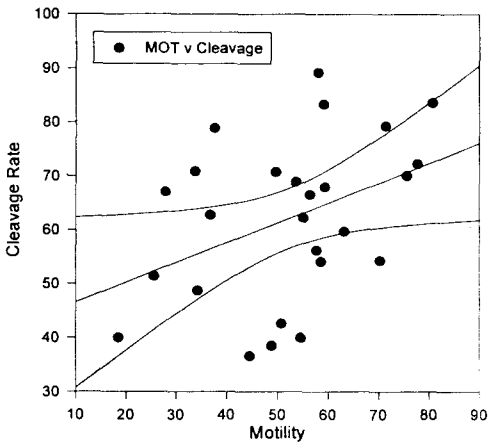


Fig 3. Linear regression analysis of the relationships between cleavage rate and motility in Korean native cattle semen. R^2 (Correlation coefficient) = 0.159, $p < 0.05$ m (slope) = 0.369 The middle line is the least-squares regression and the outer lines are the 95% confidence interval for regression.

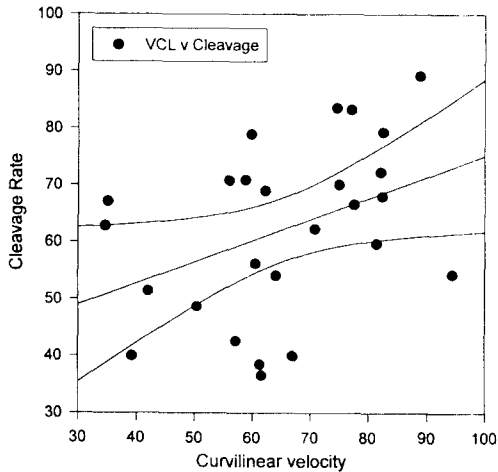


Fig 4. Linear regression analysis of the relationships between cleavage rate and curvilinear velocity in Korean native cattle semen. R^2 (Correlation coefficient) = 0.162, $p < 0.05$ m (slope) = 0.373 The middle line is the least-squares regression and the outer lines are the 95% confidence interval for regression.

F-test 결과 VCL과 체외수정란의 분할율과는 유의적인 상관관계를 보였다($p < 0.05$). 또한 추세선의 m 값은 0.373으로 나타났다.

4) 분할율과 VSL의 상관관계 : 체외수정란의 분할율과 수정에 공여된 정자의 운동특성인 VSL과의 상관관계는 Fig 5에서 보는 바와 같다.

분할율과 VSL과의 R^2 값은 0.159로 유의적인 상관관계를 보였다($p < 0.05$). 이때 추세선의 m 값은 0.591로 나타났다.

5) 분할율과 VAP의 상관관계 : 동결융해 한우정액의 VAP와 동일한 정자를 체외수정에 공여하여 얻은 분할율과의 상관관계를 조사한 결과는 Fig 6과 같다.

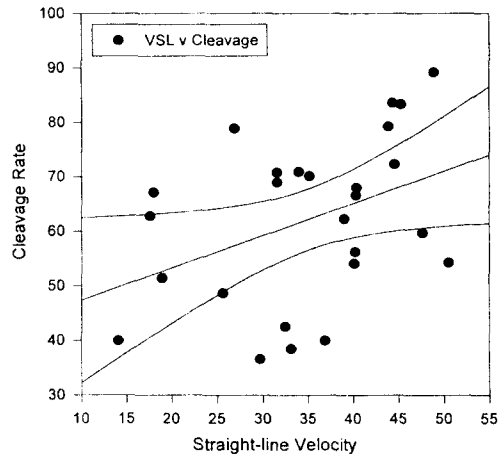


Fig 5. Linear regression analysis of the relationships between cleavage rate and straight-line velocity in Korean native cattle semen. R^2 (Correlation coefficient) = 0.159, $p < 0.05$ m (slope) = 0.591 The middle line is the least-squares regression and the outer lines are the 95% confidence interval for regression.

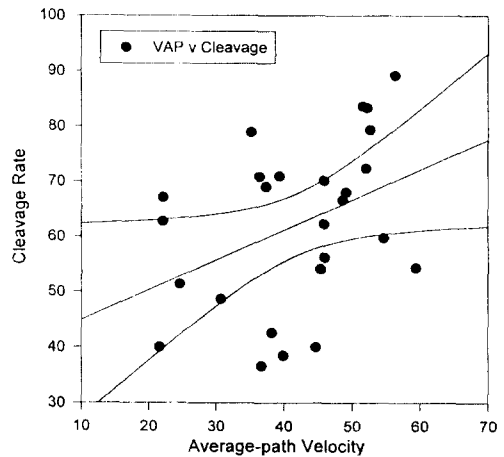


Fig 6. Linear regression analysis of the relationships between cleavage rate and average-path velocity in Korean native cattle semen. R^2 (Correlation coefficient) = 0.156, $p < 0.05$ m (slope) = 0.542 The middle line is the least-squares regression and the outer lines are the 95% confidence interval for each regression.

체외수정란의 분할율과 VAP와는 R^2 이 0.156으로 나타나 유의적인 상관관계를 보였다($p < 0.05$).

6) 분할율과 LIN의 상관관계 : 정자운동특성으로 계산된 LIN과 분할율과의 상관관계는 Fig 7과 같다. 한우 정자를 체외수정에 공여하여 얻은 분할율과 LIN과의 관계는 그래프상의 결과와 같이 무관한 위치로 분포하여 상관지수가 $R^2 = 0.042$ 였으며, F-test 결과 유의적인 관계는 인정되지 않았다. 이때 m 값은 0.507 이었다.

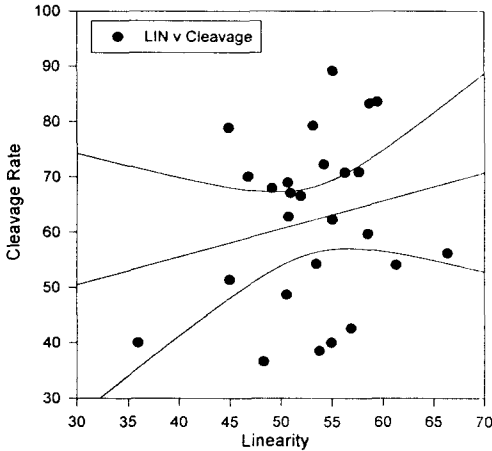


Fig 7. Linear regression analysis of the relationships between cleavage rate and linearity in Korean native cattle semen. R^2 (Correlation coefficient) = 0.042, m (slope) = 0.507
The middle line is the least-squares regression and the outer lines are the 95% confidence interval for each regression.

7) 분할율과 ALH의 상관관계 : 체외수정 한우난자의 분할율과 정액자동분석기로 분석한 ALH와의 상관관계는 Fig 8에서 보는 바와 같다.

체외수정유래 난자의 분할율과 ALH와는 R^2 의 값이 0.175로 유의적인 높은 상관관계를 보였다($p < 0.05$). 대부분의 결과치는 추세선을 중심으로 95% 신뢰구간내에 존재하였다. 이때 추세선의 m 값은 8.068 이었다.

8) 분할율과 HYP의 상관관계 : 체외수정란의 분할율과 HYP와의 상관관계를 나타낸 그래프(Fig 9)으로 대부분의 결과치들은 추세선과 무관하게 간격을 두고 분포함을 볼 수 있다.

이때 R^2 값은 0.139로 F-test 결과 유의성은 인정되지 않았으며, m 값은 1.446으로 나타났다.

9) 분할율과 STR의 상관관계 : 평균이동경로의 일직

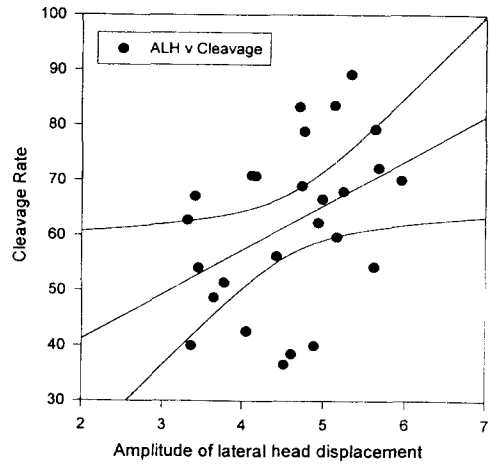


Fig 8. Linear regression analysis of the relationships between cleavage rate and amplitude of lateral head displacement in Korean native cattle semen. R^2 (Correlation coefficient) = 0.175, $p < 0.05$ m (slope) = 8.068
The middle line is the least-squares regression and the outer lines are the 95% confidence interval for each regression.

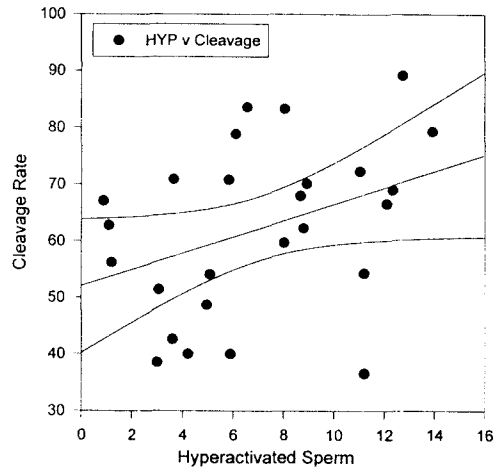


Fig 9. Linear regression analysis of the relationships between cleavage rate and hyperactivation in Korean native cattle semen. R^2 (Correlation coefficient) = 0.139 m (slope) = 1.446.
The middle line is the least-squares regression and the outer lines are the 95% confidence interval for each regression.

선비인 STR과 한우 체외수정란의 분할율과의 상관관계는 Fig 10에서 보는 바와 같다.

대부분의 결과치는 일정한 STR 값의 범위에 치중되어 분포하였으며 추세선을 따른 고른 분포는 인정되지 않았

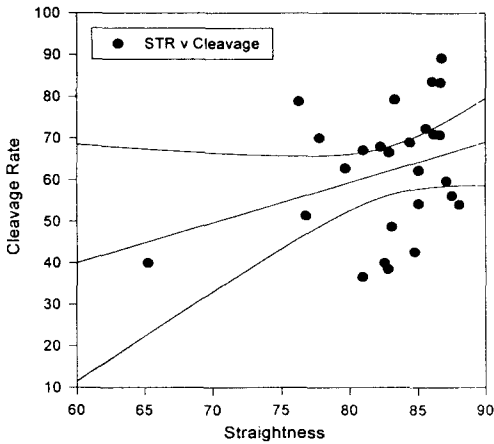


Fig 10. Linear regression analysis of the relationships between cleavage rate and straightness in Korean native cattle semen. R^2 (Correlation coefficient) = 0.097 m (slope) = 0.968. The middle line is the least-squares regression and the outer lines are the 95% confidence interval for each regression.

다. 선형회귀 분석치를 F-test 검정한 결과 유의적인 상관분포는 인정되지 않았다. 이때 m 값은 0.968로 나타났다.

10) 분할율과 BCF의 상관관계 : 체외수정란의 분할율과 그 정자의 BCF와의 상관관계는 Fig 11에서 보는 바와 같다.

그래프에서와 같이 결과치의 일치점들은 추세선을 중

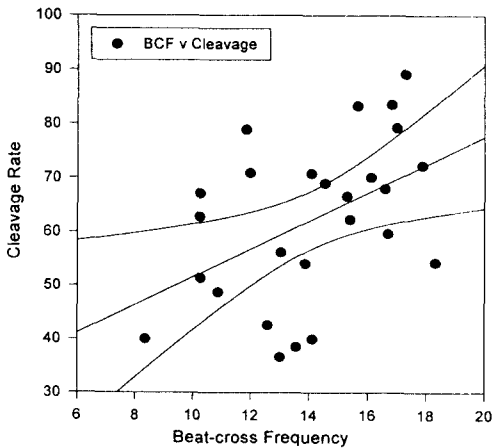


Fig 11. Linear regression analysis of the relationships between cleavage rate and beat-cross frequency in Korean native cattle semen. R^2 (Correlation coefficient) = 0.218, $p < 0.05$ m (slope) = 2.606. The middle line is the least-squares regression and the outer lines are the 95% confidence interval for each regression.

심으로 95% 신뢰구간내 및 주위에 분포하는 강한 상관관계를 나타내었다($p < 0.05$). 상관지수인 R^2 도 높은 0.218치를 나타냈다. 이때 m 값은 2.606으로 계산되었다.

11) 분할율과 MAD의 상관관계 : 정자의 머리가 실제 이동거리를 따라서 순간적으로 방향을 변경할 때 각의 절대값인 MAD와 분할율과 상관관계는 Fig 12에서 보는 바와 같다.

분할율과 MAD 값이 만나 형성된 점의 대부분은 추세선 주위에 강하게 분포되어 유의적인 상관관계를 보였다($R^2 = 0.227$, $m = 1.730$, $p < 0.05$).

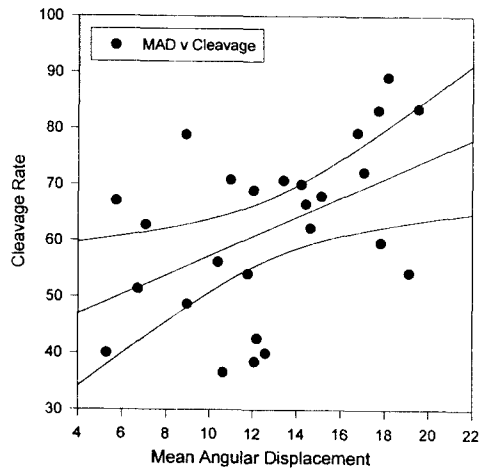


Fig 12. Linear regression analysis of the relationships between cleavage rate and mean angular displacement in Korean native cattle semen.

R^2 (Correlation coefficient) = 0.227, $p < 0.05$ m (slope) = 1.730. The middle line is the least-squares regression and the outer lines are the 95% confidence interval for each regression.

12) 분할율과 WOB의 상관관계 : 한우 체외수정란의 분할율과 수정에 공여된 정자의 WOB와의 상관관계는 Fig 13에서 보는 바와 같이 분할율과 WOB와 만난점은 추세선을 중심으로 무관하게 분포하는 양상을 볼 수 있어 유의적인 상관관계는 인정되지 않았다($R^2 = 0.012$, $m = 0.385$).

13) 분할율과 DNC의 상관관계 : 체외수정란의 분할율과 정자운동 모양의 값인 DNC와의 상관관계를 나타낸 결과는 Fig 14에서 보는 바와 같다.

그림에서와 같이 분할율과 DNC가 만난 일치점은 추세선 및 95% 신뢰구간과 무관하게 존재하여 통계학적으로 유의적인 상관관계는 인정되지 않았으며, R^2 은 0.012였

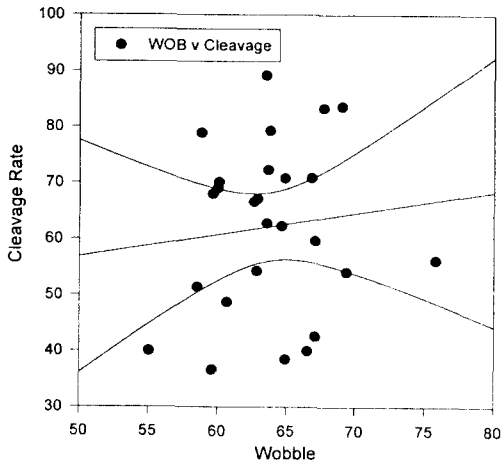


Fig 13. Linear regression analysis of the relationships between cleavage rate and wobble in Korean native cattle semen. R^2 (Correlation coefficient) = 0.012, m (slope) = 0.385. The middle line is the least-squares regression and the outer lines are the 95% confidence interval for each regression.

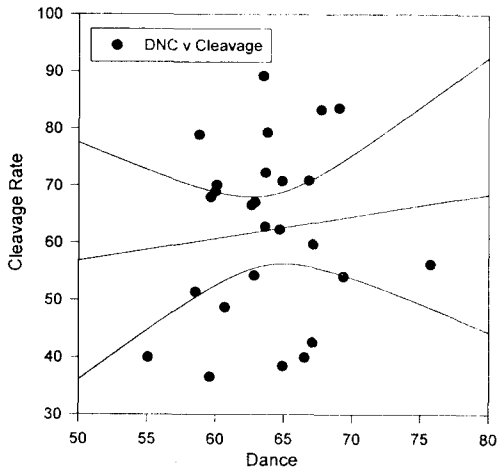


Fig 14. Linear regression analysis of the relationships between cleavage rate and dance in Korean native cattle semen. R^2 (Correlation coefficient) = 0.012, m (slope) = 0.385. The middle line is the least-squares regression and the outer lines are the 95% confidence interval for each regression.

고, m 값은 0.385였다.

14) 분할율과 DNM의 상관관계 : 정자 운동모양의 값인 DNM과 동일한 정자를 한우 난자와 체외시 분할율과의 상관관계는 Fig 15에서 보는 바와 같다.

그림의 결과와 같이 점들의 분포는 추세선을 중심으

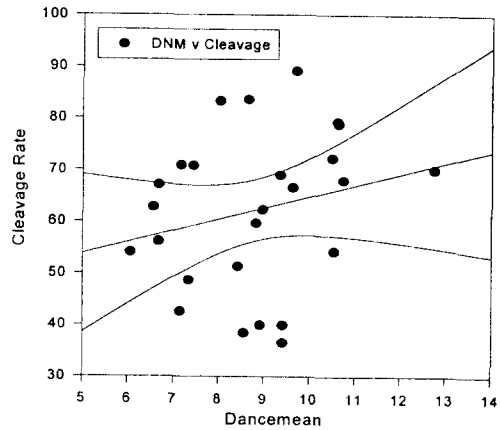


Fig 15. Linear regression analysis of the relationships between cleavage rate and dancemean in Korean native cattle semen. R^2 (Correlation coefficient) = 0.056, m (slope) = 2.198. The middle line is the least-squares regression and the outer lines are the 95% confidence interval for each regression.

로 상당히 넓게 흩어져 분포함을 알 수 있어 이때 상관 계수인 R^2 의 값은 0.056이었으며, m 값은 2.198이었다. R^2 값에 대한 F-test 결과 유의적인 관계는 인정되지 않았다.

고 찰

정액검사는 시료의 채취 및 분석이 용이하고 많은 불임에 관한 정보를 얻을 수 있어 동물 및 남성에서 수태율을 저하시 가장 기본적인 검사방법으로 알려져 있다^{15,21,23,29,35,36,55,62}.

정액자동분석기의 개발은 정액검사에 있어 기존의 방법보다 객관성 및 재현성을 높일 뿐만 아니라 신속히 운동특성 및 형태학적 검사를 가능하게 하였다^{12,29,65}. 또한 육안적·현미경적 방법을 통한 정액검사에서는 불임에 대한 제한된 정보밖에 얻을 수 없었으나 정액자동분석기의 활용으로 다양한 정자의 기능과 밀접한 정자성상 및 운동에 대한 특성을 정확하고 신속히 알 수 있게 되었다^{5,27,33,50,61}.

본 연구는 정액자동분석기를 이용하여 운동특성이 분석된 한우정액을 한우난자와 체외수정에 공여하여 분할율을 구하여 이들의 상관관계를 구함으로써 수태율을 예측할 수 있는 체외평가모델을 설정하였다. 임신율 평가는 암소에 인공수정을 실시하여 임신여부를 판단하여야 하겠지만 *in vivo*에서 평가를 할 경우 수태율에 영향

을 미치는 다양한 요인이 개입될 수 있다는 문제점이 있다. 이러한 요인으로는 난소상태, 생식기의 병리학적 상태, 인공수정기술 정도, 환경적 요인 및 조기태아사 등이 직·간접적으로 결과에 영향을 미치게 된다. 그러나 본 실험에 공여된 난소는 도축장 유래로서 공란우의 발정주기, 질병상태 및 유전능력 등을 실험에 반영하지는 못하였으나 다수의 암소(1회 10~30두)에서 채취된 다수의 난자로 개체에 따른 변이치를 최소화 되도록 설정하였을 뿐만 아니라 체외배양 체계는 동일한 배양조건 및 동일한 실험자가 실시하였다.

한우 종모우(n=26) 유래 동결융해 정액을 체외수정에 공여하였을 때 분할율은 36.2%에서 89.2% 범위였으며, 평균 분할율은 64.1%였다. 실험결과 분할율의 다양한 넓은 범위로 분포하는 것은 다음과 같은 이유 때문인 것으로 추정된다. 일반적인 체외수정 실험시에 공여되는 정액은 3두 이상의 서로 다른 종모우 정액을 이용하여 실험실내 변이가 낮은 범위이나 본 실험시에는 1회 체외수정시 동일한 종모우 유래 정액만을 이용하였다. 이는 각 종모우에서 채취한 정액의 기능을 보기 위함이었으며, 이러한 이유로 인하여 분할율에 다양한 결과를 보인 것으로 사려된다. 또한 난자수가 적은 경우, 육안적으로 난자의 질적 검사시에 난질의 현격한 저하가 있는 경우는 정확한 분석을 위하여 실험에서 제외시켰다.

체외수정시 분할율과 DNM과의 관련성을 검토한 결과 R²값은 0.056으로 유의적 관계는 발견할 수 없었으며 직접 비교할 보문은 접하지 못하였다.

본 실험에서 체외수정시 분할율과 HYP와의 관련성을 검토한 결과 R²값은 0.139로 유의적 관계는 인정되지 않았으며, 동결융해 직후의 정액내에 고효력 정자(HYP)의 비율은 한우 미성숙난자의 체외수정후 분할율과 큰 영향을 미치지 못하였다. 이는 체외수정시 정자의 swim-up 처리과정에서 별도로 고효력의 정자를 선별하기에 용해직후 동결보호제가 포함된 정액내의 고효력정자는 본 실험에서는 직접적인 영향을 미치지 않은 것으로 사려된다.

현미경적 정액검사법에서는 꼬리부분이 조금이라도 움직이면 운동성이 있는 정자로 판정하지만 정액자동분석기법에서는 MOT의 의미는 정자의 두부 VCL이 10µm/sec 이상인 것을 운동성 있는 것으로 판정하기 때문에 정액자동분석기에 의해 측정된 값의 절대치는 현미경적 방법과 차이가 있을 수 있지만 상대적인 증가 또는 감소

경향은 유사하다. 정자의 MOT는 정액의 성상을 검사하는 고전적인 방법의 하나로 정자의 질과 동일시 하였다. 정자의 운동특성이 다른 두 시료는 수태능이 서로 다르게 나타난다고 보고되어 정액의 시료간에 MOT의 현격한 차이가 있을 경우 수태율에 반영됨이 밝혀 있다²⁰. 동결정액이 용해로 인해 정자가 해를 입어 수태율이 낮은 경우에 MOT가 낮으며, 이는 수태율에 영향을 미칠 수 있다고 보고되었다^{18,58,64}. 남성 정자를 분석시 MOT는 수태능력에 직접 또는 간접적으로 영향을 미치는 것으로 알려져 있어^{2,30} 본 실험의 결과 한우 정액에서도 MOT(R²=0.159)는 체외수정후 분할율과 유의적인 관련이 있는 것으로 나타나 정자의 기능과 밀접하다고 판정되며, 수태율을 예측할 수 있는 요인이라 사려된다.

남성에서 ALH의 값이 낮거나 비정상적인 침체를 가진 정자는 체외수정에 공여시 수태성적이 낮을 수 있다고 알려져 있다⁴¹. 또한 사람의 정자에서 ALH는 자궁경점액 통과실험시 이와 관련이 있다고 보고되었다^{5,38,50}. 이러한 ALH가 낮은 경우에 사람에서 임신율이 낮아지는 경향이 있다고 보고되었다^{3,4,48}. 소 정자도 배양시간 경과에 따라 ALH치가 감소한다고 보고되었으며³⁷, 정자의 ALH는 MOT 및 HYP와도 깊은 관련이 있다고 알려져 있다^{35,36}. 사람 체외수정 프로그램에서 swim-up 기법으로 분리된 정자의 ALH는 또한 수태능과 관련이 있었으며⁴¹ 소의 동결융해 정액의 수태지수(competitive fertility index)와도 관련이 있었다¹¹. 더욱이 사람에서 ALH는 체외수정율과 유의적인 관련성이 있었다고 보고되었으며 HYP와 MOT, 전진운동 및 VAP와도 상관관계가 있었다¹⁴. 본 연구에서 ALH와 체외수정후 분할율과 운동특성과의 상관관계를 검토하였을 때 R²=0.175로 강한 상관관계(p<0.05)를 보여 수태율을 예측하는 주요한 지표 및 정자의 기능을 판정하는 지수로 활용가능할 것으로 사려된다.

채취된 남성 정자를 적절한 배지에서 배양하여도 VCL이 증가하지 않고 감소한다고 보고하였다^{37,59}. 더욱이 VCL과 ALH는 사람의 정자에서 상관관계가 있는 것으로 알려져 있으며⁴⁹ 또한 사람에서 VCL은 햄스터 투명대 제거 난자의 투과시험 결과치와도 관련된 요인으로 나타나 수태율과 연관이 있는 것으로 보고되었다^{30,31}. 한우에서 VCL은 체외수정란의 분할율과의 상관지수의 R²=0.162로 유의적인 관계를 보였다. 한우에서 VCL은 체외수정란의 분할율에 밀접한 관계를 지님으로서 정자의

기능성 및 수태율과 직접 관련이 있을 것으로 추정된다.

한우 동결융해 정액의 VSL의 $R^2 = 0.159$ 로 나타나 체외수정란의 분할율과 유의적인 상관관계를 나타냈다. 이 결과는 다른 보문과 직접 비교할 수 없었으나 한우에서 VSL은 정자의 기능 및 수태율 예측에 활용 가능하리라 판단된다.

남성의 정액을 동결전후 정액자동분석기로 분석 비교하였을 때 VSL, VCL 및 ALH는 현저한 감소가 나타나 이들 요인은 미리 감소를 예측할 수 있다고 보고된 바 있다²⁰. 즉, 동결융해로 인한 손상으로 수태율이 감소하는 것으로 알려져 있어 동결융해 전후에 여러가지 물리적 성상에 변화로 인한 운동특성의 변화는 직접적으로 수태율에 영향을 준다는 보고²⁰로 미루어 본 실험에서도 VSL, VCL 및 ALH는 체외수정후 분할율과 유의적인 상관관계가 존재한 점을 감안하면 수태율 예측에 활용 가능할 것으로 사려된다. 또한 Paston *et al*⁵⁴은 불임과 가임군으로 나누어 정액자동분석기로 정액을 분석한 결과 VCL, VSL, ALH 및 MAD 은 두 군간에 구분이 가능하였다고 하여 본 실험과 유사한 결과를 보였다.

정자 운동특성중 MAD는 정자 두부가 실제이동경로를 따라서 이동할때 회전각의 절대값으로 이 값의 감소는 정자 두부의 회전폭이 좁아짐을 의미하며 운동양상의 약화가 초래되었다고 추정할 수 있다. 한우 난자와 체외수정시 분할율과 MAD와는 상관지수 $R^2 = 0.227$ 로 강한 상관관계를 보여, 이는 한우 정자의 기능에 밀접한 관련이 있는 것으로 사려된다.

운동특성중 DNC 또한 VCL×ALH에 의해 계산되며, 정자운동 모양의 값으로 운동양상이 감소했음을 알 수 있다. 체외수정시 분할율과 DNC와 R^2 은 0.012로 유의적인 상관관계는 없었다. 본 실험결과에서 DNC는 동결융해 한우정자의 기능과 직접적인 관련성을 찾을 수 없었다.

융해후 측정된 LIN, STR 및 WOB의 경우, LIN은 VSL/VCL로 계산되는 실제이동경로의 직선비이며, STR은 VSL/VAP로 평균이동경로의 직선비로서 LIN과 STR은 모두 정자의 운동시 선형도를 의미한다. 한우 동결융해 정액의 LIN 및 STR의 분할율과 관련성에 있어 상관지수가 $R^2 = 0.042$ 및 0.097로 유의성은 인정되지 않았다. 실험의 결과를 직접 비교할 보문은 접할 수 없었으나 동결융해 한우정자의 LIN과 STR은 정자의 기능과 유의적인 관계는 없었던 것으로 나타났다. 운동특성중 LIN은 사

람의 IVF의 성공을 위한 중요한 요소로 알려져 있다⁴⁹. 본 실험에서 LIN의 측정치(49.50±11.36%)는 신선 소 정액을 modified Tyrode's+heparindor에 배양시 측정된 치(52~80%) 및 Iqbal과 Hunter³⁷의 결과치 보다는 낮았으나 소에서 동결융해 정액은 4.2~6.8%¹¹ 및 사람의 8.9~28.9%⁵⁹이었다는 결과치 보다는 상당히 높아 수태율에 직접적인 영향은 미치지 않은 것으로 사려된다.

또한 WOB는 VAP/VCL의 비율로 곡선전진율을 의미하며 한우 난자와의 체외수정시 분할율과의 상관지수는 $R^2 = 0.012$ 로 유의성은 발견할 수 없었다. 그러므로 실험 결과 WOB와 한우정자의 기능성과의 통계학적 관련성은 없었다.

본 실험에서는 도축장 유래 난소에서 채취한 한우난자의 체외수정시에는 TALP로 swim-up 과정을 거친 후 heparin 용액을 첨가하여 수정능 획득의 과정을 거친 후 최종농도 2.5×10^6 개/ml의 정자를 활용하였다. 즉, 정자의 처리과정을 거쳐 일정량의 정자를 IVF에 첨가하였기에 융해직후 CON과 체외수정란의 분할율은 본 실험에서는 직접적인 영향은 없는 것으로 판단된다($R^2 = 0.012$).

정액자동분석기법에 의해 분석된 MOT, VCL, VSL, VAP, BCF, ALH 및 MAD의 운동특성은 체외수정시 수태율과 유의적인 상관관계를 보임으로써 정자의 기능성을 판정할 수 있는 유용한 자료로 인식되며, 궁극적으로 정액자동분석기법은 임상에서 한우 수태율을 예측하기 위하여 유용하게 이용할 수 있을 것으로 사려된다.

향후 정액검사를 통한 정자의 기능성 판정 및 수태율의 예측은 하나의 주요 특성에 편향되게 의존하거나 모든 특성 또는 특성을 동일한 비중으로 해석하는 것은 적절치 못하며, 수태율 예측에 대한 정확성을 높이기 위하여 심도깊은 분석법과 기준의 제시가 필요할 것이다.

결 론

정액자동분석기를 활용하여 정자 운동특성이 분석된 한우동결정자를 한우난자와 체외수정에 공여하여 얻은 분할율과의 상관관계를 비교 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 한우수정란의 분할율 : 한우 종모우(n=26) 유래 동결융해 정액을 체외수정에 공여하였을 때 분할율은 36.2%에서 89.2% 범위였으며, 평균 분할율은 64.1% 였다.
2. 정자의 운동특성과 분할율의 상관관계 : 동결융해

한우정액의 운동특성을 분석하고 동일 정액을 한우난자와 체외수정에 공여후 분할율을 얻어 두 요소의 상관관계를 분석한 결과 MOT, VCL, VSL, VAP, ALH, BCF 및 MAD는 다음과 같이 유의적인 상관관계가 인정되었다($p < 0.05$). 체외수정관 분할율과 동결융해 직후의 MOT와의 유의적인 상관관계($p < 0.05$)가 인정되었으며, R^2 은 0.159 였고, $m = 0.369$ 였다. 분할율과 VCL은 R^2 이 0.162로 유의적인 상관관계를 보였으며($p < 0.05$), 추세선의 m 값은 0.373 이었다. 분할율과 VSL의 R^2 값은 0.159로 유의적인 상관관계가 있었으며($p < 0.05$), m 값은 0.591 이었다. 한우정액의 VAP와 분할율과의 관계는 R^2 이 0.156으로 나타나 유의적인 상관관계를 보였다($p < 0.05$). 분할율과 ALH와는 R^2 의 값이 0.175로 유의적인 높은 상관관계를 보였으며($p < 0.05$), m 값은 8.068 이었다. 분할율과 그 정자의 BCF와의 상관관계는 강한 상관관계를 나타내었다($p < 0.05$). 상관지수인 R^2 도 높은 0.218치를 나타냈다. 이때 m 값은 2.606으로 계산되었다. 분할율과 MAD는 유의적인 상관관계를 보였다($R^2 = 0.227$, $m = 1.730$, $p < 0.05$).

그러나 분할율과 CON, LIN, STR, WOB, DNC, DNM 및 HYP는 유의적인 상관관계를 발견할 수 없었다. 즉, 분할율과 LIN과는 상관지수가 0.042 였으며, 이때 m 값은 0.507 이었다. 분할율과 HYP와는 R^2 값은 0.139로 유의성은 인정되지 않았으며, m 값은 1.446으로 나타났으며, STR과는 R^2 값이 0.097이였으며, m 값은 0.968로 유의적인 관련성은 없었다. 분할율과 WOB의 관계도 유의성을 발견할 수 없었다($R^2 = 0.012$, $m = 0.385$). 분할율과 DNC와의 상관관계는 인정되지 않아, R^2 은 0.012 였고, m 값은 0.385 였다. 또한 DNM과는 R^2 값이 0.056 이었으며, m 값은 2.198로 무관하였다.

이상의 결과를 종합하면 한우 동결융해정액의 운동특성중 MOT, VCL, VSL, VAP, ALH, BCF 및 MAD는 체외수정시 분할율과 유의적인 상관관계를 보이므로 동결정액의 제조 및 정액의 질적 평가시 수태율 예측의 주요 기준으로 제시할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Agarwal A, Ozturk E, Loughlin KR. Comparison of semen analysis between the two Hamilton Thorn semen analysers. *Andrologia*, 24:327-329, 1992.
2. Aitken RJ, Best FSM, Richardson DW, et al. An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility : conventional criteria movement characteristics and fertilizing capacity. *Fertil Steril*, 38:212-221, 1982.
3. Aitken RJ, Best FSM, Warner P, et al. A prospective study of the relationship between semen quality and fertility in cases of unexplained infertility. *J Androl*, 5: 297-303,1984.
4. Aitken RJ. Diagnostic value of the zona-free hamster oocyte penetration test and sperm movement characteristics in oligozoospermia. *Int J Androl*, 8:348-356, 1985.
5. Aitken RJ, Warner P, Reid C. Factors influencing the success of sperm-cervical mucus interaction in patients exhibiting unexplained infertility. *J Androl*, 7:3-10, 1986.
6. Armant DR, Ellis MA. Improved accuracy of sperm motility assessment using a modified Micro-Cell sperm counting chamber. *Fertil Steril*, 63:1128-1130, 1995.
7. Auger J, Leonce S, Jouannet P, et al. Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41: 1247-1251, 1993.
8. Bartoov B, Eltes F, Pansky M, et al. Estimating fertility potential via semen analysis data. *Human Reproduction*, 8:65-70, 1993.
9. Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Relationship between 1morphologically abnormal spermatozoa and pregnancies obtained during twenty years of follow-up period. *Int J Androl*, 5:379-386, 1982.
10. Brandeis VT. Importance of total motile oval count in interpreting the hanster ovum sperm penetration assay. *J Androl*, 14:53-59, 1993.
11. Budworth PR, Amann RP, Chapman PL. Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl*, 9: 41,1988.
12. Centola GM, Rauberts RF, Mattox JH. Cryopreservation of human semen : comparison of cryopreservatives, sources of variability and prediction of post-

- thaw survival. *J Androl*, 13:283-288,1992.
13. Centola GM. Comparison of manual microscopic and computer-assisted methods for analysis of sperm count and motility. *Archives of Andrology*, 36:1-7, 1996.
 14. Chan SYW, Wang C, Song BL, *et al*. Computer-assisted image analysis of sperm concentration in human semen before and after swim-up separation : comparison with assessment by haemocytometer. *Int J Androl*, 12:339,1989a.
 15. Chan SY, Wang C, Chan ST, *et al*. Predictive value of sperm morphology and movement characteristics in the outcome of *in vitro* fertilization of human oocytes. *J In Vitro Fertil Embryo Transf*, 6:142-148, 1989b.
 16. Davis RO, Katz DF. Standardization and comparability of CASA instruments. *J Androl*, 13:81-86, 1992.
 17. Davis RO, Niswander PW, Katz DF. New measures of sperm motion. I. Adaptive smoothing and harmonic analysis. *J Androl*, 13:139-152, 1992.
 18. Davis RO, Rothmann SA, Overstreet JW. Accuracy and precision of computer, aided sperm analysis in multicenteric studies. *Fertil Steril*, 57:648-653, 1992.
 19. Davis RO, Katz DF. Operational standards for CASA instrument. *J Androl*, 14:385-394, 1993.
 20. Davis RO, Drobnis EZ, Overstreet JW. Application of multivariate cluster, discriminate function, and stepwise regression analyses to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival. *Fertil Steril*, 63:1051-1057, 1995.
 21. Dostal LA, Faber CK, Zandee J. Sperm motion parameters in vas deferens and cauda epididymal rat sperm. *Reprod Toxicol*. 10:231-235, 1996.
 22. Dunphy BC, Kay R, Barratt CLR, *et al*. Quality control during the conventional analysis of semen as essential exercise. *J Androl*, 10:378, 1989.
 23. Eggert-Kruse W, Schwarz H, Rohr G, *et al*. Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under *in vivo* conditions of conception. *Human Reproduction*, 11:139-146, 1996.
 24. Eriksen GV, Malmstrom A, Ulbjerg N, *et al*. A follicular fluid chondroitin sulfate proteoglycan improves the retention of motility and velocity of human spermatozoa. *Fertil Steril*, 62:618-623, 1994.
 25. Farrell PB, Trouern-Trend VL, Foote RH, *et al*. Repeatability of measurements on human, rabbit and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. *Fertil Steril*, 64:208-210, 1995.
 26. Farrell PB, Foote RH, McArdle MM, *et al*. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis(CASA). *J Androl*, 17:293-300, 1996.
 27. Fernandes PA, McCoshen JA, Cheang M, *et al*. Quantitative analysis of the effect of freezing on donor sperm motion kinetics. *Fertil Steril*, 54:322-327, 1990.
 28. Fukui Y. Effect of follicle cells on the acrosome reaction fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 26: 40-46, 1990.
 29. Garner DL. Ancillary tests of bull semen quality. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 13:313-330, 1997.
 30. Ginsberg KA, Sacco AG, Moghissi KS, *et al*. Variation of movement characteristics with washing and capacitation of spermatozoa. I Univariate statistical analysis and detection of sperm hyperactivation. *Fertil Steril*, 51:869, 1989.
 31. Holt WV, More HDM, Hiller SG. Computer assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: correlation of result with IVF assays. *Fertil Steril*, 44:112, 1985.
 32. Holt W, Watson P, Curry M, *et al*. Reproducibility of computer-aided semen analysis : comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil Steril*, 62:1277-82, 1994.
 33. Hong CY, Lee MF, Ou MC, *et al*. Tail beat frequency of human sperm : Evaluated with sperm head fixation method and computer-assisted semen analysis. *Archives of Andrology*, 30:171-176, 1993.
 34. Hurowitz EH, Leung A, Wang C. Evaluation of the CellTrak computer, assisted sperm analysis system in comparison to the Cellsoft system to measure human sperm hyperactivation. *Fertil Steril*, 64:427-432,1995.

35. Ijaz A, Hunter AG. Induction of bovine sperm capacitation by TEST-yolk semen extender. *J Dairy Sci*, 72:2683, 1989.
36. Ijaz A, Hunter AG. Evaluation of a TEST-yolk sperm capacitation system for use in bovine *in vitro* fertilization. *J Dairy Sci*, 75:393, 1992.
37. Iqbal N, Hunter AG. Effect of various capacitation systems on bovine sperm motion characteristics, acrosome integrity, and induction of hyperactivation. *J Dairy Sci*, 78:91-102, 1995.
38. Irvine DS, Aiken RJ. Predictive value of *in-vitro* sperm function tests in the context of an AID service. *Human Reproduction*, 8:539-545, 1986.
39. Irvine DS, Vacleod IC, Templeton AA, *et al*. A prospective clinical study of the relationship between the computer assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy *in vitro*. *Human Reproduction*, 9:2324-2334, 1994.
40. Jequier AM, Ukome EB. Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. *Br J Urol*, 55: 434, 1983.
41. Jeulin C, Fexeux D, Serres C, *et al*. Sperm factors related to failure of human *in vitro* fertilization. *J Reprod Fertil*, 76:735-744, 1986.
42. Johnson JE, Boone WR, Blackhurst DW. Manual versus computer, automated semen analyses. Part I. Comparison of counting chambers. *Fertil Steril*, 65:150-155, 1996a.
43. Johnson JE, Boone WR, Blackhurst DW. Manual versus computer, automated semen analyses. Part II. Determination of the working range of a computer, automated semen analyzer. *Fertil Steril*, 65:156-159, 1996b.
44. Johnson JE, Boone WR, Blackhurst DW. Manual versus computer, automated semen analyses. Part III. Comparison of old versus new design MicroCell Chambers. *Fertil Steril*, 65:446-447, 1996c.
45. Kolibianakis EM, Tarlatzis BC, Bontis J, *et al*. Evaluation of Hamilton, Thorn automated semen analysis system. *Arch Androl*, 28:2134-22, 1992.
46. Kramer RY, Garner DL, Bruns ES, *et al*. Comparison of motility and flow cytometric assessments of seminal quality in fresh, 24, hour extended and cryopreserved human spermatozoa. *J Androl*, 14:374-84, 1993.
47. Kruger TF, Menkveld R, Stander FHS, *et al*. Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*, 46:1118-1123, 1986.
48. Kruger TF, Swanson RJ, Hamilton M, *et al*. Abnormal sperm morphology and other semen parameters related to the outcome of the hamster oocyte human sperm penetration assay. *CInt J Androl*, 11:107-113, 1988.
49. Liu DY, Clark GN, Baker hWG. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates *in vitro*. *J Androl*, 12:231-239, 1991.
50. Macleod IC, Irvine DS. The predictive value of computer-assisted semen analysis in the context of a donor insemination programme. *Human Reproduction*, 10:580-586, 1995.
51. Marshburn PB, McIntire D, Carr BR, *et al*. Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 58:179-86, 1992.
52. Moor RM, Trounson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil*, 49(1):101-9, 1977.
53. Owen DH, Katz DF. Sampling factors influencing accuracy of sperm kinematic analysis. *J Androl*, 14:210-221, 1993.
54. Paston MJ, Sarkar S, Oates RP, *et al*. Computer-aided semen analysis variables as predictors of male fertility potential. *Archives of Andrology*, 33:93-99, 1994.
55. Rause W. Computer assisted semen analysis systems : comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction. *Hum Reprod Suppl*, 10:60-66, 1995.
56. Stachecki JJ, Ginsburg KA, Leach GR, *et al*. Computer-assisted semen analysis(CASA) of epididymal sperm from the domestic cat. *J Androl*, 14:60-65, 1993.

57. Sttlo VL, Suarez JD, Poss PM, *et al.* Optimization of the Hamilton, Thorn computerized sperm motility analysis system for use with rat spermatozoa in toxicological studies. *Fundam Appl Toxicol*, 21: 298-307, 1993.
58. Wang C, Steven Y, Chan W, *et al.* Diagnostic value of sperm function tests and routine semen analysis in fertile and infertile men. *J Androl*, 9:384-389, 1988.
59. Wang C, leung A, Tsoi WL, *et al.* Computer-assisted assessment of human sperm morphology : usefulness in prediction fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril*, 55:989-993, 1991.
60. Wilhelm KM, Graham JK, Squire EL. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility, and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior to and after cryopreservation. *Cryobiology*, 33(3):320-9, 1996.
61. Yung CH, Nieschlag E. Performance and comparison of CASA systems equipped with different phase-contrast optics. *J Androl*, 14:222-228, 1993.
62. Zinaman MJ, Uhler ML, Vertuno E, *et al.* Evaluation of computer, assisted semen analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration. *J Androl*, 17:288-292, 1996.
63. 박광석, 이원진, 백재승. Hough 변환을 이용한 정자의 형태학적 특성 분석방법에 관한 연구. 대한의용생체공학회지, 17:24-31, 1996.
64. 백재승, 이진행, 김청미. 동결방법, 해빙온도 및 해빙후 희석/세척이 인간정자의 운동성과 형태변화에 미치는 영향. 대한비뇨기과학회지, 36:1188-1197, 1995.
65. 백재승, 전성수, 김수용 등. 정자의 형태학적 특성 분석에 관한 연구. 대한불임학회지, 24:153-165, 1997.
66. 신태영, 조충호, 황광남. 과립막 세포와의 co-culture 가 소 난포란의 체외수정과 분할에 미치는 영향. 한국수정관아식연구회지, 6:25-32, 1991.
67. 심훈섭, 이원진, 박광석 등. 영상처리를 이용한 정자의 운동특성 분석. 대한전자공학회논문지, 31:108-114, 1994.
68. 이성수, 장명상, 안창석 등. 한우 종모우의 정액 성상에 관한 연구. 한국동물유전육종학회지, 1.1:39-48, 1997.
69. 이원진, 전성수, 박광석 등. 개인용 컴퓨터(PC)를 이용한 정액분석기의 개발. 대한불임학회지, 22:62-72, 1995.
70. 주명수, 백재승, 박종완 등. 반응성 산소라디칼이 인체 정자의 과민운동반응에 미치는 영향. 대한비뇨기학회지, 37(7)738-745, 1996.
71. 황우석, 노상호, 이병천. 핵이식을 이용한 복제송아지 생산에 관한 연구 II. 효율적인 복제수정란 생산을 위한 난자의 활성화, 공여핵의 세포주기조절 및 적정 배양조건. 대한수의학회지, 37:639-645, 1997.