大韓不妊學會誌: 第30 卷 第1號 2003
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 30, No. 1, 2003, 3

체외수정시술에서 정자의 수정능력이 배아의 발생능 및 임신율에 미치는 영향

(주)젠딕스[1], 서울대학교 의학연구원 인구의학연구소[2], 인천 서울여성병원[3], 서울대학교 의과대학 산부인과학교실[4]

방명걸[1,2] · 정병준[3] · 문신용[2,4]

Influence of Sperm Fertilizing Capacity on Embryonic Development and Pregnancy in *In Vitro* Fertilization

Myung-Geol Pang[1,2], Byeong Jun Jung[3], Shin Yong Moon[2,4]

[1]GenDix, Inc., [2]Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center, Seoul National University, [3]Department of Obstetrics and Gynecology, Infertility Center, Seoul Women's Hospital, Incheon, [4]Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

Objectives: To assess the fertilizing capacity using sperm penetration assay (SPA) to predict the outcome of the in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) outcome.

Materials and Methods: Semen samples were provided by 129 patients undergoing IVF. We attempted to correlate the extent of sperm penetration under enhanced SPA protocol with the results of fertilization, cleavage, preimplantation embryo development, and pregnancy.

Results: Univariate analysis demonstrated a statistically significant correlation between fertilizing capacity and motility, kinetics, fertilization, cleavage and embryo development, and pregnancy rate. By logistic regression analysis, fertilizing capacity was found to be the only variable that was statistically significant with respect to pregnancy rate. Fertilizing capacity, cleavage rate and pregnant rate were significantly higher in pregnant group. However, the fertilization rates was comparable with both group.

Conclusions: Lower fertilizing capacity could denote a poorer prognosis for establishing a pregnancy, even after satisfactory fertilization rate is achieved.

Key Words: Fertilizing capacity, SPA, IVF-ET

체외수정시술에서 정액검사 소견이 정상인 경우에는 대개 성공적인 수정률을 보인다. 그러나 정액검사가 정상임에도 불구하고 수정률이 감소하거나 수정이 실패하는 경우에는 정자의 수정능이 감소된 상태이거나, 난자의 질에 문제가 있을 경우가 대부분이다. 만약 난자의 질을 저하시킨 특별한 요인이 없다면 정자의 수정능력에 문제가 있다고 판단된다. 일반 정액검사에서 정상적인 정자라고 해서 반드시 수정능력을 갖지는 않는다. 즉 일반 정액검사는 정자의 수정능력을 정확히 반영하지는 못한다.[1]

Parinaud 등[2]은 정자의 수나 형태학적인 이상 유무가 수정률 및 초기 배아발달에 영향을 준다고 하였

주관책임자: 문신용, 우) 110-799 서울특별시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교 의과대학 산부인과학교실
Tel: (02) 740-2384, Fax: (02) 762-7251, e-mail: shmoon@plaza.snu.ac.kr

으며, Janny 와 Menezo[3]는 단지 핍정자증 (<3×10^6/ml)이 있는 경우에 체외수정을 시행하였을 때 배반포로의 발달률이 현저히 감소함으로 체외수정시술에서 정자의 수정능에 대하여 새로운 접근법이 고안되어야 한다고 제안하였다. 또한 Shoukir 등[4]도 sperm parameter가 불량한 경우 배아발달에도 나쁜 영향을 끼친다고 보고하였다. 그러나 대부분의 연구는 일상적인 정액검사상에 이상이 있는 경우에 한정되었다.

정자의 수정능력은 체외수정시술에서 수정률을 결정하는 중요 요소이다. 그러나 정상적인 정액검사 소견을 보이지만 수정능력이 감소된 경우에 배아발달 및 임신율에 어떠한 영향을 끼치는가에 대하여는 논의가 없는 실정이다.

정자의 수정능력을 평가하는 생물학적인 방법 중 투명대를 제거한 햄스터 난자를 이용하여 정자와 난자간의 융합 현상을 보는 sperm penetration assay (이하 SPA라 약함)가 1976년 Yanagimachi 등[5]에 의하여 처음 개발되었다. 그러나 SPA가 갖는 임상적인 중요성에 대하여 연구진은 SPA 각각의 과정을 최적화하여 정상과 비정상군 사이에 성적이 크게 벌어지도록 하였으며 검사상 위음성 및 위양성의 결과를 최소화시켰다. 이 방법을 이용하여 정상 가임역을 설정하였으며 이를 바탕으로 SPA의 재현성 있는 임상적 타당성을 보고한 바 있다.[6]

이에 본 저자들은 정자의 난자 침투 정도를 침투된 총 정자의 수를 수정시킨 총 햄스터 난자의 수로 나눈 값을 수정능력 (fertilizing capacity)으로 산출하여 과연 체외수정시술에서 SPA시 반영되는 정자의 수정능이 체외수정 후 수정, 배아발달 및 임신과 어떤 관계가 있는가를 알아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

난관 문제로 체외수정시술을 시행한 환자 중 SPA 검사를 시행한 129명의 환자를 대상으로 하였다.

2. 연구 방법

1) 과배란유도 및 체외수정

대상 환자에서 GnRH-agonist (이하 GnRHa로 약함; Decapeptyl®, D-trp-6-LH, Ferring, Malmoe, Sweden)을 사용한 황체기 장기투여법을 실시하여 과배란유도를 시행하였다.

(1) 정액검사

채취된 정액을 실온에서 30분간 방치하여 액화시키고 액화된 정액 중 10 ?l를 취하여 37°C로 미리 예열된 Makler counting chamber를 이용하여 정자농도, 운동성 및 생존지수 (motility index; 이하 MI로 약함) 등의 일반적인 정액검사를 시행하였다. 정자의 생존지수는 이용빈[7]의 정자생존지수 조견표에서 정자의 운동역학 (kinetics)과 운동성 (motility)을 이용하여 분석하였다. Kinetics 1.2 및 운동성 1.2의 의미는 액화 직후 정액검사는 1이고, TYB에서 42시간 있다가 swim-up한 샘플 즉 햄스터 난자와 수정시키기 직전의 결과를 2라고 명하였다.

2) Sperm Penetration Assay

SPA의 시행 방법은 신창재 등[8]과 방명걸 등[9]의 방법을 이용하여 시행하였다.

(1) 정자 처리

액화된 정액을 N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid (TES) 211 mM, hydroxymethyl amino methane (Tris) 96 mM, dextrose 11 mM, 1% penicillin-streptomycin 용액에 20% 신선 계란 노른자를 첨가하고 pH 7.4, 삼투압 290~320 mOsm/kg으로 조정한 TEST-yolk buffer (이하 TYB로 약함)와 용량비 1 : 1로 서서히 혼합하였다. 이 혼합액을 냉장고에서 4°C까지 서서히 냉각시켜 42시간 동안 저온 배양하여 정자의 수정능력이 획득되게 하였다. 그 후 4°C의 정액과 TYB 혼합액에 37°C의 0.3% human serum albumin (이하 HSA로 약함)이 함유된 Ham's F-10 3 ml을 첨가하여 600 G로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 남은 정자괴에 Ham's F-10 (0.3% HSA 함유) 1 ml를 첨가하여 300 G로 10분간 2차 원심분리하였다. 이후 상층액을 제거하고 남은 정자괴에 Ham's F-10 (1.0% HSA 함유)을 추가하여 2시간 동안 37°C 5% CO_2 배양기 내에서 부유시켰다.

(2) 투명대 제거 햄스터 난자의 준비

생후 12~16주된 암컷 햄스터를 대상으로 과배란유도를 시행하여 투명대 제거 햄스터 난자를 준비하였다. 햄스터를 매 12시간마다 명암에 교대로 노출시키며 환경에 적응시킨 후 발정 주기 제 1일째 PMSG (Sigma G-4877, USA) 35 IU를 복강 내로 주사

Table 1. Comparison with pregnant and non-pregnant group

	Non-pregnant (n=93)	Pregnant (n=36)
Age (female)	33.1±3.3	33.5±3.5
Age (male)	39.2±5.2	38.9±5.5
No. of oocytes	602	233
No. of fertilized oocytes	386 (64.1%)	158 (67.8%)
PN	51 (13.21%)	0
2 cell	46 (11.92%)	0
4 cell	157 (40.67%)	103 (65.19%)
8 cell	132 (34.2%)	55 (34.81%)
Fertilizing capacity	6.9±4.6	11.8±8.0*
Fertilization rate (%)	68.8±31.9	71.5±22.4
Cleavage rate (%)	61.2±33.1	71.5±22.6*
Well development rate (%)	50.8±32.8	71.5±22.4*

* $p<0.05$, Values: Mean±SD

하고, 발정 주기 제 3일째 오후에, hCG (Sigma C-1063, USA) 35 IU를 복강 내로 주사하여 과배란을 유도하였다. hCG 투여 15~16시간 후 경추탈구법 (cervical dislocation)으로 햄스터를 희생시키고, 복강을 열어 양측 난관을 분리하여 PBS (0.3% HSA 함유)가 담긴 배양접시에 옮긴 후 실체현미경하에서 난관팽대부를 절단함으로써 난구체 (cumulus complex)가 흘러나오게 하였다. 난구체는 0.1% hyaluronidase를 포함한 PBS (0.3% HSA 함유)에서 제거하였으며, 투명대는 0.1% trypsin을 포함한 PBS (0.3% HSA 함유)에서 제거하였다.

(3) 수정

2시간 부유시킨 정자를 배양접시에 운동성 정자가 1×10^6/ml이 되도록 떨어뜨려 37°C, 5% CO_2 배양기 내에서 환자당 10개 이상의 투명대 제거 햄스터 난자와 0.3% HSA를 포함한 Ham's F-10에서 3.5시간 배양하여 수정시켰다.

(4) 고정, 염색 및 판독

수정 후 난자를 회수하여 신선한 배양액으로 3회 세척하여 난자에 과다하게 부착된 정자들을 제거한 후, 슬라이드 위에 소량 (5~10 ?l)의 배양액과 함께 난자를 옮겼다. Coverslip 주위 네 곳에 소량의 vaseline-paraffin 혼합액을 떨어뜨려 슬라이드에 덮은 후 실체현미경으로 관찰하면서 난자가 파손되지 않도록 조절하며 coverslip을 최대한 슬라이드 위에 눌렀다. 슬라이드를 고정액 (methanol : glacial acetic acid = 3 : 1)에 넣어 24시간 이상 고정시킨 후 0.25% acetic lacmoid로 염색하여 위상차현미경 ×1,000 배율하에서 정자의 난자내 침투 여부를 관찰하였다.

이때 정자의 두부가 부풀었거나 남성전핵이 보이며 해당 정자의 미부가 난자 세포질 내에서 식별될 때 정자가 난자내로 침투된 것으로 간주하였다. 모든 예에서 정자의 난자 침투 정도는 침투지수 (penetration index; 침투된 총 정자 수 / 수정시킨 총 난자 수; 이하 PI로 약함)로 나타냈으며, 이것을 수정능력으로 표현하였다.

결 과

비임신군과 임신군의 남녀 연령과 WHO 기준[10]에 의한 정액검사 소견에는 차이가 없었다. SPA에서 얻어진 수정능력은 임신군에서 비임신군보다 유의하게 높았다. 배아발달률의 경우도 임신군에서 비임신군보다 유의하게 높게 나타났으나 흥미롭게도 수정률은 두 군간에 차이가 없었다 (Table 1).

단순상관분석 (Bivariate correlation analysis)을 시행한 결과 수정능력 (fertilizing capacity)의 경우 Kinetics 1과 운동성 1과 2의 이변량 상관계수 값은 각

각 0.30, 0.219 및 0.205로 유의 확률은 각각 0.01 및 0.001 이하였다. 또한 수정률 및 임신 여부에 따른 이변량 상관계수 값은 각각 0.365, 0.356으로 유의 수준 0.001 이하였다.

그러나 임신에 유의하게 영향을 미치는 요인을 찾기 위하여 다중회귀분석 (Multiple regression analysis)을 시행한 결과 수정능력만이 임신에 영향을 미치는 요인인자로 나타났다 (R=0.213, p<0.001).

고 찰

체외수정시술은 불임영역에 있어서 중요한 치료방법으로 발전해 왔다. 현재 체외수정시술에 있어서 수정률은 평균 50~80%를 나타내고 있지만 10~15% 정도의 환자에서는 전혀 수정이 되지 않는 결과가 보고되고 있다.[11]

아직까지 수정실패에 대한 정확한 원인은 밝혀지지 않았지만 여성측 요인의 불임 부부와 비교하여 남성불임 부부에서 높은 빈도의 수정실패가 관찰됨에 따라 완전한 수정실패의 원인은 난자의 결함이나 미성숙 상태보다는 정자의 수정능 결함이 주요 원인으로 보고되고 있다 (Liu, 1992).[12] 따라서 불임영역에 있어서 남성측 요인 (male factor)이 강조되고 있다. Ron-EL 등[13]과 Painaud 등[2]은 체외수정시술에서 배아의 질은 정자의 질에 의하여 영향을 받는다고 보고하여 초기 배아발달에서 정자의 중요성을 강조한 바 있다.

수정능력을 검사하기 위한 SPA 검사는 정자와 난자의 수정 단계 중 정자의 난자내 침투 과정에 해당하는 부분 즉, 수정능 획득 (capacitation), 첨체반응 (acrosome reaction), 정자와 난자 세포질의 침투, 세포질 내에 있는 정자 두부의 탈응축 (decondensation) 및 전핵 형성 등의 수정의 초기 과정을 체외에서 재연함으로써 실제 체내에서 일어나는 정자의 수정능력을 예측하는 검사로 현재까지 개발된 정자의 수정능력 평가 방법 중 가장 신빙성 있는 검사법으로 알려져 있으며 그 중 TYB와 온도 충격을 병합한 방법의 임상적 유용성 가장 크다.

본 연구는 정자의 수정능력을 SPA로 측정하였는데, 이는 체외수정시술에서 정자의 수정능력을 예측할 수 있는 지표로서 다른 검사들보다 더욱 가치가 있는 결과를 얻었기에 때문이다. 본 연구자들이 SPA 검사를 시행하여 저자의 수정능력을 예측함에 있어서 정자침투지수 (penetration index)가 갖는 진단적 유용성은 ROC curve에서 cut-off 값을 3.0으로 정하였을 때 민감도, 특이도, 양성예측도 및 음성예측도가 가장 높게 나왔다. 정자침투지수가 3.0 이상인 경우 98.2%에서 정상수정률이 30% 이상을 나타냈다.[6]

그러나 SPA는 시간이 많이 걸리고, 기법이 까다로우며, 비용면에서 임상에서 쓰기에는 제한이 있다. 그렇기 때문에 많은 검사실에서 정자의 수정능을 평가할 때 이보다 간편한 방법으로 SPA를 대체하기 위한 노력이 있어 왔다. Zahalsky 등[14]은 SPA를 대체하기 위하여 정자의 형태학적인 검사 (Kruger morphology)와 상관을 보았으나, 정자의 형태학적인 검사는 SPA를 대체할 유용한 검사는 아니라고 하였으며, 오히려 정자의 수가 형태학적인 검사보다 인공수정의 결과를 예측하는 좋은 지표라고 하였다.

배아분활률과 임신율 사이의 차이는 난자의 질에 기인한 것 같지는 않다. 왜냐하면 두 군간에 나이 및 체외수정의 적응증이 비슷하기 때문이다. SPA는 배아분활률 및 임신율에 영향을 미치지만 수정률에는 영향을 미치지 않았다. 이것은 정자의 수정능력이 감소한 경우에 수정률이 감소를 하지 않았다 하더라도 성공적인 임신에 도달하는 율이 낮을 수 있다는 것을 뜻한다. 즉 수정능력이 낮은 경우에는 배아발달률 및 임신율에 감소를 예측할 수 있을 것이다.

최근 ICSI의 급속한 발전으로 인하여 정액검사 소견상 일반적인 체외수정시술로 치료가 불가능한 극심한 남성불임 환자 뿐 아니라 정액성상은 정상이며 정자의 기능 이상을 가진 환자에 있어서도 높은 수정률과 임신율이 보고되고 있다.[15,16] Shibahara 등[17]은 SPA를 시행하여 수정능력에 따라 불임, 정상 이하 및 정상으로 구분하여 체외수정 및 ICSI에서 수정률 및 임신율을 비교하였다. 체외수정에서는 불임 및 정상 이하군에서는 30% 미만의 수정률을 보였는데 배아이식 후 임신은 성립되지 않았다. 반면 정상군에서는 50% 이상의 수정률 및 26%의 임신율을 보고하였다. ICSI를 시행한 경우 세 군의 수정률 및 임신율에는 차이가 없었다. 이는 체외수정시 SPA

결과 수정능력이 저하된 경우에는 낮은 수정률이 일반적이며 임신의 성립도 어렵다는 결론을 얻을 수 있으나 ICSI에서는 수정능력 저하와 무관하게 비교적 만족스러운 수정률 및 임신율을 얻을 수 있다는 것이다. 즉 체외수정시술시 정자의 수정능력은 수정 및 임신에 지대한 영향을 주고 있으나 ICSI는 수정 및 임신에 정자의 수정능력이 영향을 끼치지 않았다. 따라서 정자의 정확한 수정능 예측은 남성 불임증 환자에서 보조생식술 시행시 치료 방법 설정에 있어서 중요한 정보를 제공할 것이다.

참 고 문 헌

1. Simth KD, Rodriguez-Rigau LJ, Steinberger E. Relation between indices of semen analysis and pregnancy rate in infertile couples. Fertil Steril 1997; 28: 1314-9.
2. Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G, Labal B, Richoilly G. Influence of sperm parameters on embryo quality. Fertil Steril 1993; 60: 888-92.
3. Janny L, Menezo YJ. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. Mol Reprod Dev 1994; 38: 36-42.
4. Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A, Sakkas D. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? Hum Reprod 1998; 13: 1632-7.
5. Yanagimachi R, Yanagimach H, Rogers BJ. The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol Reprod 1976; 15: 471-6.
6. 김석현, 김명희, 지병철, 정병준, 김희선, 류범용 등. 인간 정자의 수정 능력 평가에 있어서 SPA 검사의 유용성에 관한 연구. 대한산부회지 1998; 41: 2401-9.
7. 이용빈. 소의 인공수정. 가축인공수정요론. 선진문화사, 서울, 1984: pp.106.
8. 신창재, 장윤석. 인간정자의 수정능 부여 및 햄스터 난자 침투에 영향을 주는 인자들에 관한 연구. 대한산부회지 1990; 33: 954-75.
9. 방명걸, 오선경, 신창재, 문신용, 이진용, 장윤석. Sperm Penetration Assay의 임상적 타당성에 관한 연구. 대한불임회지 1993; 20: 1-7.
10. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-Cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.
11. Cohen JC, Edwards R, Fehilly S, Fishel S, Hewitt J, Purdy J, et al. In vitro fertilization: a treatment for male infertility. Fertil Steril 1985; 43: 422-32.
12. Liu DY, Baker HWG. Test of human sperm function and fertilization in vitro. Fertil Steril 1992; 58: 465-83.
13. Ron-El R, Nachum H, Herman A, Golan A, Caspi E, Soffer Y. Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen qualtiy. Fertil Steril 1991; 355: 38-44.
14. Zahalsky MP, Zoltan E, Medley N, Nagler HM. Morphology and the sperm penetraion assay. Fertil Steril 2003; 79: 39-41.
15. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde MP, Van Assche E, Devroey P. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination: Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. Hum Reprod 1993; 8: 1055-60.
16. Palermo G, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. Fertil Steril 1995; 63: 1231-40.
17. Shibahara H, Mitsuo M, Inoue M, Hasegawa A, Shigeta M, Koyama K. Relationship between human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection and the zona-free hamster egg penetration test. Hum Reprod 1998; 13: 1928-32.