

## 한국인 남성을 대상으로 한 햄스터 난자 침투 분석법의 정상 가임역 설정

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

김석현 · 방명걸 · 신창재 · 김정구 · 문신용 · 이진용 · 장윤석

### Establishment of Normal Fertile Range of Sperm Zona-free Hamster Ova Penetration Assay in Korean Male

Seok Hyun Kim, M.D., Myung Geol Pang, M.S., Chang Jae Shin, M.D., Jung Gu Kim, M.D.,  
Shin Yong Moon, M.D., Jin Yong Lee, M.D. and Yoon Seok Chang, M.D.

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea*

#### = Abstract =

To establish the normal fertile range in the results of the sperm zona-free hamster ova penetration assay (SPA) in Korean male, SPA using the low temperature (4°C) capacitation in TEST-yolk buffer (TYB) was performed in 67 fertile and 26 infertile men. Sperm parameters in routine semen analysis were also checked and compared with the results of SPA.

Sperm concentration, motility and motility index (MI) were significantly higher in fertile group compared with infertile group:  $96.0 \pm 46.6$  vs  $43.6 \pm 31.9 \times 10^6$ /ml,  $65.5 \pm 14.8\%$  vs  $45.8 \pm 23.6\%$  and  $46.31 \pm 13.29$  vs  $27.40 \pm 17.98$ , respectively.

In fertile group, the hamster ova penetration rate (PR) was  $98.5 \pm 5.0\%$  (80% - 100%), and the penetration index (mean penetrations per ovum, PI) was  $9.59 \pm 6.35$  (3.1 - 29.0). All the fertile men showed  $PI > 3.0$ . In infertile group, PR was  $24.6 \pm 24.8\%$  (0% - 70%), and PI was  $0.40 \pm 0.42$  (0 - 1.3). Both PR and PI were significantly lower in infertile group. There was a significant correlation between PI and sperm motility or MI, respectively, in fertile group whereas there was no correlation in infertile group.

These data suggest that SPA using the low temperature capacitation in TYB can be a valuable diagnostic tool for the assessment of male fertility in vitro and provide an important supplement to the traditional tests of sperm quality.

#### 서 론

불임증의 진단과 치료에 있어서 인간 정자의 수정능력을 충실히 반영하여 줄 수 있는 임상 검사법의 개발은 특히 불임 원인 인자의 규명 및 향후 처치의 방향 설정에 절대적으로 필요하지만 아직은 만족스럽지 못한 수준에 있다. 임상적으로 시행하는 정액검사(semen analysis)는 기본적인 검사이지만 해당 남성 정자의 생식능

력을 정확히 반영한다고 보기는 어렵다(Cockett et al., 1975; Smity et al., 1977).

이러한 문제점을 해결하고자 인간 정자의 수정 및 생식능력을 체외(in vitro)에서 평가할 수 있는 검사법이 Yanagimachi 등(1976)에 의하여 처음 개발되었다. 1976년 Yanagimachi 등은 투명대를 제거한 햄스터 난자가 인간 정자에 의해 침투될 수 있음을 처음으로 입증하여 human sperm zona-free hamster ova penetration assay(SPA)의 기초를 마련하였고, 1979년 Rogers 등은 처음으로 SPA를 이용한 남성 정액의 가임역(fertile range) 및 불임역(Infertile

본 연구는 1990년도 서울대학교병원 임상연구비의 보조로 이루어진 것임.

range)에 관한 보고를 하였으며, 그후로 여러 연구자들이 남성의 수정능력에 대한 검사법으로서의 SPA의 가능성을 시사하였다(Aitken et al., 1984; Blasco, 1984; Prasad, 1984; Yanagimachi, 1984; Rogers et al., 1985).

그러나 거듭된 연구 결과 정상 생식능력이 입증된 남성에서도 정자의 햄스터 난자침투 정도의 범위가 매우 넓었고, 검사 자체의 민감도(sensitivity)가 낮았으며, 체내(in vivo)에서 이루어 지는 수정 현상을 체외에서 시행하는 SPA가 정확히 반영하지 못한다는 점, 보고자마다 실험 기법이 다르다는 점 등으로 인하여 SPA는 처음의 기대만큼 유용한 임상 검사법으로 각광받지 못하였던 실정이다. 특히 SPA가 인간의 체외 수정에 남성의 생식능력을 적절히 반영하는지에 대해서는 많은 논란이 있어 왔지만 1986년 Hirsch 등은 체외수정시술(IVF-ET)을 시행받은 불임부부에서 기존의 SPA 방법과 달리 TEST-yolk buffer(TYB)를 이용하여 4°C에서 전배양(preincubation)시킨 정자로 시행한 SPA 성적이 해당 부부의 체외수정을 과 높은 상관관계가 있었음을 보고하였다.

본 저자들은 SPA의 임상적 유용성을 타진하기 위한 첫 단계로서 이미 발표한 바와 같이 민감도, 신뢰도(reliability) 및 재현도(reproducibility)를 증진시키고자 TYB를 이용한 SPA를 각 과정별로 최적화(optimization)시킨 바 있으며(신과 장, 1990), 본 연구에서는 다음 단계로서 가임 남성 및 불임 남성들을 대상으로 상기 SPA 방법을 적용하여 정상 가임역(normal fertile range)을 설정함으로써 SPA의 임상적 이용에 도움이 되고자 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구대상

본 연구에서는 최근 2년 이내에 여성에게 임신시킨 경험이 있는, 생식능력이 입증된 남성 67명을 가임(fertile) 남성군으로, 체외수정시술(IVF-ET)시 과배란유도 후 채취된 난자들을 체외(in vitro)에서 수정시켰을 때 모든 난자에서 수정이 일어나지 않은 불임부부의 남성 10명, 배우자간 인공수정(artificial insemination of husband semen, AIH)시 3주기 이상 임신에 실패하였던 남성 16명 등 26명을 불임(infertile) 남성군으로 정의하여 연구 대상으로 하였다.

대상 남성에서 3일간의 금욕 기간 후 수음(masturbation)으로 멸균처리된 용기에 무균적으로 정액을 채취하여 일상적인 정액검사를 실시한 후 신선정자 상태로 생후 12-16주의 golden hamster(*Mesocricetus auratus*)를 사용하여 SPA를 시행하였다.

### 2. 연구방법

SPA의 시행 방법은 이미 본 교실에서 발표한 바와 같다(장 등, 1990; 신과 장, 1990; 신 등, 1990).

#### 1) 정자 처리

채취된 정액을 실온에서 30-60분 동안 방치하여 액화(liquefaction)된 정액 중 일부를 취하여 Makler counting chamber를 이용하여 정자의 농도, 운동성 생존지수(motility index, MI) 등의 일상적인 정액검사를 시행하였다. 정자의 생존지수는 이(1984)의 정자 생존지수 조건표에서 정자의 운동력(kinetics)과 운동성(motility)을 이용하여 구하였다.

그후 남은 정액을 N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulfonic acid(TES) 211 mM, hydroxymethyl aminomethane(Tris) 96 mM, dextrose 11mM, 1% penicillin-streptomycin 용액에 20% 신선 계란황(hen's egg yolk)을 첨가하고 pH 7.4, osmolarity 290-320mOsm/kg으로 조정된 TES-Tris-yolk extender buffer(TYB)와 용량비 1:1로 서서히 혼합하였다. 이 혼합액을 냉장고에서 4°C까지 서서히 냉각시켜 42시간 동안 저온 배양하여 정자에 수정능력이 획득되게 하였다. 그후 정자혼합액을 0.3% bovine serum albumin(BSA)을 함유한 37°C의 Ham's F-10 6ml로 혼합하여 원심분리기에서 650xg로 5분간 원심분리를 2회 실시하여 정자의 원침(pellet)이 형성되면 상층액을 제거하고 세척한 후 1.0% BSA를 함유한 Ham's F-10 0.6ml를 추가하여 60분간 swim-up 시켰다.

#### 2) 투명대 제거 햄스터 난자의 준비

생후 12-16주된 자성(female) 햄스터를 대상으로 과배란유도를 시행하여 투명대 제거 햄스터 난자를 준비하였다. 햄스터를 매 12시간 마다 명암에 교대로 노출시키며 환경에 적응시킨 후 estrus 주기 제 1일째 아침에 pregnant mare serum gonadotropin(PMSG) 35IU를 복강내로 주사하고, estrus 주기 제 3일째 저녁에, 즉 PMSG 주입 52-54시간 후 human chorionic gonadotropin(hCG) 35IU를 복강내로 주사하여

과배란을 유도하였다.

hCG 투여 14-16시간 후 경추탈구법(cervical dislocation)으로 햄스터를 희생시키고, 복강을 열어 난소, 난관 및 자궁을 노출시켜 지방조직을 제거한 후 양측 난관만을 절제하여 phosphate buffered saline(PBS)이 담긴 배양접시에 담아 난관팽대부를 절단함으로써 난구체(cumulus complex)가 흘러나오게 하였다. 난구체는 0.1% hyaluronidase를 포함한 PBS가 담긴 배양접시에 옮겨 난구세포를 제거하였고, 3회 세척한 후 0.1% trypsin을 포함한 PBS에서 투명대를 제거하고 다시 3회 세척하였다.

### 3) 수정

전배양(preincubation)시킨 정자를 배양접시에 운동성 정자가  $1 \times 10^6/ml$ 이 되도록 떨구어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기내에서 투명대 제거 햄스터 난자 10개와 0.3% BSA를 함유한 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 제거하였다. 슬라이드 위에 소량(5-10 $\mu$ l)의 배양액과 함께 난자를 옮겼으며, cover slip 주위 네곳에 소량의 vaseline-paraffin 혼합액을 떨구고 슬라이드에 덮은 후 실체현미경으로 관찰하면서 난자가 파손되지 않도록 조금씩 조절하며 cover slip을 슬라이드에 눌렀다. 슬라이드를 고정액(methanol:acetic acid=3:1)에 넣어 밤새 고정시킨 후 0.25% acetic lacmoid로 염색하여 위상차현미경으로  $\times 1,000$  배율하에서 정자의 난자내 침투 여부를 관찰하였다.

이때 정자의 두부(head)가 부풀었거나 남성 전핵(male pronucleus)이 보이며 해당 정자의 미부(tail)가 난자세포질 내에서 식별될 때 정자가 난자내로 침투된 것으로 간주하였다. 전예에서 정자의 난자 침투 정도는 난자 침투율(penetration rate, PR:정자가 한개 이상 침투된 난자 수/수정시킨 총 난자 수) 및 난자 침투지표(penetration index, PI:침투된 총 정자 수/수정시킨 총 난자 수)로서 나타내었다.

### 5) 통계 처리

Student's t-test를 사용하여 통계처리 및 유의성 감정을 하였으며,  $p < 0.05$ 를 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다. 상관관계의 분석에서는 회귀직선(linear regression)과 상관계수(correlation coefficient)를 이용하였다.

## 결 과

### 1. 정액검사

가임 남성 67명의 정액검사 결과 정자 수의 범위는  $10-220 \times 10^6/ml$ 로서 평균  $96.0 \pm 46.6 \times 10^6/ml$ 이었다. 정자 운동성의 범위는 30%-90%로서 평균  $65.5 \pm 14.8\%$ 이었으며, 정자 생존지수(MI)의 범위는 20.0 - 70.0로서 평균  $46.31 \pm 13.29$ 이었다(표 1).

불임 남성 26명의 정액검사 결과 정자 수의 범위는  $1-100 \times 10^6/ml$ 로서 평균  $43.6 \pm 31.9 \times 10^6/ml$ 이었다. 정자 운동성의 범위는 10%-90%로서 평균  $45.8 \pm 23.6\%$ 이었으며, 정자 생존지수의 범위는 5.0-60.0로서 평균  $27.40 \pm 17.98$ 이었다(표 2).

양군을 비교할 때 정자의 수, 운동성 및 생존지수에 있어서 가임군이 불임군에 비하여 유의하게 높았다( $p < 0.005$ ,  $p < 0.005$ ,  $p < 0.005$ ).

Table 1. Results of semen analysis and SPA in fertile men

No.	Sperm parameters			SPA		
	Count ( $\times 10^6/ml$ )	Kinetics	Motility (%)	MI	PI	PR (%)
1	90	3	70	52.5	4.1	80
2	70	3	70	52.5	7.8	100
3	120	3	70	52.5	7.4	100
4	120	3	80	60.0	7.1	100
5	120	3	80	60.0	6.0	80
6	40	2	50	25.0	4.0	100
7	150	3	90	67.5	3.4	80
8	150	3	70	52.5	8.2	100
9	140	3	80	60.0	8.7	100
10	140	3	80	60.0	11.2	100
11	40	2	50	25.0	8.0	90
12	120	2	70	35.0	12.0	100
13	12	3	80	60.0	11.6	100
14	70	2	30	30.0	11.6	100
15	150	3	80	60.0	20.0	100
16	80	2	70	35.0	5.9	100
17	100	3	80	60.0	12.3	100
18	150	3	90	67.5	10.1	100
19	120	2	80	40.0	4.2	100
20	100	2	90	45.0	9.8	100
21	180	2	70	35.0	6.6	90
22	200	3	80	60.0	10.6	100
23	100	3	70	52.5	15.3	100

24	60	3	70	52.5	3.1	80
25	40	2	50	25.0	3.8	100
26	150	3	80	60.0	17.0	100
27	220	3	80	60.0	7.3	100
28	20	2	60	30.0	5.6	100
29	50	3	60	45.0	9.9	100
30	120	3	70	52.5	8.2	100
31	100	3	80	60.0	4.3	100
32	200	3	70	52.5	7.5	100
33	100	3	70	52.5	8.1	100
34	70	2	70	35.0	4.5	100
35	150	3	70	52.5	8.3	100
36	40	3	40	30.0	3.2	100
37	100	3	40	30.0	4.7	100
38	80	3	60	45.0	6.2	100
39	80	2	50	25.0	7.8	100
40	80	4	70	70.0	24.5	100
41	100	3	50	37.5	4.7	100
42	100	2	40	20.0	6.2	100
43	60	3	70	52.5	12.1	100
44	100	3	50	37.5	4.7	100
45	80	3	60	45.0	6.6	100
46	30	4	30	30.0	3.7	100
47	20	3	60	45.0	3.1	100
48	60	3	70	52.5	11.4	100
49	120	3	70	52.5	9.5	100
50	80	3	80	60.0	3.5	100
51	120	2	50	25.0	6.8	100
52	10	3	70	52.5	3.6	100
53	200	3	80	60.0	10.7	100
54	50	3	50	37.5	4.1	100
55	50	3	40	30.0	5.4	100
56	40	2	40	20.0	3.1	100
57	80	2	50	25.0	7.8	100
58	100	3	50	37.5	11.4	100
59	90	3	40	30.0	9.9	100
60	60	3	80	60.0	29.0	100
61	100	3	80	60.0	27.0	100
62	60	3	70	52.5	10.5	100
63	100	3	70	52.5	28.4	100
64	70	3	70	52.5	15.9	100
65	100	3	60	45.0	18.8	100
66	120	3	70	52.5	19.8	100
67	110	3	70	52.5	25.0	100
Range						
Min.	10	2	30	20.0	3.1	80
Max.	220	4	90	70.0	29.0	100
Mean	96.0	2.81	65.5	46.31	9.59	98.5
S.D.	46.6	0.46	14.8	13.29	9.35	5.0

MI:motility index, PI:penetration index,  
PR:penetration rate

## 2. SPA

가임 남성 67명의 SPA 결과 남자 침투율(PR), 즉 정자를 수정시킨 후 남자 수에 대한 하나 이상의 정자에 의하여 침투된 남자 수의 백분율은 80%~100%로서 평균  $98.5 \pm 5.0\%$ 이였으며, 남자 침투지표(PI), 즉 정자를 수정시킨 총 남자 수에 대한 난자를 침투한 총 정자 수의 비는 3.1~29.0로서 평균  $9.59 \pm 6.35$ 이였다. 가임군의 모든 예에서 남자 침투지표는 3.0 이상 이였다(표 1).

불임 남성 26명의 SPA 결과 남자 침투율은

Table 2. Results of semen analysis and SPA in infertile men

No.	Sperm parameters			SPA		
	Count ( $\times 10^6/ml$ )	Kine- tics	Motil- ity(%)	MI	PI	PR (%)
1	80	3	80	60.0	0	0
2	15	2	40	20.0	0	0
3	70	2	40	20.0	0	0
4	38	2	10	5.0	0	0
5	40	3	50	37.5	0	0
6	30	3	60	45.0	0.5	40
7	70	1	70	17.5	0	0
8	70	2	20	10.0	0	0
9	70	2	20	10.0	0	0
10	100	3	70	52.5	0	0
11	25	3	70	52.5	0.2	10
12	90	2	90	45.0	0.8	40
13	10	2	30	15.0	0.5	20
14	90	3	80	60.0	0.9	50
15	2	2	50	25.0	0.5	50
16	18	2	50	25.0	0.4	20
17	1	2	50	25.0	1.3	60
18	100	2	20	10.0	0	0
19	30	2	30	15.0	0	0
20	10	2	20	10.0	0.4	20
21	60	3	70	52.5	0.7	60
22	35	3	60	45.0	0.6	40
23	10	2	20	10.0	1.3	50
24	25	2	20	10.0	0.8	50
25	43	2	10	5.0	1.0	70
26	1	2	60	30.0	0.6	60
Range						
Min.	1	1	10	5.0	0	0
Max.	100	3	90	60.0	1.3	70
Mean	43.6	2.27	45.8	27.40	0.40	24.6
S.D.	31.9	0.52	23.6	17.98	0.42	24.8

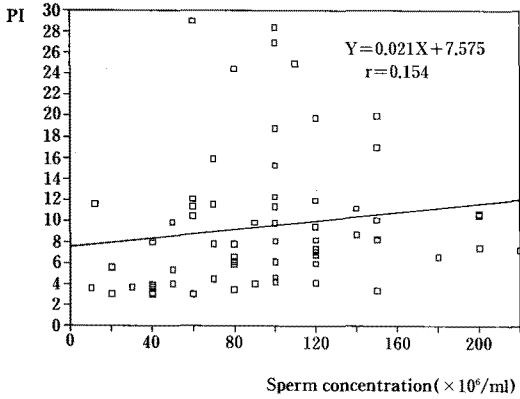


Fig. 1. Correlation between sperm concentration and penetration index (PI) of SPA in fertile men.

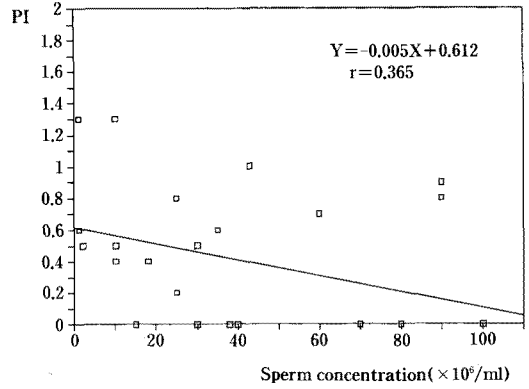


Fig. 4. Correlation between sperm concentration and penetration index (PI) of SPA in infertile men.

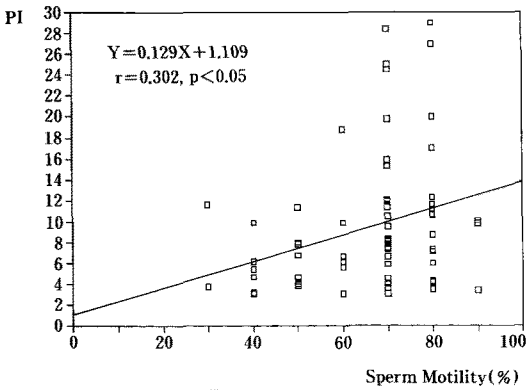


Fig. 2. Correlation between sperm motility and penetration index (PI) of SPA in fertile men.

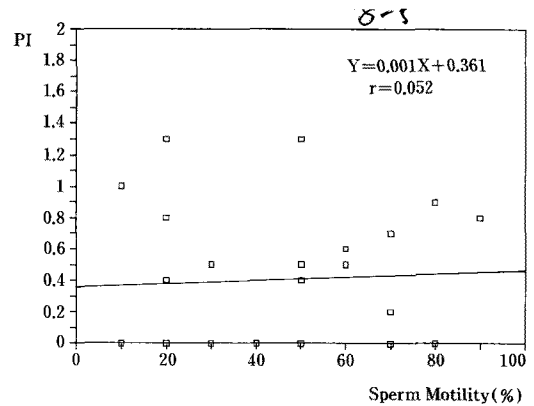


Fig. 5. Correlation between sperm motility and penetration index (PI) of SPA in infertile men.

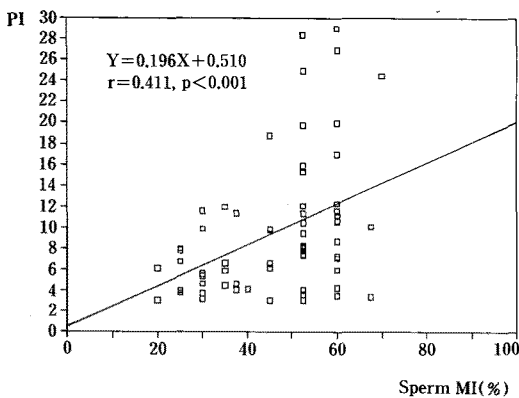


Fig. 3. Correlation between sperm motility index (MI) and penetration index (PI) of SPA in fertile men.

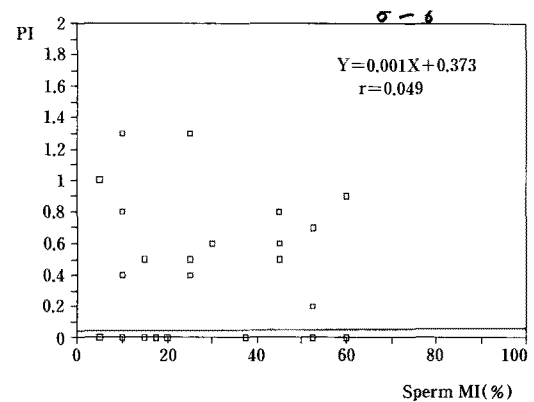


Fig. 6. Correlation between sperm motility index (MI) and penetration index (PI) of SPA in infertile men.

0% -70%로서 평균  $24.6 \pm 24.8\%$ 이었으며, 난자 침투지표는 0-1.3로서 평균  $0.40 \pm 0.42$ 이었

다(표 2).

양군을 비교할 때 난자 침투율 및 난자 침투

지표에 있어서 가임군이 불임군에 비하여 유의하게 높았다( $p < 0.005$ ,  $p < 0.005$ ).

### 3. 정액검사와 SPA 남자 침투지표의 상관관계

가임군에서 정액검사상의 정자 수와 SPA의 남자 침투지표 사이에 유의한 상관관계가 없었지만 정자 운동성 및 정자 생존지수와 SPA의 남자 침투지표 사이에는 각각 유의한 상관관계가 있었으며( $r = 0.302$ ,  $p < 0.05$ ;  $r = 0.411$ ,  $p < 0.001$ ), 정자 생존지수가 정자 운동성에 비하여 남자 침투지표와의 상관관계가 더 높았다(그림 1, 2, 3).

불임군에서 정액검사상의 정자 수, 정자 운동성 및 정자 생존지수와 SPA의 남자 침투지표 사이에 모두 유의한 상관관계가 없었다(그림 4, 5, 6).

## 고 찰

남성의 가임능력(fertility potential)을 평가하는 표준 검사로서 오래전부터 사용되어 온 정액검사는 정액내 정자의 농도, 운동성, 형태학적 특성 등을 정량적으로 분석할 수 있지만 정자의 체내 혹은 체외에서 난자를 수정시킬 수 있는 기능적 능력, 즉 정자의 수정능력을 정확히 반영할 수는 없다(Cockett et al., 1975; Smith et al., 1977). 현미경적 정액검사는 가장 흔히 사용되고 있지만 가임능력이 정상이거나 저하된 혹은 불임 남성 사이에 정자의 수, 운동성, 정상 형태 등의 정액 변수(semen parameters)에 있어서 중첩이 많이 되고 변이성(variability)도 크기 때문에 검사의 민감도가 떨어지며, 따라서 무정자증, 정자희소증, 정자사멸증 등의 경우를 제외하고는 남성 불임의 원인 검사에 있어서 미흡한 점이 많다(Sherins et al., 1977; Smith et al., 1977; Barfield et al., 1979). 또한 성교후 자궁경부 점액검사(postcoital test, PCT)와 항정자 항체(antisperm antibody) 검사는 여성측과 남성측의 불임 원인을 종합하여 평가할 수 있다는 점에서 널리 실시되고 있지만 아직 검사의 표준화가 확립되어 있지 않고 검사 결과의 해석에 있어서도 어려움이 많다.

인간 정자의 기능적 활성도를 평가할 수 있는 검사 방법의 개발은 불임 남성의 진단에 있어서 매우 중요하다. 1976년 Yanagimachi 등은 인간 정자가 투명대가 제거된(zona-free) 햄스

터 난자에 침투할 수 있는 능력으로 정자의 수정능력을 체외에서 평가할 수 있는 SPA를 개발하였다. 이후 많은 연구자들이 SPA를 남성 불임증의 진단 내지는 임상적 평가의 한 방법으로서 연구 개발하여 왔으며(Aitken et al., 1984; Blasco, 1984; Prasad, 1984; Yanagimachi, 1984; Rogers et al., 1985), 일반적으로 가임 남성의 정자가 수정능력이 저하되어 있거나 없는 남성의 정자에 비하여 투명대제거 햄스터 난자에 대한 침투 능력이 상대적으로 높은 것으로 인지되어 있다. SPA로 평가될 수 있는 정자의 수정능력 부여(capacitation), 난자세포막(oolemma) 통과, 난자세포질(ooplasm)내로의 함입 등과 같은 정자의 수정능력(Overstreet et al., 1980; Talbot & Chacon, 1982)은 남성의 가임능력 여부와 밀접한 관련(Margalioth et al., 1983; Aitken et al., 1984; Blasco, 1984; Mayer et al., 1984; Prasad, 1984; Yanagimachi, 1984)이 있을 뿐만 아니라 체외수정시 정자와 난자의 상호작용과 같은 정자의 기능적 특성(Wolf et al., 1983), 자궁경부 점액을 통과하여 생체내 수정 장소에 도달할 수 있는 정자의 능력(Templeton et al., 1982; Shats et al., 1984) 등과도 관련이 크다. Rogers 등(1983a)은 SPA 결과와 정액 검사상 정자의 형태학적 특성 사이에 상관관계가 있다고 보고한 바 있다.

그러나 SPA도 검사가 시행된 제반 조건에 따라(Perreault & Rogers, 1980; Zausner-Gulman et al., 1981; Berger et al., 1982; Wolf & Sokoloski, 1982), 또한 동일한 남성의 정액(Tyler et al., 1981; Rogers et al., 1983b)에서도 그 결과가 다양하므로 여러번 반복 시행하여야 하는 등 단점이 많이 있으며, 여러 연구 결과 SPA의 복잡적 실험과정에 수반되는 실험기법상의 오차로 인한 위음성결과 및 음성결과의 낮은 예측도가 주된 문제점으로 지적되어 왔다(Rogers, 1985; McClure et al., 1990). 이에 대처할 수 있는 방안으로 Rogers(1985)는 SPA 시행시 반드시 햄스터 난자에 대한 침투율이 이미 입증된 정액공여자의 정자를 대조군(internal control)으로 포함시켜 검사를 시행하여야 한다고 주장한 바 있다. 최근 McClure 등(1990)은 SPA 시행시 인간 난포액을 이용함으로써 SPA의 위음성결과를 많이 줄일 수 있었다고 보고하였다. 그러나 SPA를 시행할 때마다 검사 일정에 따라 정해진 시간에 정상 생식능력이 입증된 정액공여자로부터 정액을 채취하는

데는 실제적으로 많은 불편과 어려움이 뒤따른다(Urry et al., 1983).

본 교실에서는 SPA 시행시 냉동 전의 신선 정자와 냉동 보존 및 용해 후의 냉동정자 사이의 햄스터 난자 침투율에 있어서 회복율이 높고, 유의한 상관관계가 존재하므로 냉동 보존된 정자를 이용한 SPA는 정상 생식능력이 입증된 정액공여자의 정자를 냉동보존하여 SPA 시행시마다 용해하여 대조 정자로 사용할 수 있을 뿐만아니라 SPA의 검체로서 불임 남성 환자의 정액을 냉동 보존 및 용해 후 SPA를 시행함으로써 신선정자를 검사할 때 수반되는 여러 문제점을 줄일 수 있어 대상환자와 검사자 모두에게 많은 도움이 되고, SPA 검사 자체의 단순화(simplification)에도 기여할 수 있다고 보고한 바 있다(장 등, 1990). 또한 일정한 검색 단계를 거쳐 인간 신선정자에 비하여 SPA 결과의 분산(variance) 정도가 낮은 소 냉동정자(frozen bull sperm) 표본만을 선택하여 이를 SPA 시행시 대조 정자로 사용한다면 SPA 자체의 실험기법상의 오차로 인한 위음성 결과를 배제할 수 있으므로 임상적으로 남성의 가임능력을 평가하기 위한 SPA 결과의 판정에 보다 신중을 기할 수 있다고 보고한 바 있다(신 등, 1990).

Bolanos 등(1983)이 SPA 시행시 TEST-yolk buffer(TYB)를 이용하였을때 가임 남성 및 불임 남성에서 정자의 햄스터 난자 침투가 증진되었다는 것을 보고한 이후 Johnson 등(1984)이 TYB를 이용한 SPA를 적정화 시키고자 각 과정별로 최대의 난자 침투를 나타내는 최적조건을 규명한 바 있다. 그러나 TYB를 이용한 SPA시 일반 남성의 가임역에 대한 보고는 아직 미미한 실정이다.

SPA 시행 결과 대상 정자가 수정능력이 있다고(fertile) 판정하는 기준인 정자의 햄스터 난자 침투율은 연구 보고자 마다 차이가 있지만 햄스터 난자 침투율이 11% 이상(Stenchever, et al., 1982), 15% 이상(Karp et al., 1981), 20% 이상(Hall, 1981; Urry et al., 1983)이면 정자의 수정능력이 있는 것으로 간주되고 있다. Johnson 등(1990)은 TYB를 이용한 SPA 결과 난자 침투지표의 평균치에서 표준편차의 2배수를 감한 수치를 최저치(lower limit)로 정의하였을 때 정상 가임 남성 13명, 17명에서 난자 침투지표의 최저치는 각각 4.8, 5.3이었으며, 난자 침투지표가 5미만인 남성에서 체외수정시술시

난자의 체외수정율은 극히 낮을 뿐만아니라 체외수정율은 난자 침투지표와 정비례한다고 하였다. 장 등(1990)은 수정능력이 판명된 정자의 냉동 전 신선 상태에서의 난자 침투율은 55% - 110% (평균 78.8%)로서 모두 20% 이상 이었고 난자 침투지표는 1.8-7.0 (평균 4.0)이었으며, 냉동 보존 및 용해 후에도 난자 침투율은 50% - 90% (평균 70.0%)로서 모두 20% 이상 이었고 난자 침투 침투치는 1.0-4.2 (평균 2.3)으로 유의하게 감소되었다고 보고하였다.

본 연구에서 가임군의 난자 침투율은 80% - 100% (평균 98.5%), 난자 침투지표는 3.1-29.0 (평균 9.59)이었으며, 불임군의 난자 침투율은 0% - 70% (평균 24.6%), 난자 침투지표는 0-1.3 (평균 0.40)로서 가임군의 난자 침투율과 난자 침투지표가 불임군에 비하여 각각 유의하게 높았다. 특히 가임군의 모든 예에서 난자 침투지표는 3.0 이상이었던 반면에 불임군에서는 2.0 미만이었으며, 불임군에서 체외수정시술시 과배란유도 후 채취된 난자들을 체외에서 수정시켰을 때 모든 난자에서 수정이 일어나지 않은 불임 부부의 남성 10명 중 1명(No. 6)을 제외한 9명 모두 난자 침투율과 난자 침투지표가 각각 0%, 0이었다. 본 연구와 장등(1990)의 연구 결과를 비교할 때 정상 가임 남성의 난자 침투지표의 범위와 평균치에서 차이가 나는 것은 장 등은 SPA 시행시 정자를 Biggers, Whitten & Whittingham(BWW) 용액에서 18시간 동안 전배양하였고, 본 연구에서는 정자를 TYB 용액에서 42시간 동안 저온 전배양한 결과에서 기인한 것으로 생각된다.

본 연구에서 가임군의 경우 정자 운동성 및 정자 생존지수와 SPA의 난자 침투지표 사이에는 각각 유의한 상관관계가 있었는데 정자 생존지수가 정자 운동성에 비하여 난자 침투지표와의 상관관계가 더 높았다, 따라서 정자의 운동력과 운동성을 모두 반영하는 정자 생존지수가 정자의 수정능력을 더 잘 반영할 것으로 사료된다.

본 연구 결과 TYB에서의 정자 저온 전배양을 이용한 SPA는 정자의 수정능력, 즉 남성의 가임능력을 체외에서 평가할 수 있는 매우 유용한 진단 방법으로서 남성인자 등과 같은 불임증의 원인 규명과 향후 치료 방향의 설정 등에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

저자들은 SPA의 정상 가임역을 설정하여 SPA의 임상적 적용에 도움이 되고자 가임 남성 67명과 불임 남성 26명을 대상으로 TES-Tris-yolk buffer(TYB)를 이용한 SPA를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 가임군의 정액검사 결과 정자수는  $96.0 \pm 46.6 \times 10^6/\text{ml}$ , 정자 운동성은  $65.5 \pm 14.8\%$ , 정자 생존지수(MI)는  $46.31 \pm 13.29$ 로서 불임군의  $43.6 \pm 31.9 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $45.8 \pm 23.6\%$ ,  $27.40 \pm 17.98$ 에 비하여 각각 유의하게 높았다.

2. 가임군의 SPA결과 난자 침투율(PR)은  $98.5 \pm 5.0\%$  (80% - 100%), 난자 침투지표(PI)는  $9.59 \pm 6.35$  (3.1 - 29.0)이었으며, 모든 예에서 난자 침투지표는 3.0 이상 이었다.

3. 불임군의 SPA 결과 난자 침투율은  $24.6 \pm 24.8\%$  (0% - 70%), 난자 침투지표는  $0.40 \pm 0.42$  (0 - 1.3)이었다.

4. 가임군의 난자 침투율과 난자 침투지표가 불임군에 비하여 각각 유의하게 높았다.

5. 가임군에서 정액검사상의 정자 수와 SPA의 난자 침투지표 사이에 유의한 상관관계가 없었지만 정자 운동성 및 정자 생존지수와 난자 침투지표 사이에는 각각 유의한 상관관계가 있었다.

6. 불임군에서 정액검사상의 정자 수, 정자 운동성 및 정자 생존지수와 SPA의 난자 침투지표 사이에 모두 유의한 상관관계가 없었다.

이상의 결과로서 TYB를 이용한 SPA는 불임증의 원인, 특히 남성인자의 규명과 향후 치료 방향의 설정 등에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

## 인 용 문 헌

Aitken RJ, Best FSM, Warner P, Templeton A: A prospective study of the relationship between semen quality and fertility in cases of unexplained infertility. *J Androl* 1984, 5, 297.  
Barfield A, Melo J, Coutinho E: Pregnancies associated with sperm concentration below 10 million/ml in clinical studies of a potential male testosterone esters. *Contraception* 1979, 20, 121.  
Berger RE, Karp LE, Williamson RA, Koehler J,

Moore DE, Holmes KK: The relationship of pyospermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as reflected in the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 1982, 37, 557.  
Blasco L: Clinical tests of sperm fertilizing ability. *Fertil Steril* 1984, 41, 177.  
Bolanos JR, Overstreet JW, Katz DF: Human sperm penetration of zona-free hamster eggs after storage of the semen for 48 hours at 2 °C to 5 °C. *Fertil Steril* 1983, 39, 538.  
장윤석, 김석현, 강석진, 방명걸, 신창재, 문신용: 냉동 보존된 정자를 이용한 난자의 체외수정에 관한 연구. *대한산부회지* 1990, 33, 61.  
Cockett ATK, Netto ICV, Dougherty KA, Urry RL: Semen analysis: A review of samples from 225 men seen at an infertility clinic. *J Urol* 1975, 114, 560.  
Hall JL: Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Fertil Steril* 1981, 35, 457.  
Johnson A, Bassham B, Lipshultz LI, Lamb DJ: Methodology for the optimized sperm penetration assay. In: Keel BA, Webster BW, eds. *Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility*. Boca Raton, Ann Arbor, Boston: *CRC Press*, 1990, 7, 135.  
Johnson AR, Syms AJ, Lipshultz LI, Smith RG: Conditions influencing human sperm capacitation and penetration of zona-free hamster ova. *Fertil Steril* 1984, 41, 603.  
Karp LE, Williamson RA, Moore DE, Shy KK, Plymate SR, Smith WD: Sperm penetration assay: useful test in evaluation of male fertility. *Obstet Gynecol* 1981, 57, 620.  
이용빈: 소의 인공수정. *가축인공수정요론*. 서울: 선진문화사, 1984, 4, 106.  
Margalioth EJ, Navot D, Laufere N, Shlomo MY, Rabinowitz R, Yarkow S, Schenker JG: Zona-free hamster ovum penetration assay as a screening procedure for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983, 40, 386.  
Mayer JF, Jones K, McDowell J: Comparison of short and long preincubation times in the zona-free hamster ova assay with human fertilization. *Fertil Steril* 1984, 41, 106S.  
McClure RD, Tom RA, Dandekar PV: Optimizing



- the sperm penetration assay with human follicular fluid. *Fertil Steril* 1990, 53, 546.
- Overstreet JW, Yanagimachi R, Katz DF, Hayaishi K, Hanson FW: Penetration of human spermatozoa into the zona pellucida and the zona-free hamster egg: a study of fertile donors and infertile patients. *Fertil Steril* 1980, 33, 534.
- Perreault SD, Rogers BJ: Capacitation pattern of human spermatozoa. *Fertil Steril* 1980, 38, 258.
- Prasad MRN: The in vitro sperm penetration test: A review. *Int J Androl* 1984, 7, 5.
- Rogers BJ: The sperm penetration assay: its usefulness reevaluated. *Fertil Steril* 1985, 43, 821.
- Rogers BJ, Bentwood BJ, Van Campen H, Helmbrecht G, Soderdahl D, Hale RW: Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity. *J. Androl* 1983, 4, 119.
- Rogers BJ, Perreault SD, Bentwood BJ, McCarville C, Hale RW, Soderdahl DW: Variability in the human-hamster in vitro assay for fertility evaluation. *Fertil Steril* 1983, 39, 204.
- Rogers BJ, Van Campen H, Ueno M, Lambert H, Bronson R, Hale R: Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil Steril* 1979, 32, 664.
- Schats R, Aitken RJ, Templeton AA, Djahanbakhch O: The role of cervical mucus-semen interaction in infertility of unknown aetiology. *By J Obstet Gynaecol* 1984, 91, 371.
- Sherins RJ, Brightwell D, Sternthal PM: Longitudinal analyses of semen of fertile and infertile men. In: Toren P, Nankin HR, eds. The testis in normal and infertile men. New York: Raven press, 1977, 473.
- 신창재, 방명걸, 이진용, 장윤석, 정영채, 김창근: 햄스터난자 침투 분석법에서 대조표준정자로서 황소정자의 유용성에 관한 연구. 대한산부회지 1990, 33, 1758.
- 신창재, 장윤석: 인간정자의 수정능부여 및 햄스터난자 침투에 영향을 주는 인자들에 관한 연구. 대한산부회지 1990, 33, 954.
- Smith KD, Rodriguez-Rigau LJ, Steinberger E: Relation between indices of semen analysis and pregnancy rate in infertile couples. *Fertil Steril* 1977, 28, 1314.
- Stenchever MA, Spadoni LR, Smith WD, Karp LE, Shy KK, Moore De, Berger R: Benefits of the sperm (hamster ova) penetration assay in the evaluation of the infertile couple. *Am J Obstet Gynecol* 1982, 143, 91.
- Talbot P, Chacon RS: Ultrastructural observations on binding and membrane fusion between human sperm and zona pellucida-free hamster oocytes. *Fertil Steril* 1982, 37, 240.
- Templeton A, Aitken RJ, Mortimer D, Best F: Sperm Function in patients with unexplained infertility. *Br J Obstet Gynecol* 1982, 89, 550.
- Tyler JPP, Pryor JP, Collins WP: Heterologous ovum penetration by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1981, 63, 499.
- Urry RL, Carrell DT, Hull DB, Middleton RG, Wiltbank MC: Penetration of Zona-free hamster ova and bovine cervical mucus by fresh and frozed human spermatozoa. *Fertil Steril* 1983, 39, 690.
- Wolf DP, Sokoloski JE: Characterization of sperm penetration bioassay. *J Androl* 1982, 3, 445.
- Wolf DP, Sokoloski JE, Quigley MM: Correlation of human in vitro fertilization with the hamster egg bioassay. *Fertil Steril* 1983, 40, 53.
- Yanagimachi R: Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizaing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res* 1984, 10, 187.
- Yanagimachi R, Yanagimachi 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 Reprd* 1976, 15, 471.
- Zausner-Gullman B, Blasco L, Wolf DP: Zona-free hamster eggs and human sperm penetration capacity: a comparative study of proven fertile donors and infertility patients. *Fertil Steril* 1981, 36, 771.