

Standardized Glass-wool Column을 이용한 운동성 정자의 선택적 분리 및 이의 체외수정에의 이용

고려대학교 의과대학 산부인과학교실

김선행 · 구병삼

= Abstract =

Selective Concentration of Viable Spermatozoa by Standardized Glass-wool Column and Its Use for IVF

Sun Haeng Kim and Pyung-Sham Ku

Dept. of Obstetrics & Gynecology, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

To increase fertilization rate in vitro, separation of viable spermatozoa from the seminal plasma and its other components may be a useful procedure. Ejaculates from healthy men, whose semen analysis findings were normal in 19, and abnormal in 10, were filtered using the glass-wool filtration technique to yield a concentrated, viable sperm samples for IVF, and the usefulness and safety of this method were evaluated. The recovery rate of motile sperm in abnormal groups was 46.2% and 54.5% in normal group. The % motility was increased significantly compared with original sample after filtration, and the grade motility was improved, too. The sperm population with normal morphology was also increased significantly in both group.

Using transmission electron microscopy, the ultrastructural integrity of acrosomal segment was examined in order to evaluate the potentially hazardous effect of glass-wool filtration to sperm head, however, sperm population with normal ultrastructure was increased compared with that of original ejaculate after separation.

The filtered sperm was then processed for IVF, as the fertilizing capacity is the ultimate parameter of the sperm function. In abnormal group, the fertilization rate(41.5%) and the ET rate per stimulated cycle were much lower than that of normal group(69.6%). However, the cleavage rate and the number of embryos transferred per ET cycle were comparable with those of normal group.

The results suggest that the glass-wool filtration of sperm, particularly in oligo-asthenozoospermia, may be useful and safe method in the preparation of sperm for IVF.

서 론

정자의 수정능력을 결정하는 가장 중요한 지표가 정자의 % motility 및 grade motility 인바 seminal plasma 로 부터 점진적 운동성을 갖는 정자만을 선택적으로 얻으려는 노력으로

등장성 Pescoll용액을 이용한 밀도율 원심법에 의한 방법(1,2), glass bead(3), 혹은 glass fiber(4)를 이용한 방법, 그리고 swim-up에 의한 분리 등 여러 방법들이 고안 사용되어져 왔으며 이 방법들을 이용하여 운동성 정자를 얻는 외에도 정자의 수명이나 기능에 잠재적으로 장애를 초래할 가능성이 있는 seminal plasma로 부터 정

*본 논문의 요지는 1988년 10월 7일 제62차 대한 산부인과 학회 추계 학술대회에서 발표하였음.

자를 분리하는 의미가 있으며(1,5) 또한 원정액 내에 포함된 백혈구, 세균 및 비세포성 불순물을 제거할 수도 있다.

Paulson 등(6)이 glass-wool fiber column을 이용하여 비운동성 정자를 제거한 보고가 있을 후 Jeyendran 등(7)이 최근 glass-wool microfiber column을 이용하여 viable sperm을 분리하여 인공수정에 이용한 보고가 있기까지 glass fiber의 종류나 column의 조작에 기준이 없었고 나아가 Sherman 등(8)에 의하여 제기된 정자의 미세구조에 손상가능성등이 임상적용의 제약조건으로 작용되었다.

저자들은 standardized glass-wool microfiber column(10)을 이용하여 운동성 정자를 분리하여 이로 얻어진 정자를 인간난자의 체외수정에 사용하여 얻은 결과를 발표하고자 한다.

재료 및 방법

본교실 IVF clinic에서 1988년 5월부터 7월까지 3개월간 과배란 유도 및 난자 채취를 시행한 환자의 남편으로부터 수음에 의하여 얻어진 정액에서 glass-wool filtration을 시행하여 운동성 정자를 분리하여 정자 회수율, 운동성 및 정자 형태등을 원정액과 비교하였고 이로 얻어진 정자를 인간난자의 체외 수정에 사용하여 수정 능력 및 이로 얻어진 배아의 자궁내 이식 후 viability등을 관찰함으로써 이 방법의 유용성을 보였고 동시에 TEM(transmission electron microscopy)을 이용하여 acrosomal segment의 ultrastructural integrity를 관찰하여 이방법의 안전성을 검토하였다.

환자의 선택 : Markler chamber를 이용한 정액 검사상 비정상을 나타낸 10명의 환자 및 정상 소견을 보인 19명의 환자를 대상으로 하였으며, 비정상 정액 소견의 기준은 sperm concentration ; $<2 \times 10^6/ml$, % motility ; $<40\%$, normal morphology ; $<40\%$ 로 하였다.

과배란 유도 및 난자 채취 : 과배란 유도를 위한 protocols은 1) Serophen(Clomiphene citrate, Serono Laboratory, Inc.) + Pergonal(hMG, Serono Laboratory, Inc.), 혹은 2) Metrodin(FSH, Serono Laboratory, Inc. : 75 iu of human urinary FSH and <1 iu of LH per ampule) + Pergonal 이었으며 난포의 성장은 매일 혈중 estradiol(E2) 및 LH 치의 측정과 vaginal probe

를 사용한 초음파를 이용하여 monitoring 하였으며 leading follicle의 직경이 18mm에 달하고 15mm 이상의 난포가 2개 이상 있으면 Profasi 10,000 iu를 주고 34-36 시간후에 ultrasono-guided, transvaginal ovum pick-up을 시행하였다. 난자는 채취 당시 배란전난으로 판정되면 5-8 시간의 전배양기간을 거쳐 insemination을 시행하였다.

정자의 준비 : glass-wool microfiber column의 준비는 Jeyendran 등(7)이 기술한 방법을 변형시킨 것으로 disposable tubercle syringe를 이용하여 15mg의 glass-wool microfiber code 112 (Manville, Denver, Co., USA)를 3.5mm의 두께로 조작한후 배양액에 의한 반복세척으로 fiber fragments를 제거하였다.

약 3일간의 금욕기간을 갖은후 얻어진 정액은 실온에서 20-30분간 방치하여 액화를 기다려 Ham's-F10 배양액을 가하고 2회의 원심(600×6 minutes)를 거쳐 생긴 pellet를 0.3 -0.5ml의 배양액을 가하고 잘 혼합하여 미리 준비한 glass-wool column에 중력을 이용하여 통과시키고 약 0.2ml의 배양액을 추가하여 잔존정자를 여과시켰다.

정자미세구조의 검사 : sperm head acrosome의 미세손상 여부를 증명하기 위하여 정액검사상 정상소견을 보인 3예에서 TEM을 이용하여 관찰하였고 Heath 등(9)이 기술한 방법에 따라 분류하였다. 검사를 시행한 각예마다 최소 200-300마리 이상의 정자를 count하여 각기 백분율로 표시하였다.

정자수명의 검사 : 처치 전후 정자의 기능을 보기 위하여 실온에 방치하여 24, 48 및 72시간에 정자의 % motility를 비교관찰 하였다.

체외수정 및 자궁내 배이식 : 수정된 난자는 5-8시간의 전배양 과정을 거쳐 resuspended sperm을 난자당 운동성 정자수 1×10^5 로 insemination시켰다. 난자 채취 당시 미성숙난으로 판정된 경우엔 24-36시간의 배양과정을 거친후 같은 방법으로 insemination하였다. insemination 후 약 15-20 시간의 incubation 후 fertilization이 일어났는지 여부를 판정하여 fertilization이 안 일어나고 또한 퇴행성 변화의 증거가 없으면 re-insemination을 시행하였다. 수정난이 분열을 시작하면 보통 2-8 세포기에 자궁내 이식을 시행 하였다.

결 과

대상자의 평균 연령은 36.6세(범위: 26-73세)로써 양군간에 유의한 차이는 없었으며, 정상군 19명의 진단은 자궁 내막증 4예를 포함하여 나팔관 및 복강내 요인이 14예로 가장 많았고, 기본 검사상 이상을 보이지 아니한 원인을 모르는 불임증 3예등 이었다. 양군에서의 원정액 검사 소견은 table 1.과 같다.

정자의 회수율: table 2. 에서 보는 바와 같이 비정상군에서는 16.6%, 정상군에서는 35.9%의 회수율을 보여 통계학적 유의차를 보였고($p < 0.05$) 평균 29.2%를 나타내었다. 그러나 운동성 정자만의 회수율은 아군에서 각 46.2% 및 54.5%를 나타내어 유의한 차를 볼수 없었고 평균 51.6% 이었다(Table 3).

정자의 운동성: table 4. 에서 보는 바와 같이

비정상군에서 42.7%, 정상군에서 28.3%의 % motility의 증가를 각각 보여 처치전 원정액과 비교하여 통계학적으로 매우 유의한 차를 나타내었으며 ($p < 0.01$, 및 $p < 0.001$), 또한 % motility 뿐만아니라, 정자의 grade motility, 즉 운동속도의 증가를 볼수있었다(Table 3).

정자의 형태 및 미세구조: 처치후 정자의 Pap. staining에 의한 광학현미경하에서의 검사상 정상형태를 갖는 정자의 백분율은 양군에서 각각 21.5% 및 15.3% 증가되어 유의한 수준차 ($p < 0.01$, 및 $p < 0.001$)를 관찰할수 있었다(Table 5).

table 6.에서 보는 바와 같이 TEM을 이용한 정자 미세구조의 관찰에서 acrosomal segment의 정상구조를 갖는 정자가 처치후 약 20% 정도 증가를 보였고(figure 1-a), plasma membrane 이나 acrosome에 변형을 일으킨 비정상구조를 보인 정자(figure 1-b,c,d)의 백분율이 전반적으로 저하를 나타내었음을 관찰하였다.

Table 1. Initial Semen Analysis

	Volume(ml)	Concent.(10 ⁶ /ml.)	% Motility	Normal Morphology(%)
Abnormal group	2.5	23.2±11.7	35.9±15.3	45.2±13.8
Normal group	2.2	76.2±32.3	63.8±13.4	67.1±11.0

Table 2. Recovery Rate after filtration (mean±SD, 10⁶)

	Total sperm count		Percentage
	Before Filtration	After filtration	
Abnormal group	63.3±47.4	10.5±9.4	16.6**
Normal group	165.7±101.2	59.5±39.3	35.9

*Total volume; Abnormal group, 2.5ml(mean)/Normal group, 2.2ml

*Mean recovery rate; 29.24%

* $p < 0.05$

Table 3. Recovery Rate of Motile Sperm after Filtration (mean±SD, 10⁶)

	Motile sperm count		Percentage
	Before filtration	After filtration	
Abnormal Group	20.6±15.3	9.1±9.3	46.2
Normal Group	104.9±68.5	55.6±38.9	54.5

*Average recovery rate; 51.6%

Table 4. % Motility and Foreward progression (mean±SD)

	Before filtration		After filtration	
	% Motility	velocity	% Motility	velocity
Abnormal Group	35.9±15.3	II - III	78.6±22.5*	I I I - IV
Normal Group	63.8±13.4	III	92.3±7.6**	IV - V
Average	54.2		87.6	

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$

Table 5. Comparison of Semen Analysis Findings between the Initial and Final Samples

	Abnormal Group		Normal Group	
	Initial	Final	Initial	Final
Volume (ml)	2.5	0.7	2.2	0.8
Concentration(10 ⁶ /ml)	23.2±11.7	14.9±11.1	76.2±32.3	73.5±43.2
Count (10 ⁶)	63.3±47.4	10.5±9.4	165.7±101.2	59.5±39.3
% Motility	35.9±15.3	78.6±22.5**	63.8±13.4	92.3±7.6***
Motile Sp. Count (10 ⁶)	20.6±15.3	9.1±9.3	104.9±68.5	55.6±38.9
Grade Motility	I - III	III - IV	III	IV - V
Morphology, Normal(%)	45.2±13.8	66.7±17.6*	67.1±11.0	82.4±13.2**

* ; p<0.05, ** ; p<0.01, *** ; p<0.001

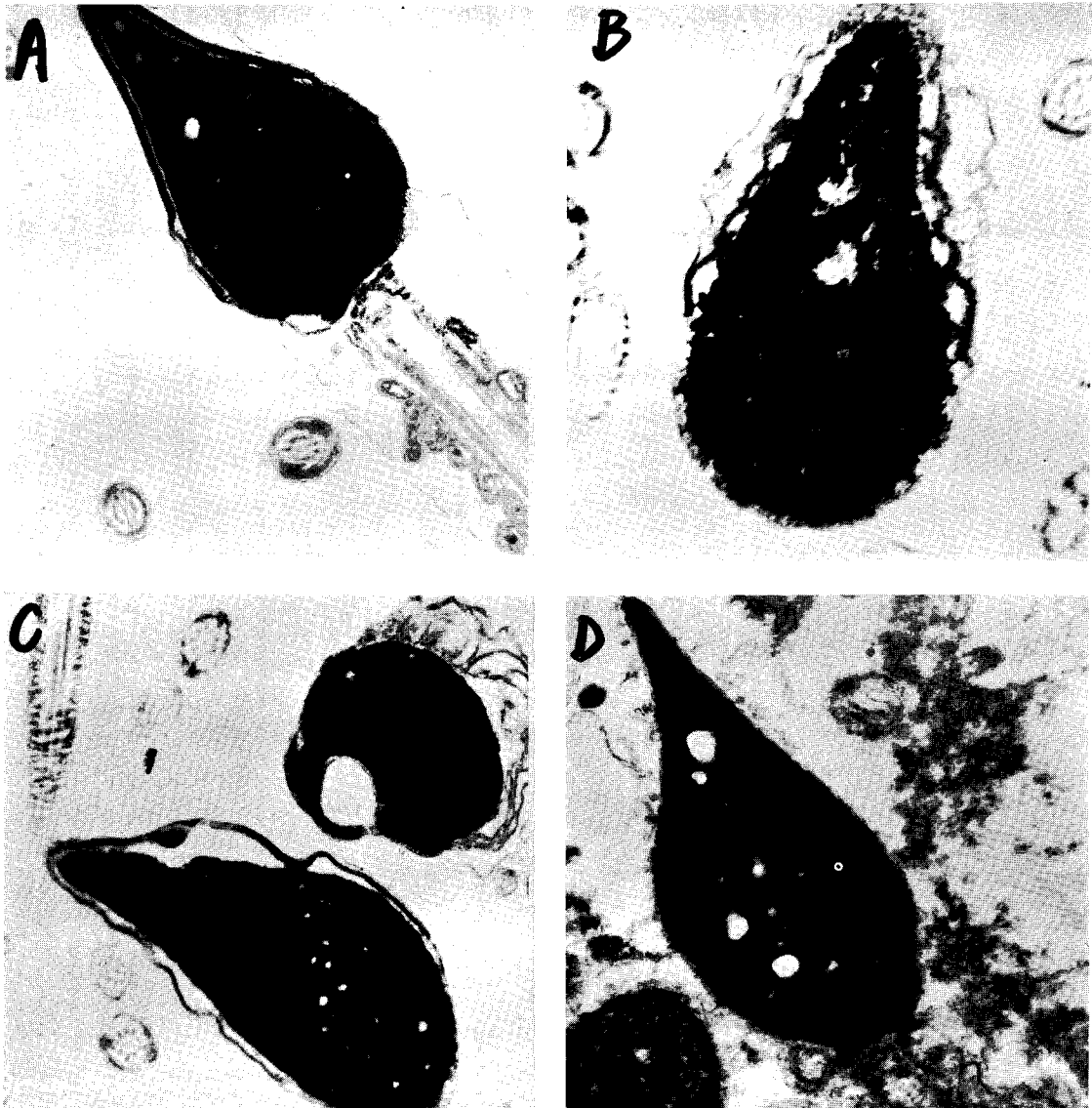


Fig. 1. A-Normal, intact spermatozoon, B-Changed acrosome with pseudoacrosomal reaction, C-Ruptured plasma membrane, D-Acrosome lost.

정자의 수명 : figure 2. 에서와 같이 처치 전 후의 정자를 실온에 방치하여 % motility를 이용한 일정시간 후의 운동성 보유 정자의 백분율을 측정된 결과 큰 차이를 발견할수 없었다.

체외 수정, 배아 이식 및 임신 성공률 : table 7. 에서 보는 바와 같이 비정상군에서 처리후에도 수정율이 41.5%로 정상군의 69.6%와 비교하여 크게 떨어지나 수정난의 분열율은 공히 90% 정도로 차이가 없었다. 배아 이식율은 각각 40

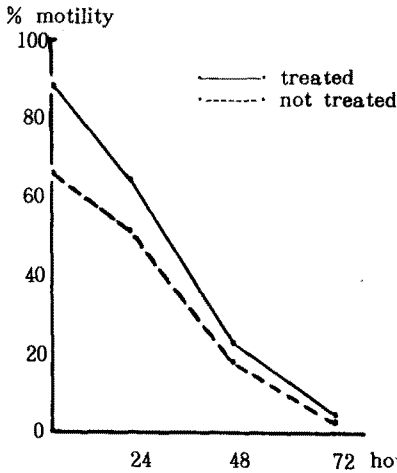


Fig. 2. Comparison of the sperm survival.

% 및 90%로 현저한 차이를 보였으나 이식 환자당 배아의 수에는 차이가 없었다. 임신에는 비정상군에서 배아 이식을 시행한 4명중 1예(25%), 정상군에서는 17명중 4예(23.5%)에서 임신이 성립되었다.

고 안

In vitro에서 난자의 수정율을 높이기 위하여 많은 방법들이 시도되어왔고 그 일환으로 수정율에 영향을 미칠수 있는 중요한 요인으로 지적된 정자의 질을 높이기 위하여 viable spermatozoa를 선택적으로 분리할수 있는 여러 방법들이 고안되었다. IVF & ET가 불임치료의 유용한 방법으로 정착된 최근 10년래에 특히 male factor나 unexplained infertility에 이러한 방법들을 통하여 여러 고무적인 결과들이 보고되었다(2,10).

viable spermatozoa를 분리하는 어느 방법이든지 정자의 회수율 특히 운동성 정자의 회수율이 중요하며 이는 비정상 정액검사 소견을 갖는 경우나 정상인 경우와 비교하여 회수율이 저하 정액이 정상인 경우와 비교하여 회수율이 저하되기 때문이며(2) 본 실험에서도 양군간의 처치

Table 6. Ultrastructural integrity of acrosomal segment (%)

	Normal	Ruptured	Acrosome-changed	Acrosome-lost
A-before filt.	62	12	21	5
after filt.	75	16	8	1
B-before filt.	54	13	17	16
after filt.	72	13	9	6
C-before filt.	31	19	36	14
after filt.	59	4	32	5
Average				
before filt.	49	14.7	24.7	11.7
after filt.	68.7	11	16.3	4

Table 7. IVF Results

	Abnormal Group	Normal Group
Number of eggs	55	110
Inseminated	53	102
Number of fertilized eggs	22(41.5%)	71(69.6%)
Number of cleaved embryos	20(90.9%)	64(90.1%)
Number of embryos transfered/ Number of pts.	16/4(4)	52/17(3.1)
Number of ongoing pregnancies	1	4

*ET rate : Abnormal group, 40%, Normal group, 89.5% (per OPU cycle)

*Pregnancy rate ; Abnormal group, 25%, Normal group, 23.5% (per ET cycle)

후 정자 회수율이 16.6% 및 35.9%로 유의한 차를 나타내었다. 그러나 양군간에 운동성 정자의 회수율에 유의한 차이가 없이 51.6%의 높은 회수율을 보였고, 특히 회수율이 문제가 되는 비정상군에서 평균 9.1×10^6 의 운동성 정자를 얻음으로써 glass-wool filtration 방법이 특히 oligoasthenozoospermia 환자들에서 유용하게 사용될 수 있음을 시사한다.

남자의 수정에 영향을 미치는 정자기능을 반영하는 여러 parameters 중 가장 중요한 것은 운동성이며, 이는 % motility와 grade motility로써 특히 active forward progression이 중요하게 작용한다. 또한 이들은 배아의 자궁내 이식 후 착상 및 그이후의 normal development와도 무관하지 않은 것으로 알려졌다. 본연구에서 양군의 % motility는 처치후 각각 78.6% 및 92.3%를 보여 원정액과 비교하여 각각 42.7% 및 28.5% 씩 증가되어 매우 유의한 수준으로 호전됨을 알 수 있었고, 처치후 전반적인 grade motility 또한 증가됨을 관찰하였다. 이 grade motility의 증가는 glass-wool filtration의 기전이 오직 gravity에 의한 것만이 아니고, percoll layer에 의한 centrifugation 방법등에서와 같이 자체의 운동능력 과도 관련이 있음을 시사한다(1,2).

이상과 같이 glass-wool filtration은 viable spermatozoa의 분리 외에도 seminal plasma 내에 contamination되어 있는 각종의 cellular 혹은 subcellular particles 등을 제거 할 수 있고 (6), 분리후 resuspension media의 양을 조절함으로써 sperm concentration을 임의로 조절할 수 있어 기왕에 많이 이용되어 온 swim-up 방법등과 비교하여 특히 자궁내 인공수정 (intrauterine insemination) 등에서 유리하다. 또한 glass-wool filtration은 swim-up 방법을 포함하여 여타의 방법들과 비교하여 조작과정의 간편성과 신속성이 장점이다.

Sherman 등(8)은 glass-wool 이 일부 정자의 head의 plasma membrane 이나 acrosome에 손상을 줄 가능성이 있다고 제의하고, 따라서 이에 관한 충분한 임상 연구가 필요함을 제기하였다. 본 실험에서 TEM을 이용한 정자의 미세구조를 관찰하고, Heath(9)등의 분류방법에 따른 비정상형 정자를 분류한 결과 처치후 오히려 정상 구조를 갖는 정자의 백분율이 증가함을 알 수 있었고, 또한 정자의 기능을 간접적으로 알 수 있는 sperm survival time을 측정 한 결과

glass-wool 처치후 차이가 없는 점으로 미루어 볼 때 glass-wool filtration이 정자의 미세구조나 기능에 해를 주지 않음을 알 수 있었다. 그러나 이제까지 알려진 어떤 방법으로도 사람에서 정자의 ultrastructure의 비정상 유무를 정확히 quantitation 하기는 용이하지 않으며, 따라서 흔히 발견되어지는 특징적인 이상을 기초로 하여 한 sample에서 가능한 많은 수의 정자를 count하고 이들을 서로 비교, 분류함으로써 믿을 수 있는 interpretation 이 가능하다.

정자 기능의 궁극적 요건은 수정능력인바, 여러 조작에 의하여 얻은 정자의 체외수정외의 이용은 특히 남성요인을 갖는 불임증에서는 매우 중요한 의미를 갖는다. 본 실험의 비정상군에서의 수정율은 41.5%로 아직도 정상군과 비교하여 현저한 차이를 보이며 따라서 배아 이식율도 상대적으로 낮으나, 수정난의 난분할율과 ET cycle 당 임신 성공율에 차이가 없음을 glass-wool filtration 이 viable spermatozoa 의 분리에 유효함을 시사한다.

이상으로 저자들은 특히 남성요인을 갖는 불임의 IVF 및 AI program에서 glass-wool filtration이 매우 유용하고 안전한 방법으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Gorus, F.K., Pipeleers, D.G. : *A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. Fertil. Steril.* 35 : 6, 662, 1981.
- 2) Kim, S.H., Ku, P.S., Hong, S.B. : 밀도율 원심법(Density Gradient Centrifugation)에 의한 운동성 정자의 선택적 농축. 대한불임학회 학술대회지, 1986.
- 3) Bangham, A.D., Hancock, J.L. : *A new method for counting live and dead bull spermatozoa, Nature* 176 : 656, 1955.
- 4) Paulson, J.D., Polackoski, K.L., Leto, S. : *Further characterisation of glass wool column filtration of human semen, Fertil. Steril.* 32 : 125, 1979.
- 5) Trifunac, N.P., Bernstein, G.S. : *Inhibition of the oxidative metabolism of human spermatozoa by a heat-labile factor in seminal plasma. Fertil. Steril.* 27 : 1295,

- 1976.
- 6) Paulson, J.D., Polakoski, K.L. : *A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate*. *Fertil. Steril.* 28 : 178, 1977.
 - 7) Jeyendran, R.S., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G. : *Concentration of viable spermatozoa for artificial insemination*. *Fertil. Steril.* 45 : 132, 1986.
 - 8) Sherman, J.K., Paulson, J.D., Liu, K.C. : *Effect of glass wool filtration on ultrastructure of human spermatozoa*. *Fertil. Steril.* 36 : 5, 643, 1981.
 - 9) Heath, E., Jeyendran, R.S., Perez-Pelaez, M., Sobrero, A.J. : *Ultrastructural categorization of human sperm crypreserved in glyserol and in TESTCY*. *Internat. J Andrology* 8 : 101, 1985.
 - 10) Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Al-Hassani, S., Diedrich, K. : *Separation of viable spermatozoa by standardised glass wool column*, *The proceedings of the 12th world congress on fertility and sterility, Singapore, October, 1986*.
 - 11) Tummerhoff, A., Van der Ven, H., Al-Hassani, S., Jeyendran, R.S. etc : *Effectiveness of various sperm preparation techniques for human in vitro fertilization*. (abstr.) *Proceedings of the first Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Bonn, F.R. Germany, 1985*. 12.
 - 12) Van der Ven, H., Tunnerhoff, A., Al-Hassani, S. etc : *Effectiveness of concentrating viable spermatozoa by two sperm separating techniques from normal and asthenozoospermic semen*. (abstr.) *J Andrology* 7 : D5, 1986.
-