

TEST-Yolk Buffer에 의한 인간 정자의 수정능 증진효과에 관한 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

방명걸 · 김기철 · 신창재 · 문신용 · 이진용 · 장윤석

Improved Fertilization Rate in Human *In vitro* Fertilization with the Use of a TEST-Yolk Buffer

Myung-Geol Pang, Ki Chul Kim, Chang-Jae Shin, Shin Yong Moon, Jin Yong Lee
and Yoon Seok Chang

Department of Obstetrics & Gynecology, College of Medicine, Seoul National University

= Abstract =

The present study was undertaken to clarify the role of TEST-Yolk Buffer(TYB) as a factor for the improvement of human sperm fertility potential. We examined the effects of low temperature capacitation using TYB on sperm motility(%), motility pattern, normal morphology, true acrosome reaction, sperm penetration assay and human in vitro fertilization.

Comparing the TYB method and swim-up method, the sperm motility(%) of selected sperm was not significantly different, but statistically significant differences were found in curvilinear velocity, linearity, lateral head displacement, normal morphology(%) and true acrosome reaction(%)($p < 0.05$).

Results obtained from the sperm penetration assay demonstrated that the penetration index and penetration rate were increased significantly($p < 0.05$) when the spermatozoa were incubated in TYB, as compared with swim-up method. And fertilization of intact human oocytes was more successful when spermatozoa were pretreated with TYB at 4°C for 48 hours as compared with swim-up method.

Our results show that TYB method have advantages in terms of enhancement of sperm hyperactivation, increased true acrosome reaction, increased ability to penetrate zona-free hamster ova and augmented fertilization of human oocytes, suggesting that TYB is superior in its ability to preserve sperm motility and fertilizing ability.

서 론

포유동물의 정자는 수정능 획득(capacitation)이라고 하는 일련의 생화학적 및 생물리학적 변화 과정을 거쳐야만 난자와의 수정능력을 부여받게 된다(Bedford, 1970). 수정능 획득이란, 정자가 침체반응 및 난자의 난황막과의 융합을

일으킬 수 있게됨을 말한다. 그러나 정자의 수정능 획득이란 개체에 따라 심한 개체차이를 보이며(Perreault & Rogers, 1982; 정등, 1988; 방등, 1988), 개인에서도 여러 생체내 및 생체의 인자들에 의해 좌우되므로(Rogers, 1985) 정자의 수정능 획득은 체내 및 체외수정의 성공률에 중요한 변수로 작용하게 된다.

정자의 수정능 획득 및 침체반응을 유발하거나 증진시킬 것으로 추측되는 여러 생리인자들이 제시되어 왔다. 정자의 수정능 획득은 인위

*본 연구는 1989년도 서울대학교병원 임상연구비의 보조로 이루어진 것임.

적으로 유발시킬 수 있는데, 전배양시간의 연장, 배양액의 이용, 알부민의 첨가, 삼투압이 높은 배양액에서의 배양, 전배양에서의 TEST-Yolk Buffer(이하 TYB라함) 사용 등이 그 범주에 속한다(Johnson et al., 1984; Rogers, 1985). 한편 정자의 수정능 획득이나 침체반응을 촉진시키는 물질인 glycosaminoglycans와 albumin을 모두 포함하고 있는 인간 난포액 역시 정자의 수정능 획득에 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며, 침체반응은 칼슘농도를 높이고 ionophore A 23187을 추가함으로써 유발시킬 수 있다고 보고되었다(Tesarik, 1985; Yee & Cummings, 1988).

인간에 있어 남성의 수정능력 및 수정능획득을 연구하는 한 방법인 Sperm Penetration Assay(이하 SPA라 함)에서 정자 처리시 TYB를 이용하는 Low Temperature Capacitation(이하 LTC라 함) 방법을 이용함으로써 기존의 swim-up방법보다 투명대 제거 햄스터 난자에 대한 정자의 침투 능력을 증진시킨다고 보고되었다(Balanos et al., 1983; Chang et al., 1990; 신과 장, 1990). 즉 TYB는 정자의 수정능획득을 극대화 시키므로 SPA의 이용가치를 증진시키고 있다(Johnson et al., 1990).

이와같은 결과를 인간 난자의 체외수정기술에서도 얻을 수 있을 것으로 기대가 되나, 인간 난자는 난구세포와 투명대가 존재하는 상태에서 체외수정을 시키며, 햄스터 난자는 난구세포는 물론 투명대까지 제거한 상태에서 정자와 결합을 시키고 있기 때문에 확실히 똑같은 효과를 기대할 수 있는지는 알수가 없다(Katayama et al., 1989).

이러한 관점에서 본 연구는 TYB가 어떠한 기전으로 정자의 수정능력을 향진시켜 햄스터 난자 침투율을 높이는가에 대한 지식을 얻고자 TYB를 이용한 LTC방법으로 정자를 처리한 후(처리군), 정자의 운동성, 운동성 양상, 정상 형태율 및 침체반응을 분석하였으며, 인간의 체외수정에 있어서 정자에 대한 TYB의 영향을 swim-up방법을 대조군으로 하여 수정율을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험 설계

가임남성 10명을 대상으로 정액을 swim-up 방법(대조군)과 LTC방법(처리군)으로 처리하여 정자의 운동성, 형태, 침체반응 및 SPA 등

의 기초 실험을 시행하였으며, 이 결과를 서울대학교병원 불임클리닉에서 체외수정기술을 시행하는 환자에 적용하여 대조군과 처리군의 수정율을 비교 분석하였다.

2. 연구 재료

1) 실험동물: 생후 8주내지 12주사이의 Golden hamster를 SPA에 사용하였다.

2) 정자의 선택: 최근 2년 이내에 임신시킨 경험이 있는 10명의 공여자와 서울대학교병원 불임클리닉에서 체외수정기술을 시행하는 환자 17명으로 부터 2-5일간의 금욕기간을 가진 후 제공받았으며, swim-up군은 실험 당일, LTC군은 실험 48시간 전에 채취된 정액을 사용하였다.

3. 연구 방법

1) 정액분석

살균처리된 일회용 100ml polypropylene용기에 채취된 정액을 상온에서 30분간 방치하여 액화를 시킨 후 및 swim-up과 LTC방법으로 처리한 다음 그중 10 μ l를 37 $^{\circ}$ C로 미리 예열된 Makler sperm counting chamber에 놓은 후 CTS-60/200 system(Motion Analysis Corporation, U.S.A.)를 이용하여 정자의 농도, 정자의 운동성(%), 운동성 양상을 분석하였다. 운동성 양상을 측정하는 항목으로 Curvilinear velocity(이하 VCL이라 함), Linearity(이하 LIN이라 함), Lateral head displacement(이하 ALH라 함)등을 분석하였다. 정자의 정상 형태 분석과 침체반응을 관찰하기 위해 Didion등(1989)의 이중 염색법을 이용하여 시행하였으며, 정자의 침체반응 판정은 살아있으면서 침체를 손실한 정자만을 실제 침체반응으로 판정하였다. 정상 정자형태율(%)은 WHO기준에 의거하여 분석하였다.

2) 정액의 처리

정액 처리는 대조군의 경우 본 연구실에서 체외수정기술시 사용하는 swim-up방법(방, 1990)으로, 처리군의 경우 SPA시행시 사용하는 LTC방법(신과 장, 1990; 김등, 1991)에 의거하여 시행하였다. 대조군은 정액검사를 시행한 후 37 $^{\circ}$ C의 Insemination Media(Ham's F-10+7.5% 태아 제대혈청, 이하 IM이라 함) 3ml로 2회 세척(200 \times G, 10분)한 후 정자괴(sperm pellet)에 0.5-1.0ml의 IM을 추가한다. 그후 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 2시간 swim-up후 상층액만 모아 사용하였다. 처리군은 정액을 TYB(표

Table 1. Composition of TEST-Yolk Buffer(TYB)

TES(N-hydroxymethyl-methy-2-aminoethane sulfonic acid)	211mM
Tris(hydroxymethyl-aminoethane)	96mM
Dextrose	11mM
Streptomycin	0.0050g/100ml
Penicillin	0.0075g/100ml
Fresh Egg Yolk	20% v/v

500ml batches of TYB can be prepared, centrifuged(6,000xG, 30min), filtered and stored frozen (-20°C) in 3-ml fractions.

1)와 용량비 1:1로 천천히 혼합하고 4°C까지 서서히 온도를 하강시킨 다음 4°C에서 48시간 동안 저온 배양한 후 37°C의 IM 3ml로 2회 세척(200xG, 10분)한후 swim-up방법과 동일한 방법으로 처리하였다.

3) SPA

Swim-up방법과 LTC방법에 의거하여 얻어진 정자를 신과 장(1990)의 방법에 의하여 SPA를 시행하였으며 이때 정자의 두부가 팽창(enlargement of sperm head)되었거나 남성전핵이 보이며 해당정자의 미부가 난자세포질내에서 식별될 때 정자가 난자내로 침투된 것으로 간주하였다. 전예에서 정자의 난자 침투도는 난자 침투율(정자가 한개 이상 침투된 난자수/수정시킨 총 난자수) 및 난자 침투지수(침투된 총 정자수/수정시킨 총난자 수)로서 나타났다.

4) 체외수정시술

서울대학교병원 불임클리닉에서 난관에 의한 불임으로 체외수정 및 배아의 자궁내이식 시술(체외수정시술)을 받는 17명의 환자를 대상으로 FSH/hMG를 이용하여 과배란을 유도하였으며, hCG주사후 35시간에 질식 초음파를 이용하여 난자를 채취하였다. 채취된 난자의 성숙도를 판정한 후 동수로 나누어 swim-up방법과 LTC방법에 의해 얻어진 정자로 각각 수정을 시켰으며, 수정 후 약 44시간에 수정율(%)을 각각 비교하였다. Swim-up군은 시술 당일, LTC군은 시술 48시간 전에 채취된 정액을 사용하였다.

5) 통계 처리

위에서 얻어진 결과는 SPSS/PC+ 통계 패키지를 이용하여 one-way ANOVA와 T-test로 통계 처리 및 유의성 검정을 하였으며, $p < 0.05$ 를 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 대조군과 처리군의 운동성(%) 및 운동성 양상 분석

10명의 가임 남성군에서의 정액 처리시 CTS -60/200 system을 이용하여 측정된 대조군과 처리군의 운동성(%) 및 운동성 양상 분석 결과는 표 2와 같다. 운동성에 있어서는 대조군 및 처리군 모두가 액화 직후의 신선정자에 비해 유의하게 향상되었으며, 대조군(77.3%)과 처리군(77.2%) 사이에는 차이가 없었다. Curvilinear velocity에서는 대조군 및 처리군 모두 신선정자의 속도에 비해 유의하게 증가되었으며, 대조군(86.8 μ m/sec)에 비해 처리군(99.6 μ m/sec)의 속도가 더 증가되었다. Linearity에서는 대조군(58.4)만이 신선정자군(49.9) 및 처리군(51.7)에 비해 증가되었다. Lateral head displacement에서는 신선정자군에 비해 대조군 및 처리군에서 현저히 증가되었으며, 대조군(3.5 μ m)과 처리군(4.1 μ m)사이에서도 통계학적으로 유의한 차이가 인정되었다($p < 0.05$).

2. 대조군과 처리군 정자의 정상 형태율(%), 실제 침체 반응율(%) 및 정자침입 분석

이중 염색법에 의한 대조군 및 처리군 정자의 정상 형태율과 실제 침체반응율에 대한 분석 결과와 햄스터 난자를 이용한 정자 침입 결과는 표 3과 같다. 정상 정자형태 백분율은 신선정자군에 비해 대조군과 처리군에서 모두 현저하게 향상되었으며, 대조군이 78.4%였고 처리군이 92.2%로 두군간에 유의한 차이가 있었다. 정자의 실제 침체 반응율(%)은 신선정자군에 비해 대조군(15.1%)은 3배, 처리군(24.2%)은 5배 증가하였으며, 대조군과 처리군 사이에 유의한 차이가 있었다. 정자의 수정능력

Table 2. Results of Sperm Motility(%), Curvilinear Velocity(VCL), Linearity(LIN) and Lateral Head Displacement(ALH) in the Fresh Ejaculates and after Sperm Processing Techniques^a

	Motility	VCL	LIN	ALH
	%	$\mu\text{m}/\text{sec}$		μm
Fresh	63.0 \pm 8.9	74.3 \pm 15.3	49.9 \pm 8.8	3.0 \pm 0.5
Control	77.3 \pm 8.2*	86.8 \pm 13.4*	58.4 \pm 4.8*	3.5 \pm 0.4*
Treatment	77.2 \pm 8.5*	99.6 \pm 11.5**	51.7 \pm 2.5	4.1 \pm 0.4**

* p<0.05, ^a Values are means \pm SEM

Table 3. Results of Sperm Morphology, True Acrosome Reaction(TAR) and Sperm Penetration Assay after the Swim-up(Control group) and Low Temperature Capacitation(Treatment group) Procedure^a

	Morphology	TAR ^b	SPA	
			SPR ^c	SPI ^d
	%	%	%	
Fresh	58.2 \pm 6.2	5.1 \pm 1.8		
Control	78.4 \pm 4.0*	15.1 \pm 3.3*	85.0 \pm 20.7	1.8 \pm 0.3
Treatment	92.2 \pm 1.0**	24.2 \pm 3.9**	100.0 \pm 00.0*	10.7 \pm 3.4*

* p<0.05, ^a Values are means \pm SEM, ^b True Acrosome Reaction:Live Sperm with Detached Acrosome, ^c Sperm Penetration Rate(%):No. of Sperm Penetrated Oocyte/No. of Inseminated Oocyte, ^d Sperm Penetration Index:No. of Penetrated Sperm/No. of Inseminated Oocyte.

Table 4. Effect of Sperm Preparation Procedures on Human In Vitro Fertilization^a

Sperm Preparation	Maturity at Collection	No. of Oocyte	No. of Cleaved Oocyte	Fertilization Rate(%)
Control	Intermediate (8)	24	15	60.0 \pm 12.5
Treatment	Intermediate (8)	28	24	83.1 \pm 17.1*
Control	Preovulatory (17)	73	54	82.4 \pm 20.5
Treatment	Preovulatory (17)	66	59	96.4 \pm 6.7*

*p<0.05, ^a Values are means \pm SEM; values in parentheses are no. of case

을 검사하는 방법인 햄스터 난자 침투 실험에서 다른 두 조건하에서의 평균침투지수는 처리군에서 10.7로서 대조군에서의 1.8에 비해 약 6배 증진된 난자침투효과를 보였으며, 평균침투율(%)에서도 처리군에서 100%로 대조군에서의 85%에 비해 1.2배의 유의한 침투증진효과를 나타냈다(p<0.05).

3. 체외수정시술시 대조군 및 처리군 정자의 수정율(%) 비교

서울대학교병원 불임클리닉에서 난관에 의한 불임으로 체외수정 및 배아이식 시술을 받는 17명의 환자를 대상으로 과배란을 유도한 후 난자를 채취하였고, 채취된 난자의 성숙도를 판정한 후, 성숙도에 따라 난자를 동수로 나누

어 대조군과 처리군의 방법에 의해 얻어진 정자로 각각 수정을 시켰으며, 그 결과는 표 4와 같다. 채취시 난자의 성숙도가 중간정도였을 경우, 수정율에 있어서 대조군(60.0%)에 비해 처리군에서 83.1%로 매우 높았다. 채취시 성숙이 완전히 진행된 경우의 수정율도 대조군(82.4%)에 비해 처리군(96.4%)에서 유의하게 높았다(p<0.05).

고 찰

포유동물의 정자는 수정능 획득(capacitation)이라고 하는 일련의 생화학적 및 생물리학적 변화과정을 거쳐야만 난자와의 수정능력을 부여받게 된다(Bedford, 1970). 수정능 획득

이란, 정자가 침체반응 및 난자의 난황막과의 융합을 일으킬 수 있게 됨을 말한다. 정자의 수정능 획득 및 침체반응을 유발하거나 증진시킬 것으로 추측되는 여러 생리인자들이 제시되어 왔다. 정자의 수정능 획득은 인위적으로 유발시킬 수 있는데, 전배양시간의 연장, 배양액의 이용, 알부민의 첨가, 삼투압이 높은 배양액에서의 배양, 전배양에서의 TYB사용 등이 그 범주에 속한다(Johnson et al., 1984; Rogers, 1985). 한편 정자의 수정능 획득이나 침체반응을 촉진시키는 물질인 glycosaminoglycans와 albumin을 모두 포함하고 있는 인간난포액 역시 정자의 수정능 획득에 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며, 침체반응은 칼슘농도를 높이고 ionophore A 23187을 추가함으로써 유발시킬 수 있다고 보고되었다(Tesarik, 1985; Yee & Cummings, 1988).

인간의 체외수정은 다른 포유동물에 비해 상대적으로 높은 수정율을 보이는 반면, 배아 이식후 임신율이 낮으며, 몇몇 환자에 있어서는 수정이 전혀 일어나지 않거나 낮은 수정율을 보이고 있다. 이 원인은 비정상 정자에 의한 수정에 기인한다고 생각되고 있다(Marrs et al., 1984). 임신의 확률을 증가시키기 위하여서는 수정시키는 정자의 질을 먼저 개선하여야 할 것이다. 그러므로 성공적인 수정의 기회를 증가시킬 수 있는 방법의 개발이 절실하다. 이러한 관점에서 볼때 TYB를 이용하는 LTC방법은 현재 완벽한 정자 처리법이라고 말할 수는 없지만 본 연구의 결과를 분석해 볼 때 swim-up 방법에 비해 수정의 기회를 높여 주는 방법임에는 의심할 여지가 없다. Katayama 등(1989)은 7명의 환자를 대상으로 swim-up방법과 LTC방법으로 처리된 정자를 이용한 체외수정에 관한 연구에서 2명의 환자에서는 동일한 수정율을, 5명의 환자에서는 LTC방법에서 매우 높은 수정율을 얻었으며 이 5명의 환자중 3명은 swim-up방법에서 전혀 수정이 일어나지 않았으나 LTC방법에서는 3명 모두 60% 이상의 수정율을 얻을 수 있었다고 보고하였다.

TYB가 어떠한 기전으로 정자의 수정능력을 향진시키는지에 대해서는 잘 이해되고 있지 않다. Bielfeld 등(1989)에 의하면 TYB를 이용하여 배양된 정자가 TYB를 이용하지 않은 정자보다 많은 수가 자발적으로 침체반응하였다고 보고하였다. 침체 반응된 정자 비율의 증가는 TYB처리가 더 높은 비율로 정자의 수정능 획득

을 야기하거나, 수정능 획득을 좀더 효율적으로 야기시킨다는 사실을 시사할 수 있다. 본 실험의 결과에서 보면 TYB에서 48시간 저온배양한 SPA에서는 기존의 swim-up방법에 비해 6배 높은 난자침투지수 및 1.2배 높은 난자침투율을 나타냈으며, 이는 TYB를 이용한 정자의 전배양방법이 swim-up방법보다 침체반응을 일으킨 정자를 더 많이 산출할 수 있는 방법임을 시사해 준다. 또한 Moubasher 등(1985)에 의하면 TYB는 정자의 cholesterol/phospholipid 비율을 감소시킨다고 보고하였다. 이와 같은 cholesterol의 감소는 정자막의 cholesterol을 고갈시키므로 수정능 획득을 증진시키는 것으로 생각된다(Langlais & Roberts, 1985). 본 실험에서 이중염색법에 의해 침체 반응을 분석한 결과에서도 Bielfeld 등(1989)의 결과와 같은 양상으로 swim-up방법에 비해 TYB를 이용한 LTC방법에서 유의하게 높은 침체 반응율과 정상형태율을 얻을 수 있었다. SPA와 체외수정에 있어서도 LTC방법에서 수정율이 유의하게 높았는데 이는 정자의 높은 침체 반응율과 정상형태율에 기인하는 것으로 사료된다. 그러므로 체외수정 및 배아 이식술의 임상적 가치를 극대화시키려면 정자처리후 수정능을 획득한 정자의 비율을 극대화시키는 방법으로 정자처리가 되어야 함과 동시에, 난자와 함께 배양시키는 과정에서도 수정율을 극대화시키는 조건이 부여되어야 한다.

침체반응은 정자의 수정능 획득의 완료를 시사하는 신호로 인식되고 있으며(Yanagimachi, 1988), 정자 운동성의 Hyperactivation(이하 HA라함)은 수정능 획득의 필수조건으로 보고되고 있다(Chang, 1984; Bedford, 1983). Burkman(1984)과 Mortimer 등(1984)은 인간의 체외수정술에 있어서 HA를 관찰하였는데, 그 결과에 의하면 남성 불임군 정자의 HA가 가임남성군 정자의 HA에 비해 유의하게 낮았으므로 HA가 정자의 수정능을 어느정도 반영할 수 있음을 시사하였다. Coddington 등(미발간 자료)에 의하면 HA가 낮은군의 수정율 및 인간투명대와의 결합정도는 HA가 높은군에 비해 유의하게 낮았다고 보고하였으며, 이로써 정자의 HA가 수정율과 직접적인 관계가 있음을 시사하였다. Burkman(1991)은 Computerized motion analyzer를 이용하여 HA의 기준을 $VCL \geq 100$, $LIN \leq 65$, $ALH \geq 7.5$ 로 설정하였다. 본 실험에서 운동성 분석 결과에서 LTC방법이

swim-up방법에 비해 VCL, LIN 및 ALH의 평균치가 Burkman (1991)이 설정한 HA기준에 보다 가까운 수치를 나타내서, LTC방법이 HA를 야기하는데 더 유리한 방법임을 시사하였다. SPA와 체외수정에 있어서도 LTC방법에서 수정율이 유의하게 높았는데 이는 정자의 높은 HA발현율에 기인하는 것으로 사료된다.

또한 포유동물의 성공적인 수정은 난자의 성숙도 뿐만 아니라 적절한 정자수와 운동성에 의하여 크게 영향을 받는 것으로 알려져 왔고 (Mahadevan & Trounson, 1984), 실제로 인간에 있어서 인공수정, 생식세포 난관내 이식 및 체외수정시 양질의 운동성 정자를 획득하는 것이 매우 중요시 되어왔다. 본 연구에서 정자운동성(%)은 TYB에서 48시간 저온배양을 시행했음에도 불구하고 swim-up방법에 비해 차이를 발견할 수 없었는데, 이는 TYB가 정자의 운동성을 잘 보존하는 것으로 이해될 수 있다.

결론적으로 TYB는 정자의 운동성(%)을 잘 유지시키며, HA를 높게 야기시키고, 높은 정상 형태 정자의 회수율과 높은 침체 반응율을 야기시키므로 정자의 수정능력을 증진시켜 SPA 및 인간의 체외수정에 있어서 좋은 결과를 산출할 수 있었을 것으로 사료된다. 또한 TYB를 이용하는 방법은 인공수정 및 체외수정시술시, 시술당일 남편의 사정으로 인해 정액채취가 불가능 할때, 정액을 미리 채취하여 4일간 정자의 수명 및 수정능을 유지시킬 수 있으며, 무력 정자증이나 정자 감소증 환자에 있어서 정액을 2-3회 미리 모아서 시술에 사용할 수 있는 두가지 장점이 있다. 그러나 TYB가 수정능력이 전혀 없거나, 정자무력증, 회소정자증 및 기형 정자증 등을 가지는 남성 불임증에서 수정능력을 보다 더 향상시킬 수 있는가에 대하여는 좀더 폭넓은 연구가 시행되어야 할 것이다.

결 론

본 연구가 TYB가 어떠한 기전으로 정자의 수정능력을 향진시켜 햄스터 난자 침투율을 높이는가에 대한 지식을 얻고자 TYB를 이용한 LTC방법으로 정자를 처리한 후(처리군), 정자의 운동성, 운동성 양상, 정상 형태율 및 침체 반응율을 분석하였으며, 인간의 체외수정에 있어서 정자에 대한 TYB의 영향을 swim-up방법을 대조군으로 하여 수정율을 비교 분석하여

다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 운동성에 있어서는 대조군 및 처리군 모두가 액화 직후의 신선정자에 비해 유의하게 향상되었으며($p < 0.05$), 대조군(77.3%)과 처리군(77.2%)사이에는 차이가 없었다.

2. VCL에서는 대조군 및 처리군 모두 신선정자의 속도에 비해 유의하게 더 증가되었으며, 대조군($86.8\mu\text{m}/\text{sec}$)에 비해 처리군($99.6\mu\text{m}/\text{sec}$)의 속도가 더 증가되었다. LIN에서는 대조군(58.4)만이 신선정자군(49.9) 및 처리군(51.7)에 비해 증가되었고, ALH에서는 신선정자군에 비해 대조군 및 처리군에서 현저히 증가되었으며, 대조군($3.5\mu\text{m}$)과 처리군($4.1\mu\text{m}$)사이에서도 통계학적으로 유의한 차이가 인정되었다($p < 0.05$).

3. 정상 정자형태 백분율은 신선정자군에 비해 대조군과 처리군에서 모두 현저하게 향상되었으며, 대조군이 78.4%였고 처리군이 92.2%로 두 군간에도 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$).

4. 정자의 실제 침체 반응율(%)은 신선정자군에 비해 대조군(15.1%)은 3배, 처리군(24.2%)은 5배 증가하였으며, 대조군과 처리군 사이에 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$).

5. 정자의 수정능력을 검사하는 방법인 햄스터 난자 침투 실험에서 두조건하에서 평균침투지수는 처리군에서 10.7로서 대조군에서의 1.8에 비해 약 6배 증진된 난자침투효과를 보였으며, 평균침투율(%)에서도 처리군에서 100%로 대조군에서의 85%에 비해 1.2배의 유의한 침투증진효과를 나타냈다($p < 0.05$).

6. 채취된 인간난자의 성숙도를 판정한 후, 성숙도에 따라 난자를 동수로 나누어 대조군과 처리군의 방법에 의해 얻어진 정자로 각각 수정을 시켰을때, 채취시 난자의 성숙도가 중간 정도였을 경우, 수정율에 있어서 대조군(60.0%)에 비해 처리군에서 83.1%로 매우 높았다. 채취시 성숙이 완전히 진행된 경우의 수정율도 성숙도가 중간정도였던 난자와 같은 양상을 보여 대조군(82.4%)에 비해 처리군(96.4%)에서 유의하게 높았다($p < 0.05$).

인 용 문 헌

Bedford JM: Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod(Suppl)*, 1970, 2, 128.

Bedford JM: Significance of the need for sperm

- capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol Reprod*, 1983, 28, 108.
- Bielfeld P, Jeyendran RS, Zaneveld LJD: Effect of TEST-yolk on the human sperm acrosome reaction. *J Androl (Abstr)*, 1989, 10, 40p.
- 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, 536.
- Burkman LJ: Characterization of hyperactivation motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic sperm population. *Arch Androl* 1984, 13, 153.
- Burkman LJ: Discrimination between nonhyperactivated and classical hyperactivated motility patterns in human spermatozoa using computerized analysis. *Fertil Steril*, 1991, 55, 363.
- Chang MC: The meaning of sperm capacitation; a historical perspective. *J Androl*, 1984, 5, 45.
- Chang YS, Lee JY, Moon SY, Kim JG, Pang MG, Shin CJ: Factors affecting penetration of zona-free hamster ova. *Arch Androl*, 1990, 25, 213.
- 정영채, 김창근, 주일영, 정길생, 이규승, 윤종택, 방명걸: 우 난포란과의 체외수정에 의한 한우 종모우의 수정능력 평가에 관한 연구. 유전공학연구 1988, 1, 23.
- Coddington CC, Franken DF, Burkman LJ, Osthuizen WT, Kruger TF, Hodgen GD: Functional aspects of human sperm binding to the zona pellucida using the hemizona assay. *J Androl*, In press.
- Didion BA, Dobrinsky JR, Giles JR, Graves CN: Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res*, 1989, 22, 51.
- Johnson AR, 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. Florida: CRC Press, 1990, pp135.
- 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.
- 김석현, 방명걸, 신창재, 김정구, 문신용, 이진용, 장윤석: 한국인 남성을 대상으로 한 햄스터 난자 침투 분석법의 정상 가임역 설정. 대한불임학회지, 1991, 18, 63.
- Katayama KP, Stehlik E, Roesler M, Jeyendran RS, Holmgren WJ, Zaneveld LJD: Treatment of human spermatozoa with an egg yolk medium can enhance the outcome of vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1989, 52, 1077.
- Langlais J, Roberts KD: A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res*, 1985, 12, 183.
- Mahadevan MM, Trounson AO: The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1984, 42, 400.
- Marrs RP, Saito H, Yee B, Sato F, Brown J: Effect of variation of in vitro culture techniques upon oocyte fertilization and embryo development in human in vitro fertilization procedures. *Fertil Steril*, 1984, 41, 519.
- Motimer D, Courtot AM, Giovangrandi Y, Jeulin C, David S: Human sperm motility after migration into, and incubation in, synthetic media. *Gamete Res*, 1984, 9, 131.
- 방명걸: 수정을 위한 정자의 처리. Proceeding of the first annual review course on assisted reproductive technology, Seoul, 1990, pp103.
- 방명걸, 정영채, 김창근: 토끼에 있어서 체외수정과 수정란 이식에 관한 연구. 유전공학연구, 1988, 1, 31.
- Perreault SD, Rogers BJ: Capacitation pattern of human spermatozoa. *Fertil Steril*, 1982, 38, 258.
- Rogers BJ: The sperm penetration assay: its usefulness reevaluated. *Fertil Steril* 1985, 43, 821.
- 신창재, 장윤석: 인간정자의 수정능 부여 및 햄스터 난자 침투에 영향을 주는 인자들에

관한 연구. 대한산부회지, 1990, 33, 954.

Tesarik J: Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore a 23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J Reprod Fertil*, 1985, 74, 383.

Yanagimachi R: Mammalian fertilization. In

Knobil E, Neill JD eds. The physiology of reproduction. New York: Raven Press, 1988, pp135.

Yee B, Cummings LM: Modification of the sperm penetration assay using human follicular fluid to minimize false negative results. *Fertil Steril*, 1988, 50, 123.