

Computerized Sperm Motility Analyzer를 이용한 Human Sperm의 Hyperactivated Motility의 객관적 관찰에 관한 연구

고려대학교 의과대학 산부인과학교실

이희경 · 이찬 · 김현숙 · 김영태 · 김선행 · 구병삼

Objective Identification of Human Sperm Hyperactivation by Computerized Sperm Motion Analysis

Hee-Kyung Lee, M.D., Chan Lee, Hyun-Sook Kim, M.S., Young-Tae Kim,
Sun-Haeng Kim, M.D. and Pyoung-Sahm Ku, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Medical College, Korea University, Seoul, Korea

= Abstract =

The occurrence and time course of capacitation, acrosomal loss, and hyperactivated motility require quantitative definition in order to characterize fertile human sperm. Recently the method has been developed to estimate the quality of spermatozoa by using kinematic parameters such as curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), linearity (LIN), straightness (STR), amplitude of lateral head displacement (ALH), and beat cross frequency (BCF) from Computer Assisted Sperm Analysis (CASA).

In this study, using the Hamilton Thorn motility analyzer HTM 2030 (Hamilton Thorn Research, Beverly, MA), we attempted to identify the spermatozoa with hyperactivated motility (HA) objectively and to monitor hyperactivation of human spermatozoa during incubation in capacitating media and after treatment of calcium ionophore as compared with acrosome status. And we examined whether HA are related to the result of SPA.

Semen samples obtained from 16 healthy men were prepared by swim up technique and preincubated in a capacitating media (modified BWW medium) for 5 hours and treated with calcium ionophore solution. The acrosome reaction was detected with PSA-FITC labelling of the acrosome and in vitro sperm fertilizing capacity was assessed by the zona free hamster ovum penetration assay (SPA).

The incidence of hyperactivated sperm was 2.6% in fresh semen, 14.3% of the swim up population, 13.7% after 5h of incubation. Significant increase of percentage of hyperactivated sperm was observed after the incubation ($p < 0.05$) but after treatment, no significant changes of percentage of hyperactivated sperm (11.8%) in contrast to significant rise in the percentage of acrosome reacted cells. Correlation analysis failed to show any significant relationship between the percentage of sperm with HA and SPA score.

In conclusion, although no direct correlations were found between the results of SPA and HA, hyperactivation of sperm is associated with capacitation and monitoring hyperactivated sperm will be expected as a method of evaluating the functional quality of sperm such as SPA.

서 론

남성정자의 수정능력의 선행조건은 정자 자체의 수정능 획득(capacitation)과 첨체반응(acrosome reaction)이다. 포유동물의 정자는 첨체반응 및 난자와 수정할 수 있는 능력을 얻기 이전에 자성생식수관에서의 수정능 획득(capacitation)이라는 일련의 생화학적 및 생물리학적 변화과정을 거쳐야만 난자와의 수정능력을 부여받게 된다(Bedford, 1970; Chang, 1951). 정자운동성의 Hyperactivation(이하 HA라고함)은 수정능 획득의 필수조건이며(Bedford, 1983), Yanagimachi(1988)는 수정능 획득의 마지막단계에서 정자의 HA가 일어나며, 첨체반응은 정자의 수정능 획득의 완료를 시사하는 신호라고 보고하였다.

일상적으로 시행되는 기본적인 정액 검사로는 해당 남성정자의 생식능력에 포함되는 수정능 획득을 반영하지는 못한다. 수정능 획득은 첨체반응과는 달리 형태학적인 변화를 보이지 않으며 현재까지 알려진 수정능 획득의 생물학적 검사법으로는 zone free hamster ovum penetration test나 zone binding test가 있으나 과정이 복잡하고, 실험간의 변이와 정도관리 부재 및 많은 비용과 시간등의 문제점을 가지고 있으므로 일상적(routine)으로 사용하기는 어려운 검사법이다.

인간정자의 운동성은 그 속도와 양상에 따라 자궁경관내의 침투, 또는 Sperm Penetration Assay(이하 SPA라고함) 및 체외수정의 결과와 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Zaini et al., 1985; Liu et al., 1988).

Yanagimachi등(1969)은 동물실험에서 spermatozoa를 단기 배양한 후 나타나는, 운동양상이 진행성이 적고 진폭이 크고 힘찬 반복성의 편도의 파동운동을 관찰하였고, 또한 이러한 현상은 in vivo에서 수정능 부여현상과 관련이 있음을 발견하였다(Yanagimachi, 1970).

Burkman(1984)와 Mortimer(1984)등에 의해 인간정자에서도 배양액에서 정자의 운동성이 hyperactivated되는 것이 처음으로 관찰되었고 또한 남성 불임군 정자의 HA가 가임 남성군 정자의 HA에 비해 유의하게 낮았으므로 HA가 정자의 수정능을 어느정도 반영할 수 있음을 시사하였다.

이미 오래전부터 정자의 운동성을 객관적으

로 측정하고자하는 많은 시도가 있었으며 최근 들어와 새로운 computerized image analysis system이 개발되어 정자운동성의 객관적분석에 유용하게 사용되고 있으며 이러한 분석기로 정자의 수정능획득의 선행조건인 HA를 측정함으로써 정자기능 평가에 이용하려는 시도가 이루어지고 있다.

여러연구자들이 이러한 Computerized Assisted Sperm Analyzer(CASA) system을 이용하여 생식능력이 입증된 남성정자를 대상으로 나름대로 배양법을 거쳐 얻어진 정자군으로 Curvilinear velocity(VCL), Stright line velocity(STR), Linearity(LIN), Amplitude of lateral head displacement(ALH), Beat cross frequency(BCF)등 여러가지 운동성 척도로써 HA를 특징적으로 기술하였는데(Burkman, 1984, 1986a, b, 1991; Mortimer et al., 1984; Okada et al., 1985; Morales et al., 1988; Katz et al., 1989; Robertson et al., 1988; Mack et al., 1988; Mortimer et al., 1990; Grunert et al., 1990) 이들의 기준은 연구자마다 운동성 척도의 수치상에 차이가 있지만 HA를 나타내는 비율이 각 남성마다 어느 일정한 수치를 보이고 있고, 이러한 현상은 남성측 생식력 또는 정자의 수정능과 정비례한다고 보고되었다.

본 연구는 16명의 건강한 남성을 대상으로 Hamilton Thorn Motility Analyzer HTM 2030 (Hamilton Thorn Research, Beverly, MA)를 이용하여 hyperactivated motility의 특징을 갖는 정자(spermatozoa)를 객관적으로 관찰하며 capacitating media에서 배양한 후 HA의 변화 및 HA에 대한 calcium ionophore의 영향과 수정능 획득의 생물학적 검사법인 SPA와의 관계를 알아보고, HA의 수정능 획득 측정방법으로써의 유용성을 알아보려 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 재료

1) 정자의 선택

16명의 생식 능력이 입증된 건강한 남성으로 부터 3일간의 금욕기간을 가진 후 제공받은 정액을 사용하였다.

2) 실험동물

SPA를 위해 생후 8내지 12주 사이의 Golden hamster 암컷을 사용하였으며 매 12시간마다 명암에 노출시켜 환경에 적응시키고 복강

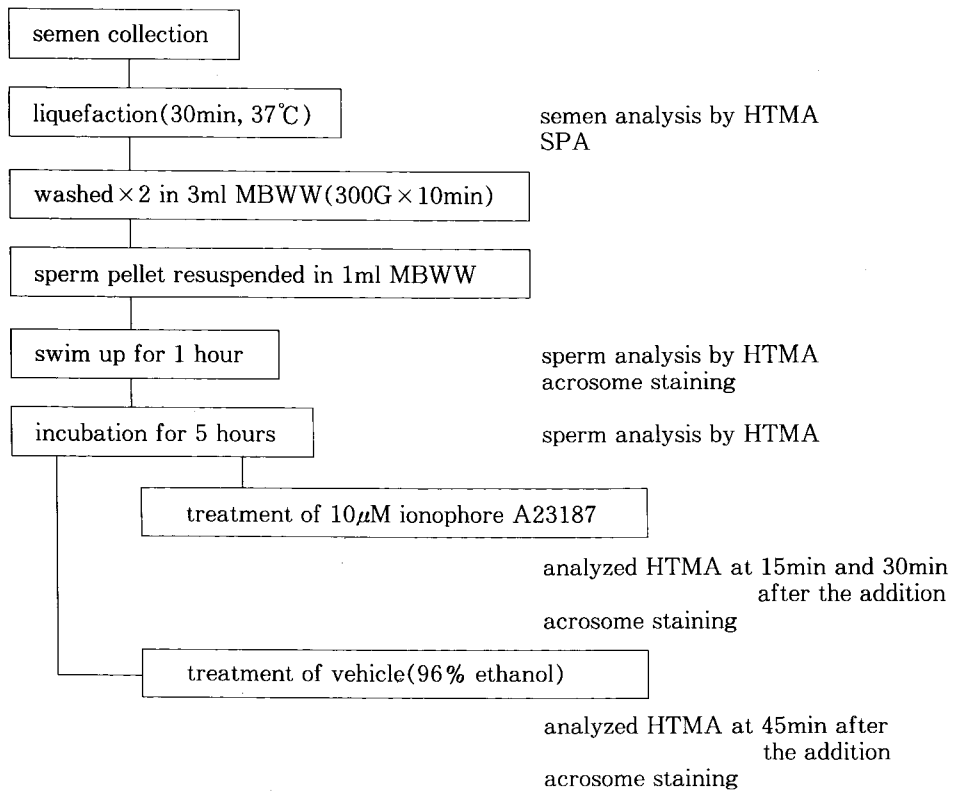


Fig. 1. Design of the experiment.

내 PMSG 351.U.를 주사한 후 52-56시간에 hCG 351.U.를 주사하여 과배란을 유도하였다.

2. 연구 방법

1) 정액의 처리(그림 1)

16명의 생식 능력이 입증된 건강한 남성으로 부터 제공받은 정액을 실온에서 30분간 방치하여 액화시킨 직후에 그중 10 μ l를 취하여 37°C로 미리 예열된 Makler counting chamber에 놓은 후 Hamilton-Thorn Motility Analyzer HTM-2030(HTMA, Hamilton-Thorn Research, Beverly, MA)를 이용하여 정액검사를 실시하고, 그중 1ml을 취하여 3ml의 modified BWB medium(이하 MBWW라 함. Biggers, 1971)과 혼합하여 2회 세척(300 \times G, 10분)한 후 정자괴(sperm pellet)에 1ml MBWW를 추가하고 이것을 5% CO₂, 37°C 배양기에서 1시간 swim up후 상층액만을 모았다. 일부상층액 (250 μ l)으로는 HTMA로 운동성을 분석하고 침체반응염색(acrosomal staining)을 실시하고, 나머지상층액은 다시 5% CO₂, 37°C 배양기에서 5

시간 배양 후 운동성을 측정하였다. 나머지 5 시간동안 전배양한 정액을 일부는(250 μ l) 10 μ M A23187(1.23 μ l of 2mM A23187 in 96% ethanol)로 처리하여 각각 15분, 30분에 나머지는(250 μ l) A23187이 없는 1.25 μ l의 96% ethanol로만 처리한 후 45분에 HTMA로 운동성을 분석하였으며 또한 A23187처리한 군과 하지않은 군 모두 침체반응 염색도 실시하였다.

2) 정액의 운동성 분석

채취된 정액을 상온에서 30분간 방치하여 액화 시킨 직후 및 swim up후, 배양액에서 5시간 배양후, Ca ionophore 처리 및 vehicle로 처리한 후, 각단계마다 HTMA를 이용하여 운동성양상 분석 및 HA 비율을 측정하였다. 운동성을 분석하기 위한 정자 부유액은 Ham's media로 20-30 \times 10⁶ cell/ml로 희석하여 측정하였으며 HTMA은 다음과 같이 setting하였다.

Negative phase-contrast optics, frames acquired 20, frame rate 30/sec, minimum contrast 7, minimum size 6, low/high size gates 0.4/1.6, low/high intensity gates 0.4/1.6, non

Table 1. Mean of motility parameters at fresh, swim up, incubation 5hours, ionophore treatment (Tx) 15min, 30min, vehicle treatment(mean \pm SE, n=16)

	VCL $\mu\text{m}/\text{sec}$	VSL $\mu\text{m}/\text{sec}$	LIN %	STR %	ALH μm	BCF Hz
Fresh	66.31 \pm 3.39	39.44 \pm 3.34	58.63 \pm 1.74	77.31 \pm 1.95	3.57 \pm 0.39	12.23 \pm 0.74
Swim up	91.38 \pm 3.71	50.25 \pm 2.79	59.87 \pm 3.07	80.06 \pm 2.40	4.62 \pm 0.39	14.63 \pm 0.68
Incubation 5hours	102.19 \pm 3.16	51.94 \pm 1.71	55.31 \pm 2.80	78.63 \pm 1.98	5.19 \pm 0.29	15.17 \pm 0.55
Ionophore 15min	86.94 \pm 3.83	49.88 \pm 1.75	61.63 \pm 2.69	84.44 \pm 1.64	4.81 \pm 0.30	14.60 \pm 0.55
30min	88.32 \pm 3.46	49.44 \pm 1.61	57.88 \pm 2.20	83.06 \pm 1.43	5.17 \pm 0.30	14.69 \pm 0.58
Vehicle	80.94 \pm 3.59	50.88 \pm 2.27	64.44 \pm 3.16	85.75 \pm 1.62	4.35 \pm 0.33	13.71 \pm 0.66

motile head size 10, non motile intensity 195, medium VAP(average path velocity) value 25, low VAP value 10, threshold STR(straightness) 80. Field는 표본마다 3내지 5개를 취하여 VAP가 10이상의 운동성을 가진 정자가 200개이상 되도록 하였다.

운동성 양상을 측정하는 척도로는 curvilinear velocity(VCL, $\mu\text{m}/\text{s}$), straight line velocity(STR, $\mu\text{m}/\text{s}$), linearity(LIN, %), straightness(STR, %), amplitude of lateral head displacement(ALH, μm), beat cross frequency(BCF, Hz)등을 측정하였으며 HA 분석시 각 운동성 척도들의 기준은 Burkman(1991)에 의해 설정된 수치를 사용하였다.

3) 침체반응 검사

정자의 침체반응을 관찰하기 위해 Cross등(1986)의 pisum sativum agglutinin fluorescein isothiocyanate conjugate(PSA-FITC)를 이용한 염색방법을 시행하였으며 정자의 침체반응 판정은 적어도 200개 이상의 정자를 세었으며 정자 두부의 반 이상이 균일하고 밝게 염색될 때를 침체를 손실한 침체반응으로 판정하였다.

4) 햄스터 난자 침투 실험(SPA)

SPA는 Johnson(1984)의 방법에 의거하여 시행하였다. 즉, 정착처리시 Test. Yolk Buffer(이하 TYB라함)를 이용하여 4°C에서 42시간 배양하는 저온 수정능 획득 방법(Low temperature capacitation)을 이용하였으며 정자 swim up 시간은 90분간, 정자와 햄스터 난자를 함께 배양하는 시간은 3.5시간으로 설정하여 시행하였다.

정자세척 및 수정배양액으로는 0.3% human serum albumin(이하 hSA라고함)을 첨

가한 MBWW를 이용하였고 정자의 전배양시에는 1% hSA를 첨가하여 이용하였다.

수정후 난자를 회수하여 신선한 배양액에서 3회 세척후 정자를 제거한 후, 슬라이드 위에 소량(5-10 μl)의 배양액과 함께 난자를 옮기고 cover slip 주위에 vaseline-paraffin 혼합액을 떨구고 슬라이드에 덮은후 난자가 파손되지 않도록 누른다. 슬라이드를 고정액(methanol: acetic acid=3:1)에 넣어 고정시킨후 0.25% acetic lacmoid로 염색하여 위상차 현미경 \times 1000배율에서 정자의 난자내 침투여부를 관찰하였다. 판정은 제 2극체의 방출, 정자의 두부가 팽창되었거나 남성진핵(male pronucleus)이 보이며 해당정자의 미부가 난자 세포질 내에서 식별될 때 정자가 난자내로 침투된 것으로 판정하고 침투 정도는 난자 침투율(정자가 한개 이상 침투된 난자수/수정시킨 총 난자수)로 나타냈다.

5) 통계처리

통계처리는 Friedman two-way ANOVA와 regression analysis로 실시 하였으며 $p < 0.05$ 를 통계학적 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

16명의 건강한 남성정액을 HTM-analyzer를 이용하여 액화 직후의 신선 정자군, swim up후, 5시간 배양후, A23187 처리 15분과 30분후, A23187로 처리하지않고 vehicle로 처리후 등 각 단계의 운동성 양상 변화를 분석한 결과는 그림 2와 같다. 각 단계마다의 운동성 척도, 즉 VCL, VSL, LIN, STR, ALH, BCF의 평균 값은 표 1과 같으며 VCL, VSL, ALH,

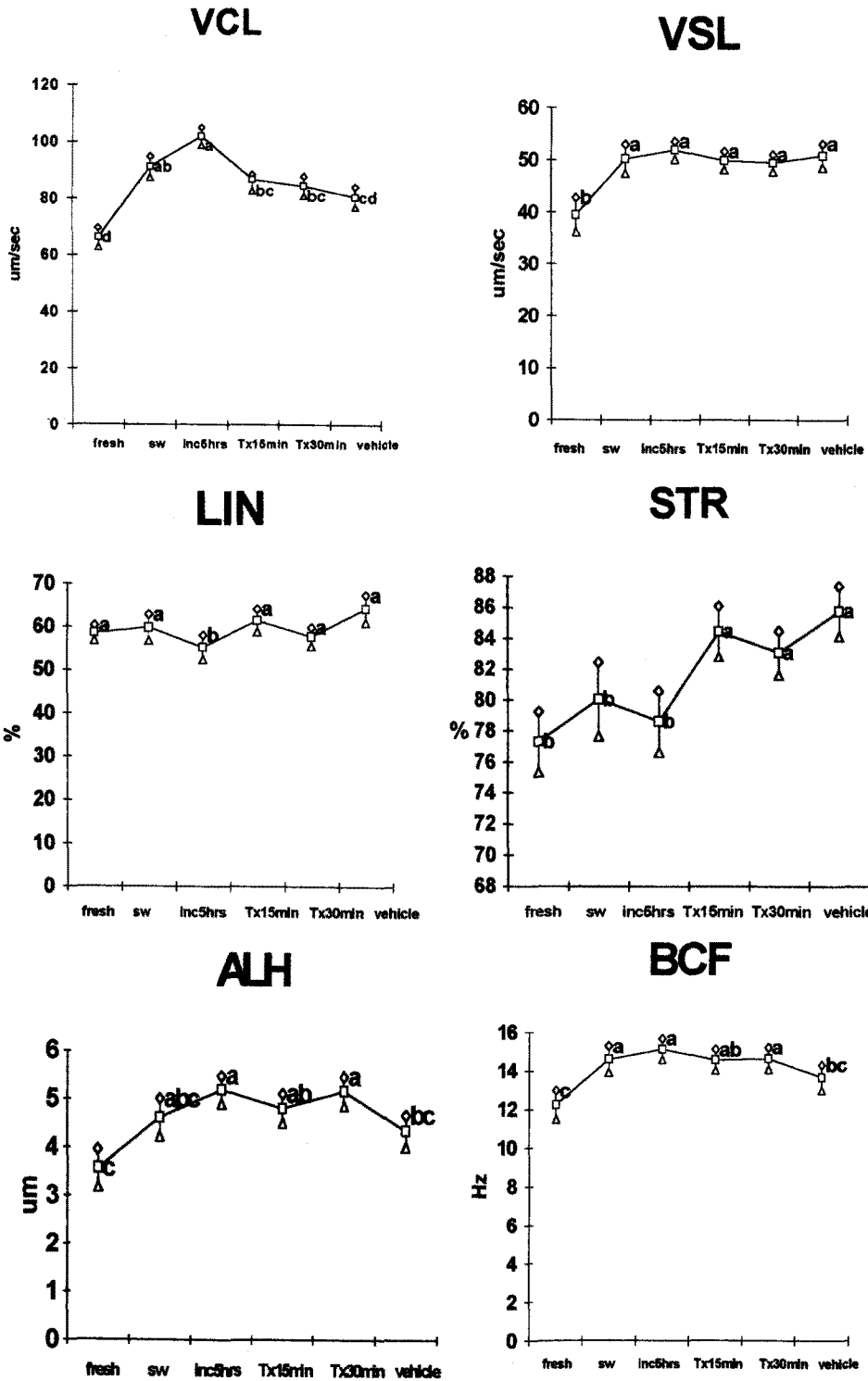


Fig. 2. Mean of six movement parameters at fresh, swim up (sw), incubation 5 hours (inc 5 hrs), ionophore treatment (Tx) 15 min, 30 min, vehicle treatment. (mean \pm SE, n = 16). Different indices indicate different results ($p < 0.05$).

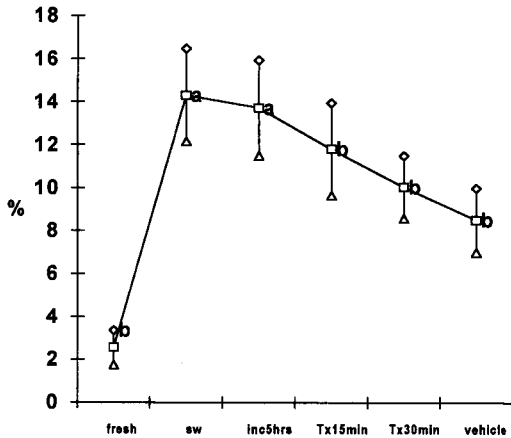


Fig. 3. Means of the percentage of hyperactivated spermatozoa at fresh, swim up(sw), incubation 5hours(inc5hrs), ionophore treatment(Tx) 15min, 30min, vehicle treatment. (mean \pm SE, n=16). Different indices indicate different results($p < 0.05$).

Table 2. Mean percentage(mean \pm SE) of spermatozoa with HA at fresh, swim up, incubation 5hours, ionophore treatment, vehicle treatment in subject with low(<10) and high(>10) SPA scores

	Hyperactivated spermatozoa(%)	
	Low SPA (<10)	High SPA (>10)
Fresh	0.33 \pm 0.12	4.2 \pm 1.04
Swim up	9.33 \pm 1.33	13.4 \pm 2.32
Incubation 5hours	14.67 \pm 1.85	12.6 \pm 1.59
Ionophore	10.33 \pm 0.59	9.4 \pm 1.59
Vehicle	4.67 \pm 0.51	6. \pm 1.43

BCF는 액화 직후의 신선정자군에서 보다 swim up후와 5시간 배양후에 의미있게 증가하였으며($p < 0.05$). LIN과 STR은 신선정자군(58.63 ± 1.74 , 77.31 ± 1.95)에서 보다 swim up 후(59.87 ± 3.07 , 80.06 ± 2.40)와 5시간 배양후(55.31 ± 2.80 , 78.63 ± 1.98)에 변화가 없거나 의미있게 감소하였다($p < 0.05$). Ca ionophore로 처리한 후와 vehicle로 처리한 후에는 6가지 운동성 척도들의 변화에 유의한 차이가 발견되지 않았다(표 1).

액화 직후의 신선정자군의 HA 평균은 $2.56 \pm 0.81\%$ 이었고 swim up 후, 5시간 배양 후 각각의 HA평균은 $14.31 \pm 2.16\%$, $13.71 \pm 2.23\%$ 로써 신선정자군에 비해 증가되었으며 통계학

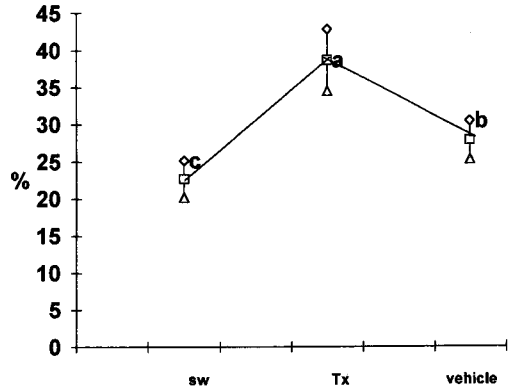


Fig. 4. Mean percentage of acrosome reacted spermatozoa at swim up(sw), ionophore treatment(Tx), vehicle treatment (mean \pm SE, n=16). Different indices indicate different results($p < 0.05$).

적으로 유의한 차이를 보였으며 ($p < 0.05$), 또한 Ca ionophore 처리 15분, 30분 후군과 vehicle로 처리한 군의 각각 HA 평균은 $11.80 \pm 2.16\%$, $10.04 \pm 1.46\%$, $8.50 \pm 1.50\%$ 로서 각 군 간에 유의한 차이가 없었다(그림 3). 첨체 반응을에서는 처리군(38.68%)이 처리하지 않은 군(27.84%)보다 유의있게 높은 결과를 나타내었다(그림 4, $p < 0.05$).

HA와 SPA와의 관계는 HA% 평균값이 각 시간 및 처리단계(신선정자군, swim up후, 5시간배양 후, A23187 처리 후, vehicle 처리 후)에서 low SPA(<10)군에서는 각각 0.33 ± 0.12 , 9.33 ± 1.33 , 14.67 ± 1.85 , 10.33 ± 0.59 , 4.67 ± 0.51 등이었고 high SPA군에서는 4.2 ± 1.04 , 13.4 ± 2.32 , 12.6 ± 1.59 , 9.4 ± 1.59 , 6 ± 1.43 등으로 통계학적인 유의차는 없었다(표 2, $p > 0.05$).

고 찰

남성불임에 대한 연구가 확대되면서 정상외 수정능을 갖는 정자의 특성 및 정량적 측정에 많은 관심이 모아지고있다.

포유동물의 정자는 정소에서 형성될 때 구조와 기능면에서 미분화된 생식세포로 수정능력이 없으며, 부정소를 통과하는 동안 형태적, 생화학적 그리고 생리학적인 변화를 통하여 수정능력(fertilizing capability)을 갖는 것으로 알려져 있으며 이러한 일련의 성숙 과정(epididymal sperm maturation)을 거친후 여성의

생식기에서 수정능 획득(capacitation)이라는 과정을 통해 침체반응 및 난자와 수정할 수 있는 능력을 얻게 되는 것이다(Austin, 1951; Chang, 1951; Bedford, 1983; Yanagimachi, 1988).

따라서 남성 정자의 수정능력의 선행조건은 정자자체의 수정능 획득과 침체반응이라고 여겨지나 우리가 일상적으로 시행하고 있는 정액검사로는 해당 남성 정자의 생식능력에 포함되는 수정능 획득을 반영하지 못하고 있고 현재까지 알려진 생물학적 검사법으로는 zona free hamster ovum penetration test나 zona binding test가 있으나 과정이 복잡하고 많은 비용과 시간이 필요하며, 정도관리부재 및 실험간의 변이등의 문제점을 가지고 있어 일상적으로 시행하기 어려운 실정이다.

Yanagimachi(1969)는 golden hamster의 epididymal spermatozoa를 배양액에서 단기 배양후 나타나는 진행성이 적고 진폭이 크고 힘찬 반복성의 파동운동을 관찰하여 hyperactivated sperm motility에 대해 처음 서술하였으며 또한 이러한 현상이 in vivo에서 정자의 수정능 부여현상과 관련이 있음을 보고하였다.

Burkman(1984)과 Mortimer등(1984)은 체외수정시술시, 인간정자에서 HA현상을 처음 관찰하였으며 남성 불임군 정자의 HA가 가임 남성군 정자의 HA에 비해 유의하게 낮았으므로 HA가 정자의 수정능을 어느정도 반영할 수 있음을 시사하였다.

인간 정자의 운동성은 그 속도와 양상이 자궁경관에서의 침투, 또는 sperm penetration assay(SPA) 및 체외수정 결과와 관련이 있는 것으로 알려져(Zaini et al., 1985; Liu et al., 1988) 이미 오래전부터 정자의 운동성을 객관적으로 측정하고자하는 시도가 있었다.

Time Exposure Photomicrography, Multiple Exposure Photomicrography, Micronematography, Videomicrography등이 개발되었으나 실용화 되지 못하고 최근 들어와 컴퓨터 정액분석기가 고안되면서 정자의 운동성을 객관적으로 분석할 수 있게 되었다.

이러한 분석기를 이용하여 정자의 수정능 획득시 나타나는 HA를 측정함으로써 이를 정자의 기능 평가에 이용하려는 시도가 이루어지고 있으며 배양액에서의 HA와 침체반응의 시간경과에 따른 변화관찰이 하나의 정자

기능 검사법으로써 사용될 수 있다고 하였다(Topfer-Petersen, 1985).

본 연구에서는 hyperactivated motility의 특징을 갖는 spermatozoa를 객관적으로 관찰하기 위해 Hamilton Thorn Motility Analyzer HTM 2030(Hamilton Thorn Research, Beverly, MA)를 이용하였으며, HA를 위한 운동성 척도의 기준은 Burkman(1991)에 의해서 설정된 수치를 기본으로 하여 관찰하였다.

본 연구결과 swim up한 직후의 운동성 척도의 분석결과 액화 직후 신선정자군에 비해 그 평균값이 모두 증가하는 소견을 보였으며 이러한 결과는 다른 연구자들의 결과와 일치하는 것이다(Mortimer, 1984; Mack et al., 1988). 정자의 운동성은 정액의 점도(viscosity)의 영향을 받는다고 하였고(Ishijima, 1986) 세척을 함으로써 정자 표면에 흡착되는 정액성분을 제거하게 되면 정자의 운동성을 조절하는 3',5'-monophosphate 또는 Ca^{2+} 의 변화가 초래되어 운동성이 변하는데 이렇게 나타나는 고활성 운동성(hyperactivation)을 정자의 수정능 획득의 초기변화라고 하였다(Burkman, 1986).

Capacitating media에서 5시간 배양 후 측정된 6가지 운동성 분석결과, 운동성 척도 중 VCL, VSL, ALH, BCF등은 의미있게 증가하였으나 LIN, STR은 변화가 없거나 감소하는 추세를 보였다. 이는 HA의 특징에 준하는 변화라고 볼 수 있는데 이러한 결과들은 6시간 배양후 ALH는 증가하고 LIN는 감소하였다는 Morales등(1988)의 결과와 일치한다. 또한 Mortimer등(1984)도 BWB에서 5시간 배양후 progressive velocity와 ALH가 증가하는 것을 관찰하였고, Robertson등(1988)은 배양후 velocity, ALH, dance등의 운동성 척도들이 증가한다고 보고하였다.

그러나 배양액에서 incubation동안, 운동성 척도의 변화를 관찰할 수 없었다는 보고도 있었다(Grunert et al., 1990; Koukoulis, 1987).

이렇게 서로 다른 결과들은 정자처리 및 배양방법이 상이하고(Mack et al., 1989) 사용된 정액분석기의 종류(Mahony, 1988)와 운동성 척도를 측정하기 위한 기계의 setting이 다르기 때문이라고 여겨진다(Knuth, 1987).

알려져있는 바와 같이 Ca ionophore은 침체반응을 촉진하고 이미 동물실험에서 정자의 고활성화 운동성도 증가 시킨다고 보고된 바

있다(Yanagimachi, 1975; Cooper, 1984).

본 연구에서는 hyperactivity를 촉진하기위 해서 Ca ionophore를 첨가하여 HA cell의 수를 증가시키고자 하였으나 그 결과는 10 μ M A23187를 첨가 후와 A23187 처리하지않은 vehicle 처리 후를 비교하였을 때 운동성 척도의 변화가 없었는데 이와같은 결과는 Aitken등(1984)의 보고와 일치하는 것이다.

본 실험에서 HA를 측정할 때 HA을 위한 운동성 척도의 기준은 Burkman(1991)의 기준인 VCL>100, LIN<65, ALH>75로 automated sorting에 의해 측정하였다.

Burkman(1991)은 HTM의 "edit tracts" option을 이용하여 정자를 운동성의 특징에 의해 다섯가지 즉, circular high curvature, thrashing, star-spin, helical, non-HA군으로 나누어 각각의 운동성 척도를 측정하였으며 그들 값의 범위를 정하고 그경계 값을 HA의 기준으로 정하였고 이는 Robertson등(1988)의 다른 기준과 비교하여 볼때 HA 비율이 약간 높으나 서로 깊은 연관성을 갖는 것으로 관찰되었다(Wang et al., 1993).

본 연구에서 HA의 빈도는 액화 직후 신선 정자군에서는 2.56%이며 swim up후에는 14.31%, 5시간 incubation후에는 13.71%로 의미있게 증가하였다.

Wang등(1993)의 보고에 의하면 HA 측정시 Bukman(1991)의 기준에 의하면 HA비율이 신선정자군 및 1시간, 6시간 배양후의 비율이 각각 2.54%, 18.41%, 16.02%이었으며 Robertson등(1988)의 기준에 의하면 각각 2.28%, 9.20%, 7.53%로 Bukman(1991)의 기준에 사용하였을때 더 높게 나오는 결과를 얻었다고 보고하였다. Bukman(1991)의 기준에 의한 HA비율은 본 연구에서의 결과와 유사하게 나타났다. 배양시간에 따른 HA% 변화는 swim up군 보다 5시간 배양후에 약간 감소하였고 Ca ionophore처리에 따른 변화는 처리 후 침체반응은 의미있게 증가하였으나 HA 비율은 처리하지않은 군과 차이를 보이지 않았다. Burkman(1988)은 배양시간에 따른 HA% 변화에서 swim up군 보다 6시간 배양후에 HA비율이 약간 감소하며 3시간 이상 되면 오히려 HA 비율이 감소한다고 보고하였고 이는 본 연구 결과와 일치한다. 또한 본 연구 결과 Ca ionophore 처리시 침체반응은 촉진되나 고흡성화 운동성은 촉진되지 못한

결과를 얻었으며 이는 Grunert등(1990)의 결과와 일치한다.

몇몇 연구자들은 in vitro에서 배양액에서의 배양전과 배양후의 HA를 측정함으로써 난자와의 수정율을 예측할 수 있으며 침체반응의 상태를 함께 측정하면 그 정확도를 높일수 있다고 하였다(Robertson et al., 1988; Wang, 1993).

저자들은 HA가 하나의 수정능 측정 방법으로 유용한가를 알아 보기위해 SPA와 비교 관찰한 결과 서로 관계가 없다는 결과를 보였는데 이는 Wang등(1991)의 결과와 유사하다. 그러나 Wang등(1991)에 의하면 HA와 SPA가 서로 관계가 없어도 정액 검사상 이상이 있는 군에서는 SPA score가 0인 군에서 HA 비율이 의미있게 낮았다고 보고하였고 Morales등(1988)은 HA와 관련이 있는 몇몇 운동성 척도와 연관이 있다고 하였다.

본 연구의 결과로부터 Computerized sperm motility analyzer (HTMA 2030)을 이용한 HA의 정량적 측정은 매우 간단하고 빠르며 객관적인 방법으로 SPA와 같이 정자의 수정능 획득을 반영하는 하나의 검사방법으로 기대되며 아울러 남성 불임환자의 평가에 있어 일상적인 방법으로써 시행할 수 있도록 HA측정에 있어서 방법상의 표준화, 체외수정시 수정 능력과의 관계등 더 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

결 론

본 연구는 HA의 특징을 갖는 정자(spermatozoa)를 객관적으로 관찰하고 배양액, modified BWB에서 배양 후 HA의 변화 및 HA에 대한 Ca ionophore(A23187)의 영향과 HA의 수정능 획득 측정방법으로써의 유용성을 알아보고자 건강한 남성으로부터 72시간 금욕 후 얻은 정액을 30분간 액화시킨다음 햄스터 난자 침투 실험(SPA)과 HTM-analyzer를 이용하여 시행하였다. 액화 직후의 신선 정자군의 운동성 양상 및 HA%를 측정하였으며, swim up후, 5시간 배양후, A23187 처리 15분과 30분후, A23187로 처리하지않고 vehicle로 처리후 등의 운동성 양상, HA비율의 변화 및 Ca ionophore처리 후의 침체 반응을 (AR)의 변화, HA와 SPA와의 상관관계를 비교관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 액화 직후의 신선정자군의 HA 평균빈도는 2.56 ± 0.81 이었다.

2. 운동성 양상에 있어서 VCL($\mu\text{m}/\text{sec}$), VSL($\mu\text{m}/\text{sec}$), ALH(μm), BCF(Hz)는 액화 직후의 신선정자군(66.31 ± 3.39 , 39.44 ± 3.34 , 3.57 ± 0.39 , 12.23 ± 0.74)에서보다 swim up 후(91.38 ± 3.71 , 50.25 ± 2.79 , 4.62 ± 0.39 , 14.63 ± 0.68)와 5시간 배양 후(102.19 ± 3.16 , 51.94 ± 1.71 , 5.19 ± 0.29 , 15.17 ± 0.55)에 의미있게 증가하였으며($p < 0.05$), LIN(%)과 STR(%)은 신선정자군(58.63 ± 1.74 , 77.31 ± 1.95)에서 보다 swim up 후(59.87 ± 3.07 , 80.06 ± 2.40)와 5시간 배양 후(55.312 ± 2.80 , 78.63 ± 1.98)에 변화가 없거나 의미있게 감소하였다($p < 0.05$).

3. Swim up 후, 5시간 배양 후, 각각의 HA %는 14.31 ± 2.16 , 13.71 ± 2.23 이었으며 이는 신선정자군에 비해 유의있게 증가하였다($p < 0.05$).

4. HA와 SPA와의 관계는 HA % 평균값이 각 시간 및 처리단계(신선정자군, swim up 후, 5시간 배양 후, A23187 처리 후, vehicle 처리 후)에서 low SPA(< 10)군에서는 각각 0.33 ± 0.12 , 9.33 ± 1.33 , 14.67 ± 1.85 , 10.33 ± 0.59 , 4.67 ± 0.51 등이었고 high SPA(> 10)군에서는 4.2 ± 1.04 , 13.4 ± 2.32 , 12.61 ± 1.59 , 9.4 ± 1.59 , 6 ± 1.43 등으로 통계학적인 차이가 없었다($p > 0.05$).

5. 배양 후, Ca ionophore 처리한 군과 하지 않은 군의 운동성 척도의 변화를 볼 때 모두 차이를 보이지 않았으며, HA의 비율에 있어서도 차이가 없었으나 첨체반응율에서는 처리군(38.68%)이 처리하지 않은 군(27.84%)보다 유의있게 높은 결과를 나타내었다($p < 0.05$).

이상의 결과로부터 HTMA 2030과 같은 Computerized sperm motility analyzer를 이용한 HA 정량적 측정은 매우 간단하고 빠르며 객관적인 방법으로 사료되며, HTM 2030을 이용하여 HA 측정시 SPA와의 상관관계는 없었으며 Ca ionophore(A23187) 처리 후 HA와 AR 사이 상관관계도 없는 것으로 나타났다.

HA를 이용하여 남성 수정능력을 평가하는 방법에 대한 연구는 앞으로 더 필요한 것으로 사료된다.

Aitken RJ: Assessment of human sperm function for IVF. *Hum Reprod* 1988, 3, 89-95.

Aitken RJ, Best FSM, Richardson DW, Djahanbakhch O, Mortimer D, Templeton AA, et al. : An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility: conventional criteria, movement characteristics, and fertilizing capacity. *Fertil Steril* 1982, 38, 212-221.

Aitken RJ, Ross A, Hargreave T, Richardson D, Best F: Analysis of human sperm function following exposure to the ionophore A23187. Comparison in normospermic and oligospermic men. *J Androl* 1984, 5, 321-329.

Austin CR: Observation of penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res Ser B* 1951, 4, 581-596.

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, 108-120.

Bedford JM, Calvin H, Cooper GW: The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J Reprod Fertil* 1973, 18(Suppl), 199-213.

Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DG: The culture of mouse embryo in vitro. In: Daniel JC, ed. *Method in Mammalian Embryology*. San Francisco, Freeman 1971, 86-116.

Burkman LJ: Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic sperm populations. *Arch Androl* 1984, 13, 153-165.

Burkman LJ: Temporal pattern of hyperactivation-motility in human spermatozoa. *Biol Reprod* 1986a, 34(Suppl 1), 226.

Burkman LJ: Experimental approaches to evaluation and enhancement of sperm func-

- tion. In: Jones HW, Jones GS, Hodgen GD, Rosenwaks Z, eds. *In Vitro Fertilization-Norfolk*. Baltimore: Williams & Wilkins 1986, 201-214.
- Burkman LJ: Discrimination between nonhyperactivated and classical hyperactivated motility parameters in human spermatozoa using computerized analysis. *Fertil Steril* 1991, 55, 363-371.
- Chang MC: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951, 68, 697-698.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW: Incubation and acrosome reaction by the human zona pellucida. *Biol Reprod* 1988, 38, 235-244.
- Grunert JH, DeGeyter C, Nieschlag E: Objective identification of hyperactivated human spermatozoa by computerized sperm motion analysis with Hamilton Thorn Sperm Motility Analyzer. *Human Reprod* 1990, 5, 593-599.
- Hall JL: Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Fertil Steril* 1985, 35, 457-463.
- Holt WV, Moore HDM, Hillier SG: Computer-assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: correlation of results with in vitro fertilization assays. *Fertil Steril* 1985, 44, 112-119.
- Ishijima S, Oshio S, Mohri H: Flagellar movement of spermatozoa. *Gamete Res* 1986, 13, 185-197.
- Johnson AR, Syms AJ, Lipshultz LI, Smith RG: Conditions influencing human sperm capacitation and penetration of zona-free hamster ova. *Fertil Steril* 1984, 41, 603-608.
- Katz DF, Drobnis Z, Overstreet JW: Factors regulating mammalian sperm motion migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Res* 1988, 22, 443-469.
- Knuth UA, Teung CH, Nieschlag E: Computerized semen analysis: objective measurement of semen characteristics is based by subjective parameter setting. *Fertil Steril* 1987, 48, 118-124.
- Koukoulis G, Vantman D, Zinaman M, Sherins R: Assessing human sperm velocity in semen and during the capacitation process using automated semen analysis. *J Andrologia* 1987, 8, 24.
- Lee MA, Truco GS, Bechtol KB, Wummer N, Kopf GS, Blasco L, et al.: Capacitation and acrosome reaction in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil Steril* 1987, 48, 649-658.
- Liu DY, Baker HWG: The proportion of human sperm with poor morphology but normal intact acrosomes detected with pisum sativum agglutinin correlates with fertilization in vitro. *Fertil Steril* 1988, 50, 133-141.
- Liu DY, Clarke GN, Baker HWG: Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn Motility Analyzer and fertilization rates in vitro. *J Androl* 1991, 12, 231-239.
- Liu DY, Du Plessis YP, Nayudu PL, Johnston WIH, Baker HWG: The use of in vitro fertilization to evaluate putative tests of human sperm function. *Fertil Steril* 1988, 49, 272-277.
- Liu DY, Lopata A, Johnston WIH, Baker HWG: Human sperm-zona binding, sperm characteristics and in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1989, 4, 696-701.
- Mahony MC, Alexander NJ, Swanson RJ: Evaluation of semen parameters by means of automated sperm motion analyzers. *Fertil Steril* 1988, 49, 876-880.
- Mack SO, Wolf DP, Tash JS: Donor variability and the effect of protein additives on hyperactivated motility of washed human sperm. *Biol Reprod* 1988, 38(Suppl 1), 92.
- Mack SO, Wolf DP, Tash JS: Quantitation of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. *Biol Reprod* 1989, 38, 270-281.
- Mallidis C, Howard EJ, Baker HWG: Variation of semen quality in normal men. *Int J*

- Androl* 1991, 14, 99-107.
- Morales P, Overstreet JW, Katz D: Changes in human sperm motion during capacitation in vitro. *J Reprod Fertil* 1988, 83, 119-128.
- Mortimer 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.
- Mortimer ST, Mortimer D: Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J Androl* 1990, 11, 195-203.
- Overstreet JW, Katz DF, Hanson FW, Fonseca JR: A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. *Fertil Steril* 1979, 31, 162-172.
- Robertson L, Wolf DP, Yash JS: Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of population of hyperactivated human sperm. *Biol Reprod* 1988, 39, 797-805.
- Templeton AA, Penney GC: The incidence, characteristics, and prognosis of patients whose infertility is unexplained. *Fertil Steril* 1982, 37, 175-182.
- Tesarick J: Comparison of acrosome reaction inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J Reprod Fertil* 1985, 74, 383-388.
- Topfer-Peterson E, Heissler E, Schill W: The kinetics of acrosome reaction—an additional sperm parameter? *Andrologia* 1985, 17, 224-227.
- Wang C, Surrey ES, Lee GS, Chan SYW, Leung A: Human sperm hyperactivation and acrosome reaction and their relationships to human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1993, 59, 1221-1227.
- Wang C, Andrew L, Tsoi WL, Leung A, Ng V, Lee KF: Evaluation of human sperm hyperactivation motility and its relationship with the zona-free hamster oocyte sperm penetration assay. *J Androl* 1991, 12, 253-257.
- White DR, Phillips DM, Bedford JM: Factors affecting the acrosome reaction in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1991, 90, 71-80.
- Yanagimachi R: In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J Reprod Fertil* 1969, 18, 275.
- Yanagimachi R: Mammalian fertilization. In Knobil E, Neil JD eds. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1988, pp135.
- Yanagimachi R: The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil* 1970, 23, 193.
- Zaneveld LJD, De Jonge CJ, Anderson RA, Mack SR: Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 1991, 6, 1265-1274.
- Zaini A, Jennings MG, Baker HWG: Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertile men? *Int J Androl* 1985, 8, 427-435.