

인간 정자의 생식력 평가에 있어 첨체반응율과 햄스터 난자 침투 분석법의 비교연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

문신용 · 류범용 · 오선경 · 서창석 · 김석현 · 최영민
신창재 · 김정구 · 장윤석 · 이진용

Comparison between Sperm Acrosome Reaction following Ionophore Challenge and Sperm Penetration Assay as Assessment of fertilizing Capacity of Human Spermatozoa

Shin Yong Moon, Buom Yong Ryu, Sun Kyung Oh, Chang Suk Suh, Seok Hyun Kim,
Young Min Choi, Chang Jae Shin, Jung Gu Kim, Yoon Seok Chang and Jin Yong Lee

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

= Abstract =

This study was designed to determine the relationship between sperm acrosome reaction following ionophore challenge(ARIC) and hamster ovum sperm penetration assay(SPA) as assessment of fertilizing capacity of male.

ARIC test and SPA were performed in 23 fertile and 19 subfertile men.

The results were as follows; Sperm concentration was significantly higher in fertile group compared with subfertile group : 114.6 ± 64.40 vs $61.3 \pm 46.50 \times 10^6$ /ml. However, there were no significantly differences in seminal volume, motility and motility index, respectively. There was a significantly correlation between spontaneous and induced AR in fertile and subfertile group, respectively. ARIC value was significantly higher in fertile group, compared with subfertile group: $12.0 \pm 5.57\%$ vs $2.6 \pm 4.96\%$. Both Penetration rate(PR) and Penetration index(PI) were significantly higher in fertile group, compared with subfertile group: $97.4 \pm 7.40\%$ vs $64.9 \pm 36.20\%$ and 5.4 ± 2.88 vs 1.5 ± 1.47 , respectively. The Positive predictive value(PPV), Negative predictive value(NPV), sensitivity and specificity of ARIC test (cut-off : 8.5) and SPA(PI cut-off : 3.0) in predicting fertility were 95.0%, 81.8%, 82.6%, 94.7% and 95.2%, 85.7%, 87.0% and 94.7%, respectively. There was no significantly difference in predicting fertility between ARIC test and SPA.

In conclusion, ARIC test was shown to have a predictive value for fertilizing capacity comparable to that of the hamster ovum sperm penetration assay. Therefore, ARIC test may be a simple and cost-effective addition to existing semenology instead of SPA.

Key Words: acrosome reaction/ARIC/SPA/fertilizing capacity/predicting fertility.

*** 본 연구는 1995년도 서울 대학교병원 지정연구비(02-95-096)의 지원에 의한 것임.

서 론

최근 미세조작술(micromanipulation)의 발전으로 인해 남성불임 치료에 있어서 획기적인 돌파구가 마련되고 있다. 그러나 남성불임의 원인 규명 및 진단은 여러 연구자들에 의해 다각도로 연구되고 있지만 아직까지도 미흡한 실정이다.

정액검사(semen analysis)는 오랜기간 남성의 생식능력판정을 위한 기본검사로 널리 사용되어 왔으나 정상적인 정액검사 소견을 보이지만 정자 기능상의 결함을 지닌 남성에게 있어서는 정액 검사만으로 불임의 원인을 찾아내는 것은 불가능한 상황이다.

이러한 문제점으로 인해 인간정자의 기능을 평가하는 방법들이 대두되게 됐으며, Yanagimachi등(1976년)은 인간정자의 기능적 활성도를 평가하는 방법으로 human sperm zona free hamster ova penetration assay(SPA)를 개발했다. 그 후 여러 연구자들에 의해 SPA의 위음성(false-negative) 결과 및 음성결과의 낮은 예측도를 개선하는 방법으로 실험 기법상의 오차를 줄이고 정자의 침체반응을 극대화 시키는 처리법들이 연구됨에 따라 검사의 신뢰도를 높이고 있다(Aiken et al., 1984; Rogers, 1985; Hirsch et al., 1986; McClure et al., 1990; 김석현 등., 1991). 그러나 SPA는 시행상 시간과 경비소요가 많으며(Johnson et al., 1990), 햄스터 난자에 침투된 소수의 정자만으로 기능이 평가되는 단점을 지니고 있다.

인간정자는 수정전 수정능획득(capacitation) 및 침체반응(acrosome reaction)이라는 일련의 변화 과정을 거쳐야만 난자와의 수정능력을 부여받게 된다(Bedford, 1983). 정자의 침체반응율은 일반적인 체외배양 조건하에서는 낮은 비율로 나타나지만(Byrd and Wolf, 1986), oocyte-cumulus complex(Stock et al., 1989)나 난포액(Zaneveld et al., 1991)과 같은 침체반응 유발인자와 접촉하면 증가되며, 체외배양 조건하의 자발적인 반응을(spontaneous reaction rate)과 비교하여 생리적 자극제에 의해 야기되는 반응을(induced reaction rate)정도의 차이가 정자의 기능 평가에 있어 중요한 의미를 갖는다(Tesarik, 1989). 원인불명의 남성불임증 환자의 정자는 생리적인 침체반응 유발인자에 대한 반응 정도가 낮으며, 이런 현상

은 정자 기능상의 특별한 병변으로 예측된다(Calvo et al., 1989).

이에 따라 여러 연구자들에 의해 정상 수정의 선결 조건인 정자의 침체반응 정도를 직접 조사하여 정자의 침체반응 정도와 인간 정자의 수정능과의 연관성을 알아보려고 하는 노력이 활발히 진행되고 있다(Cummins et al., 1991; Fenichel et al., 1991; Pampiglione et al., 1993; Henkel et al., 1993).

본 연구는 남성 불임증의 진단과 향후 처치에 있어 검사방법의 적정화를 위한 목적으로 가임 남성군과 체외수정 시술을 받은 불임남성군을 대상으로 정자 침체반응 유발인자인 calcium ionophore에 반응하여 나타나는 정자의 침체반응(acrosome reaction following ionophore challenge :이하 ARIC, Cummins et al, 1991) 정도를 조사하여 SPA와의 상관관계 및 인간 정자의 생식력 판정에 있어서 유용성을 알아보려고 실시하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구에서는 최근 1년 이내에 여성 배우자에게 임신시킨 경험이 있는 남성 18명과 본원에서 체외수정 시술로 임신돼 생식력이 입증된 남성 5명 등 23명을 가임(fertile) 남성군으로, 불임 병력을 지니고 체외수정 시술(IVF-ET)시 난자 원인에 기인되지 않은 수정 실패자 9명과 3주기이상 50%이하의 저조한 수정율을 나타내고 임신에 실패한 10명 등 19명을 불임(subfertile) 남성군으로 정의하여 연구 대상으로 하였다.

2. 연구 방법

(I) SPA

SPA의 시행 방법은 이미 본 교실에서 발표한 바와 같다(장윤석 등, 1990; 신창재 & 장윤석, 1990; 신창재 등, 1990).

1) 정자 처리

채취된 정액을 실온에서 30분간 방치하여 액화된 정액 중 일부를 취하여 Makler counting chamber를 이용하여 정자의 농도, 운동성, 생존지수(motility index, MI) 등의 일반적인 정액검사를 시행하였다. 정자의 생존지수는 이용빈(1984)의 정자 생존지수 조건표에서 정자의 운동력(kinetics)과 운동성(motility)을 이용하여 구하였다.

그후 남은 정액을 반분하여 SPA용은 N-tris (hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulfonic acid (TES) 211mM, hydroxymethyl aminomethane(Tris) 96mM, dextrose 11mM, 1% penicillin-streptomycin 용액에 20% 신선 계란황 (hen's egg yolk)을 첨가하고 pH 7.4, osmolarity 290-320mOsm/kg으로 조정된 TEST-yolk buffer(TYB)와 용량비 1:1로 서서히 혼합한다. 이 혼합액을 냉장고에서 4℃까지 서서히 냉각시켜 42시간 동안 저온배양하여 정자의 수정능력이 획득되게 한다. 그 후 정액-TYB 혼합액을 0.3% HSA를 함유하는 37℃의 Ham's F-10 3ml로 혼합하여 600 G로 5분간 원심 분리한다. 상층액을 제거하고 남은 정자피 (sperm pellet)에 0.3% HSA를 함유하는 Ham's F-10 1ml로 혼합하여 300 G로 10분간 2차 원심 분리한다. 이 후 상층액을 다시 제거하고 남은 정자피에 1.0% HSA를 함유한 Ham's F-10 0.5-1ml를 추가하여 1.5-2시간 동안 swim-up 시킨다.

2) 투명대 제거 햄스터 난자의 준비

생후 12-16주된 암컷 햄스터를 대상으로 과배란유도를 시행하여 투명대 제거 햄스터 난자를 준비한다. 햄스터를 매 12시간마다 명암에 교대로 노출시키며 환경에 적응시킨 후 estrus 주기 제 1일째 PMSG 35IU를 복강 내로 주사하고, estrus주기 제 3일째 오후에, hCG 35 IU를 복강 내로 주사하여 과배란을 유도한다. hCG 투여 15-16시간 후 경추탈구법 (cervical dislocation)으로 햄스터를 희생시키고, 복강을 열어 난소, 난관 및 자궁을 노출시켜 지방조직을 제거한 후 양측 난관만을 절제하여 0.3% HSA가 함유된 Phosphate Buffered Saline(PBS)이 담긴 배양 접시에 담아 실험실로 옮긴 후 실제 현미경 하에서 난관팽대부를 절단함으로써 난구체 (cumulus complex)가 흘러나오게 한다. 난구체는 0.1% hyaluronidase를 포함한 PBS (+0.3% HSA)에서 투명대를 제거하고, 3회 세척한 후 0.1% trypsin을 포함한 PBS (+0.3% HSA)에서 투명대를 제거하고 다시 3회 세척한다.

3) 수정

1.5-2시간 swim-up시킨 정자를 배양 접시에 운동성 정자가 $1 \times 10^6/ml$ 이 되도록 떨구어 37℃, 5% CO₂ 배양기 내에서 sample당 10개 이상의 투명대 제거 햄스터 난자와 0.3% HSA를 포함한 Ham's F-10에서 3.5시간 배양하여 수정시킨다.

4) 고정, 염색 및 판독

수정 후 난자를 회수하여 신선한 배양액으로 3회 세척하여 난자에 과다하게 부착된 정자들을 제거한 후, 슬라이드 위에 소량 (5-10 μ l)의 배양액과 함께 난자를 옮긴다. Cover slip 주위 네곳에 소량의 vaseline-paraffin 혼합액을 떨구고 슬라이드에 덮은 후 실제현미경으로 관찰하면서 난자가 파손되지 않도록 조금씩 조절하며 cover slip을 슬라이드에 누른다. 슬라이드를 고정액 (methanol:acetic acid =3:1)에 넣어 24시간 이상 고정시킨 후 0.25% acetic lacmoid로 염색하여 위상차현미경 $\times 1,000$ 배율하에서 정자의 난자내 침투 여부를 관찰한다. 이때 정자의 두부가 부풀었거나 남성 전핵 (male pronucleus)이 보이며 해당 정자의 미부 (tail)가 난자 세포질 내에서 식별될 때 정자가 난자내로 침투된 것으로 간주한다. 모든 예에서 정자의 난자 침투 정도는 난자 침투율 (penetration rate, 이하 PR라 함 : 정자가 한개 이상 침투된 난자 수 / 수정시킨 총 난자 수) 및 난자 침투지표 (penetration index, 이하 PI라 함: 침투된 총 정자 수 / 수정시킨 총 난자 수)로서 나타낸다.

(2) Ionophore Challenge

1) Stock solution의 제조

Calcium ionophore A23187(Sigma) 1.0mg을 382 μ l의 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 최종 농도 5mM/L stock solution을 제조 후 20 μ l씩 분주하여 알미늄호일에 싸서 -20℃에 보관한다. 사용 당일 분주된 20 μ l의 stock solution에 4.98ml의 Ham's F-10을 첨가하여 최종 농도 20 μ M/L의 A 23187용액을 제조하고 대조군으로 4.98ml의 Ham's F-10에 DMSO 20 μ l를 첨가한 용액을 준비한다.

Fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated Pisum sativum lectin(PSA: L O770, Sigma)을 ultrapure water로 1mg/ml의 농도로 조정된 후 100 μ l씩 분주하여 알미늄호일에 싸서 -20℃에 사용시 까지 보관한다. 염색을 위해 분주된 PSA 용액을 ultrapure water로 희석 (1:9)하여 최종 농도 100 μ g/ml로 조정된 후 4℃에 보관한다.

2) Ionophore Challenge

액화된 정액을 5ml Ham's F-10 (+0.3% HSA)으로 희석한 후 원심분리 (600 G, 5min)를 한다. 상층액을 제거하고 3ml Ham's F-10 (+0.3% HSA)으로 희석한 후 2차 원심분리 (300 G, 10min)를 하고 상층액을 제거한 후 pellet양을 고려하여 적당

양의 Ham's F-10 (+1.0% HSA)으로 희석한 후 1시간 swim-up 시킨다. Swim-up 후 상층의 정자 부유액을 회수하여, 정자의 수정능획득을 위해 2시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 추가 배양한다. 배양 후 정자 부유액을 반분하여 각각 동량의 20 µM/L A23187용액(최종 농도 10 µM/L)과 DMSO용액으로 희석하여 30분간 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한다. 각 sample 500µl를 배양 후 300µl의 80% Percoll density gradient medium의 윗부분에 살며시 올려 놓은 뒤 원심분리 (600 G, 15min)를 한다. 상층액을 제거하고 sperm pellet을 50µl의 95% ethanol로 희석한 후 4°C에서 30분간 고정한다.

3) Lectin Staining 및 판독

고정 후 반복 pipeting으로 잘 혼합된 정자부유액 20µl를 슬라이드에 점적 시킨 후 일정 시간 정치하여 ethanol을 증발시킨다. FITC-PSA (100µg/ml) 20µl를 슬라이드 위에 떨구어 섞어 준 후 4°C moist chamber에서 15분간 정치시킨다. 증류수로 염색액을 제거하고 풍건시킨 후 cover glass를 덮어 형광 현미경 하에서 정자의 침체반응 정도를 조사했다. 두장의 슬라이드에서 각각 200개 이상의 정자를 관찰하였다. 정자 두부 전체가 염색되지 않았거나, 비정상적인 침체형태를 지닌 정자는 제외하고 침체부위가 완전히 염색된 것, 적도대(equatorial segment)부위 전체가 염색되고 침체부위가 부분적으로 염색된 것, 적도대부위만이 염색된 정자의 총 수에서 정상적인 투명대(zona pellucida) 통과 및 난황막(oolemma)과의 융합이 가능한 침체내막(inner acrosomal membrane)이 노출되고 온전한 적도대를 지닌 적도대 부위만 염색된 정자(Yanagimachi, 1981)의 비율로 대조군과 A23187 처리군 각각에서 침체반응율(%)을 조사했다. A23187에 반응하여 침체반응을 나타낼 수 있는 정자의 정도(ARIC value)는 A23187 처리군의 침체반응율(induced acrosome reaction rates)과 대조군의 침체반응율(spontaneous acrosome reaction rates)의 차이로서 산정 했다. 몇몇 반응이 낮았던 경우에서 counting 가변성으로 인해 A23187처리군 보다 대조군에서 침체반응율이 높게 나타났다. 이들 경우에는 ARIC의 음성(negative)의 결과로서 ARIC value를 "0"으로 평가했다(Cummins et al;1991).

(3) 통계 처리

Student's t-test를 사용하여 통계 처리 및 유의성 검정을 하였으며, p<0.05를 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다. 상관관계의 분석에서는 회귀 직선(linear regression)과 상관 계수(correlation coefficient)를 이용하였다.

(4) SPA와 ARIC test의 정자 수정능에 대한 예견치

각 검사법의 정자의 생식 능력 판정에 대한 임상적 예견도를 알아보기 위하여, receiver-operator-characteristic(ROC) curves를 이용하여 대상자 각각에서 나타났던 SPA의 PI와 ARIC test의 ARIC value를 기준으로 각각 수치에서의 민감도(sensitivity)와 위양성(false positive: 1-specificity)결과를 graph상에서 비교하였다. 검사 결과 두 요소간의 연관성에 있어 45° line graph를 나타내면 검사법의 예견치가 낮은 것으로 판정되며, 민감도가 높고 위양성이 낮은 점을 cut-off values로 결정했다. 본 실험에서 여러 가지 cut-off values를 비교하였으며, 가임군에 있어 PI나 ARIC values가 cut-off point보다 낮은 경우 위양성(false positive)으로 불임군에서는 진양성(true positive)으로 평가했다.

결 과

1. 정액검사

가임남성과 불임남성의 정액검사 결과는 Table 1.에 요약된 것과 같다.

가임남성 23명의 정액검사 결과 정액량은 평균 2.6±1.20ml 이었으며, 정자수는 평균 114.6±64.40x10⁶/ml 이었다. 운동성 정자는 평균 64.8±17.70%이었으며, 정자생존지수(MI)는 평균 46.7±17.50이었다.

불임남성 19명의 정액검사 결과 정액량은 평균 2.5±1.00ml이었으며, 정자수는 평균 61.3±46.50x10⁶/ml이었다. 운동성 정자는 평균 59.5±19.30%이었으며, 정자생존지수(MI)는 평균 37.4±18.30이었다.

양군을 비교할 때 정자수는 가임군이 불임군에 비하여 유의하게 높았다(p=0.0036).

2. ARIC test

가임남성과 불임남성의 정자 침체반응을 및 ARIC value는 Table 2.에 나타난 바와 같다.

가임남성 23명의 ARIC test 결과 DMSO만을

Table 1. Results of Semen Analysis for Fertile and Subfertile Men

Seminal Parameter	Fertile	Subfertile	Significance
No.	23	19	
Seminal Volume(ml)	2.6±1.20 (0.8-6.0)	2.5±1.00 (0.8-5.0)	NS
Conc. (x10 ⁶ /ml)	114.6±64.40 (35.0-250.0)	61.3±46.50 (15.0-180.0)	NS
Motility(%)	64.8±17.70 (20.0-90.0)	59.5±19.30 (20.0-80.0)	NS
Kinetic (0-4)	2.9±0.50 (2.0-4.0)	2.4±0.740 (1.0-3.0)	P=0.0159
Motility Index	46.7±17.50 (15.0-80.0)	37.4±18.30 (7.5-60.0)	NS

Mean ± SD(Range), NS: Not Significant

Table 2. Results of Spontaneous and induced Acrosome Reactions and ARIC Value for Fertile and Subfertile Men

Acrosomal Factor Measured	Fertile	Subfertile	Significance
Spontaneous Reaction	8.3±5.91 (1.3-25.0)	10.1±6.55 (3.0-30.5)	NS
Induced Reaction	20.3±9.08 (2.0-35.0)	12.7±7.61 (3.0-35.0)	P=0.0079
Difference: ARIC Value	12.0±5.57 (0.7-25.5)	2.6±4.96 (-11.6'-9.0)	P=0.0001

Mean ± SD(Range), * More reactions were observed in control suspensions than in ionophore challenged suspensions, the ARIC value is taken as zero(not negative).

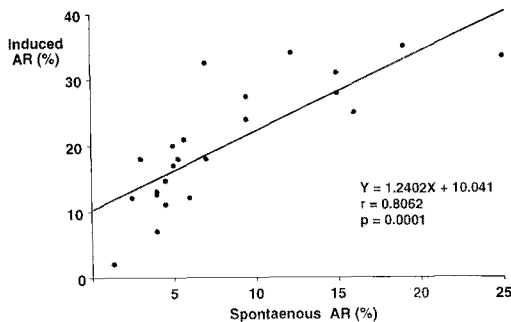


Fig. 1. Correlation between Spontaneous and Induced Acrosome Reaction(AR) in Fertile Men.

처리한 자발적인 침체반응율은 평균 8.3±5.91%이었으며, A23187 처리로 야기된 침체반응율은 평균 20.3±9.08%이었다. 동일 sample에서 야기된 반응율과 자발적인 반응율간의 차이를 나타내는 ARIC value는 평균 12.0±5.57%이었다.

불임남성 19명의 ARIC test 결과 자발적인 침체반응율은 평균 10.1±6.55%이었으며, 야기된 침체반응율은 평균 12.7±7.61%, ARIC value는

평균 2.6±4.96%이었다.

양군을 비교할 때 자발적인 반응율은 유의한 차이가 없었으나, 야기된 반응율과 ARIC value는 가임군이 불임군에 비하여 유의하게 높게 나타났다 (p=0.0079, p=0.0001).

가임군과 불임군에 있어 자발적인 반응율과 야기된 반응율간의 상관관계에 있어서는 양군 모두 통계적으로 유의한 상관관계를 나타냈다 (P=0.0001, P=0.0001: Fig. 1.).

3. SPA

가임남성과 불임남성의 SPA 결과는 Table 3. 에 나타난 바와 같다.

가임남성 23명의 SPA 결과 난자침투율(PR)은 평균 97.4±7.40%이었으며, 난자침투지표(PI)는 평균 5.4±2.88이었다.

불임남성 19명의 SPA 결과 난자침투율(PR)은 평균 64.9±36.20%이었으며, 난자침투지표(PI)는 평균 1.5±1.47이었다

양군을 비교할 때 난자침투율 및 난자침투지

Table 3. Results of SPA for Fertile and Subfertile Men

SPA	Fertile	Subfertile	Significance
Penetration Rate ^a	97.4±7.40 (70.0-100)	64.9±36.20 (0.0-100.0)	P=0.003
Penetration index ^b	5.4±2.88 (1.3-12.4)	1.5±1.47 (0.0-6.5)	P=0.0001

Mean ± SD(Range), ^a Ova Penetrated/Ova Inseminated(%), ^b Sperm Penetrated/Ova Inseminated

Table 4. Various threshold ARIC levels and SPA(PI) applied to fertile and subfertile groups in terms of capacity to predict fertility

Threshold	ARIC(%)				SPA(PI)			
	3	5	8.5	10	1	3	5	7
Sensitivity(%)	95.7	91.3	82.6	60.9	100.0	87.0	47.8	30.4
Specificity(%)	42.1	63.2	94.7	100.0	47.4	94.7	94.7	100.0
Positive Predictive Value(%)	66.7	75.0	95.0	100.0	65.7	95.2	91.7	100.0
Negative Predictive Value	88.9	85.7	81.8	67.9	100.0	85.7	60.0	54.3
False Positive Rate(%)	57.9	36.8	5.3	0.0	57.9	5.3	5.3	0.0

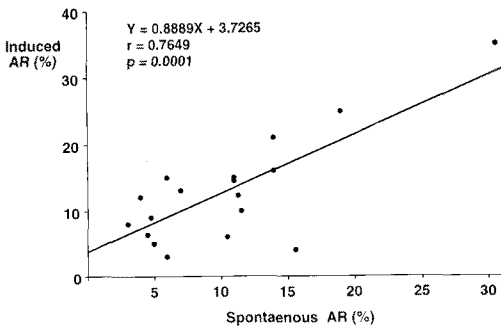


Fig. 2. Correlation between Spontaneous and Induced Acrosome Reaction(AR) in Subfertile Men.

표에 있어서 가임군이 불임군에 비하여 유의하게 높았다(p=0.003, p=0.0001).

4. SPA와 ARIC test의 수정능에 대한 예견치

SPA의 PI와 ARIC test의 ARIC value를 기준으로 수정능에 대한 예견치는 Fig. 3.과 Table 4.에 요약된 것과 같다.

ARIC test에 있어 cut-off 8.5(ARIC value)를 기준으로 생식능력(fertility)에 대한 예견치로 민감도(sensitivity)는 82.6%이었고, 위양성율(false positive rate)은 5.3%이었다.

SPA에 있어 cut-off 3.0(PI)을 기준으로 민감도(sensitivity)는 87%이었고, 위양성(false positive

rate)은 5.3%이었다.

양 검사방법의 차이를 알아보기 위하여 area under curve(AUC)를 비교할 때 ARIC test는 0.92이었고, SPA는 0.93으로 남성 생식능력을 예견하는데 있어서 두 검사법간 유의한 차이가 없었다(p=0.7864: Fig. 3.).

고 찰

불임 영역에 있어 남성측 요인(male factor)이 강조됨에 따라 남성의 수정능력을 예측할 수 있는 정확한 검사방법에 대하여 관심이 집중되었다.

과거에는 일반적인 정액 검사(semen analysis)를 통한 정자의 농도와 운동성이 보조생식술에 있어 수정능을 결정하는 가장 중요한 요인으로 인식됐으며, 이와 함께 엄격한 기준(strict criteria)에 의한 정자 형태학적 검사 등이 남성의 수정능력과 연관된 주요 요인으로 간주되었다(Kruger et al, 1988).

최근 들어 computer를 이용한 보다 정확하고 객관적인 정액 검사 방법이 도입되어 정자 운동성에 있어 curvilinear velocity나 lateral head displacement와 같은 질적으로 향상된 정자의 운동성이 수정능과 높은 상관 관계가 있음이 보고되고 있다(Holt et al, 1985). 그러나 정자의 농도와 운동성 및 형태학적 특징들에 주안점을 둔 일

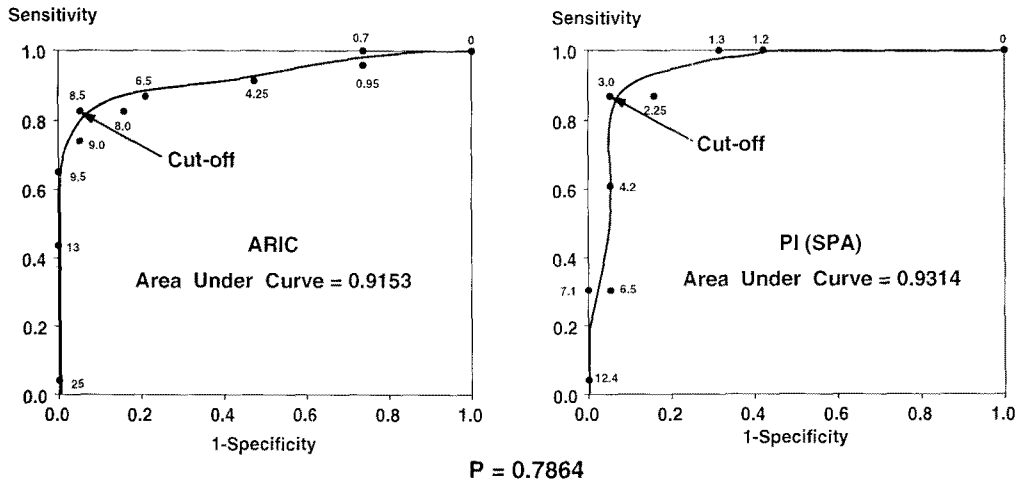


Fig. 3. Comparison of Receiver-Operator-Characteristic(ROC) Curve as a Predictor of Fertility between ARIC Value and Penetration Index(PI) of SPA.

반적인 정액 검사는 불임남성에 있어서도 정상 소견을 보이므로 수정능력에 대한 주요 결정요인을 나타내고 있지 않다.

반면 정자의 투명대와의 결합(zona binding)이나 첨체반응(acrosome reaction), 투명대 통과나 난황막과의 융합 등과 같은 정상 수정에 요구되는 복합적인 과정 수행의 실패가 남성 불임의 주요 요소로 작용하고 있다.

이러한 결합은 정상적인 정자 농도나 운동성을 지닌 남성에서도 나타나며, 정액검사상 비정상 소견을 보이는 남성에서 이들 기능이 정상으로 나타나고 있다. 그러므로 남성의 생식력 평가에 있어 좀더 특징적인 정자 기능 검사법에 대한 관심이 대두되게 됐다.

정자의 기능적 활성도를 검사하는 방법으로 human sperm zona-free hamster egg penetration assay(Yanagimachi et al., 1976), hypoosmotic swelling test(Jeyendran et al., 1984), hemizona assay(Oehninger et al., 1989), acrosin assay(Koukoulis et al., 1989) 등이 개발되어 인간 정자의 생식력 판정 및 체외수정시 수정율에 대한 예측도를 높이기 위한 검사법으로 발전되어왔다. 이들중 SPA는 정자의 수정능 부여(capacitation), 난자 세포막 통과 및 난자 세포질 내로의 함입등과 같은 일련의 여러 과정을 체외에서 평가하는 방법으로 널리 사용되어 왔다. 그러나 SPA는 여러 제한점을 지니며, 특히 시행 방법이 복잡하고 시간과 경비 소요가 많은 단점을 지니고 있다. 최근에는 정상

수정의 선결 조건인 정자 첨체반응정도가 직접적으로 정자의 수정능과 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다.

정자의 첨체반응은 생리학적 지식이 축적됨에 따라 난포액(Tesarik, 1985; Suarez et al., 1986)이나 oocyte-cumulus complex(Stock et al., 1989), 투명대(Cross et al., 1988) 등과 같은 생리학적 요소들이나 calcium ionophore A23187(Tesarik, 1985)과 같은 화학제제들을 이용하여 체외에서 유발시킬 수 있다.

그러나 인간정자의 첨체부위는 일반 현미경으로 관찰하기에는 크기가 너무 작기 때문에 오랫동안 인간정자의 첨체부위를 관찰하는 일반적인 손쉬운 방법이 없었다. 전자현미경을 이용한 인간정자의 첨체부위관찰이 효과적인 방법이 되겠으나 일상적인 검사로 사용하기에는 어려운 점이 많다. 이런 이유들로 인해 인간정자의 첨체부위를 관찰할 수 있는 방법이 연구되었으며 triple staining(Talbot & Chacon, 1981), monoclonal antibodies(Wolf et al., 1985), 첨체의 각기 다른 부위에 친화력이 있는 pisum sativum agglutinin(Cross et al., 1986)이나 peanut agglutinin(Mortimer et al., 1987)과 같은 fluorescein isothiocyanate(FITC)-labeled lectins 등을 사용하는 방법이 개발되었다. 이러한 방법들은 실험실 상에서 임상적으로 쉽게 이용할 수 있으며 전자 현미경적인 관찰과 유사한 정보를 제공하고 있다. 일반적으로 FITC-PSA를 이용한 염색법은 간단하며 인간 정자의 첨체관찰에 있어 재현성이 높게 보고되고 있다

(Cross et al, 1986). 정자의 침체반응 유발 물질 중 가장 강력한 반응을 나타내는 ionophore A 23187과 상기된 정자 염색법을 이용한 침체반응 분석법은 다른 여러 정자 기능 검사법과 비교하여 특별한 재료나 기술이 필요 없이 접근할 수 있는 경제적인 방법으로 알려지고 있다(Cummins et al, 1991).

본 연구에서 FITC-PSA를 이용한 ARIC test를 실시한 결과 가임군과 불임군의 자발적인 반응을(spontaneous reaction rates)과 야기된 반응을(induced reaction rates)간의 상관관계에 있어서는 양군 모두 통계적으로 유의성을 나타냈으며, 양 반응간의 차이를 나타내는 ARIC value는 가임군이 높게 나타나므로 생리적인 자극에 반응하여 야기되는 침체반응 정도가 가임능력과 유의한 상관관계가 있음(Tesarik, 1989)을 확인할 수 있었다.

Cummins 등(1991)은 ARIC test의 남성의 수정능을 예측하는 정도에 있어 3시간 전 배양 후 가임군과 불임군의 ARIC value는 각각 평균 29.7%, 11.5%이었고, 수정능을 예측하는 정도에 있어 ARIC value 10%를 기준으로 민감도(sensitivity)는 85%, 특이도(specificity)는 54% 이었으며, 특히 ARIC value가 5%이하인 경우 체외수정시 정자 처리에 있어 pentoxifylline과 같은 정자 기능항진제의 처리가 필요하다고 보고하였다.

Yovich 등(1994)은 Cummins 등(1991)과 동일한 방법을 사용하여 ARIC test의 수정능을 예측하는 정도에 있어 민감도는 56%, 특이도는 82.6%이었고, ARIC value가 낮았던 환자에 있어 체외수정시술시 pentoxifylline을 처리한 결과 전반적인 수정율의 증진을 보였으며, pentoxifylline을 처리한 ARIC test에서 ARIC value에 큰 진전이 없었던 환자에서는 정자 기능항진제를 사용한 체외수정시술에서도 수정율이 향상되지 않았다고 보고하였다.

본 연구에서 가임군과 불임군의 ARIC value는 각각 평균 12%, 2.6%이었고 수정능 예측에 있어 ARIC value의 여러 cut-off를 비교한 결과 10%를 기준으로 하였을 경우 민감도 및 특이도는 각각 60.9%, 100%이었으나, 8.5%를 기준으로 하였을 경우 각각 82.6%, 94.7%로 더욱 신뢰성 있는 예견치를 나타냈으며, ARIC value가 5%이하로 낮게 나타나는 결과는 가임군에서는 8.7%이었으나 불임군에서는 70%로 높은 비율이 극히 저조한

ARIC value를 나타냈다.

본 연구와 다른 연구자들(Cummins et al., 1991; Yovich et al., 1994)의 결과를 비교할 때 실험기법상이나 환자군의 차이에 따라 결과 해석 및 정상역의 설정이 조정되어야 함을 알 수 있으며, 불임군의 상당수에서 cutoff 이하의 극히 저조한 ARIC value가 관찰됨에 따라 보조생식술을 시술함에 있어 환자선정 및 치료 방향 설정에 ARIC test가 유용한 정보를 제공하는 것으로 생각된다.

본 연구에서 SPA와 비교시 남성의 수정능 예측에 있어 ARIC test는 음성 예측도, 민감도에서는 다소 낮은 결과를 보였지만 양성 예측도나 특이도에서는 차이가 나타나지 않았고 ROC curve 상 두 검사 방법간 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그리고 각 검사법의 특성을 고려하여 가임군과 불임군 개개인을 ARIC value와 난자침투지표를 기준으로 동시에 비교하였을 때 단 1예에서도 기준을 벗어난 경우가 관찰되지 않았다.

남성의 생식력 평가에 있어 임상적으로 시행이 간편하고 경제적인 방법을 적정화시키기 위한 목적으로 본 연구를 실시한 결과 ARIC test는 3시간 정도 정자의 수정능획득(capacitation)을 위한 전 배양 시간을 포함하여 총 5시간 정도면 결과를 알 수 있으며, 햄스터와 같은 특별한 재료가 필요치 않는 경제적인 방법으로 인간 정자의 수정능에 대한 SPA와 동일한 정보를 제공한다.

본 연구에서는 정자 침체부위 관찰을 단순화하여 오차를 줄이기 위해 정자의 생사염색과 같은 복잡한 과정을 실시하지 않았으나 정자 처리 최종 단계에서 percoll을 이용하여 70-80%의 운동성 정자를 회수하여 염색을 실시했으며, 비정상적인 침체형태를 지닌 정자는 counting에서 배제함으로 평가에 정확도를 기했다. 그러나 퇴행성 침체반응 정자의 유입은 정자의 기능평가에 있어 큰 변이 요소로 작용할 수 있으므로 최근 본 교실에서는 정자 생사염색법을 도입하여 ARIC test를 개선하는 방법을 진행 중이다.

ARIC test의 시행상 주요한 단점은 검사 결과가 정자 농도에 제한을 받는다는 점이다. Cummins 등(1991)은 정자 처리 후 적어도 $2.0 \times 10^5/\text{ml}$ 이상의 운동성 정자가 필요하다고 보고하였으며, 본 연구 결과에서도 최초 정액에 운동성 정자가 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 이하인 경우 모든 처리 후에 사실상 ARIC 평가가 불가능하였다. 그러므로

ARIC test의 대상 범위를 넓히기 위해서는 소수의 정자를 회수할 수 있는 방법등이 개발되어야 할 것으로 사료된다.

본 연구결과 ARIC test는 SPA와 비교하여 경제적이며 간편하게 사용할 수 있는 방법으로 남성의 가임능력을 체외에서 평가할 수 있는 매우 유용한 진단 방법으로 사료된다. 또한 ARIC test와 SPA를 동시에 시행하게 될 때에는 상호 보완적인 성과를 거둘 수 있으므로 정자의 수정능 분석에 더욱 정확도를 기할 수 있으리라 생각된다.

결 론

본 연구에서 남성 불임증 검사 방법의 적정화와 상관관계를 알아보고, 정상 가임력을 설정하여 임상적 적용에 도움이 되고자 가임 남성 23명과 불임 남성 19명을 대상으로 SPA와 ARIC test를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정액검사 결과 가임군의 정자 농도는 $114.6 \pm 64.40 \times 10^6/ml$ 로서 불임군의 $61.3 \pm 46.50 \times 10^6/ml$ 에 비하여 유의하게 높게 나타났으나, 정액양, 정자운동성 및 생존지수(MI)는 각각 유의한 차이가 없었다.
 2. 가임군과 불임군 양군에서 자발적 침체반응율과 야기된 침체반응율간에 유의한 상관관계가 있었다.
 3. 가임군의 ARIC value는 $12.0 \pm 5.57\%$ 로서 불임군의 $2.6 \pm 4.96\%$ 에 비하여 유의하게 높았다.
 4. SPA결과 가임군의 난자 침투율(PR)은 $97.4 \pm 7.40\%$, 난자 침투지표(PD)는 5.4 ± 2.88 로서 불임군의 $64.9 \pm 36.20\%$, 1.5 ± 1.47 에 비하여 각각 유의하게 높았다.
 5. SPA의 난자 침투지수에 있어 정상 가임력을 3.0 이상으로 설정하여 SPA의 양성예측도, 음성예측도, 민감도 및 특이도는 각각 95.2%, 85.7%, 87.0%, 94.7%로 나타났다.
 6. ARIC value를 기준으로 정상 가임력을 8.5% 이상으로 설정하여 ARIC test의 양성예측도, 음성예측도, 민감도 및 특이도는 각각 95.0%, 81.8%, 82.6%, 94.7%로 나타났다.
 7. 인간 정자의 생식력 평가에 있어 ARIC test와 SPA 각 검사법간에 유의한 차이가 없었다.
- 이상의 결과로서 ARIC test는 남성의 수정능 평가에 있어 경제적이며 간편하게 이용할 수 있는 유용한 방법으로 남성인자의 원인 규명과 치

료 방향 설정에 크게 기여 할 수 있을 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

- Aitken RJ, Elton RA: Significance of Poisson distribution theory in analysing the interaction between human spermatozoa and zona-free hamster oocytes. *J Reprod Fertil* 1984, 72, 311.
- Bedford JM: Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol Reprod* 1983, 28, 108.
- Byrd W, Wolf DP: Acrosomal status in fresh and capacitated human ejaculated sperm. *Biol Reprod* 1986, 34, 859.
- Calvo L, Vantman D, Banks SM, Tezon J, Koukoulis GN, Dennison L, Sherins RJ: Follicular fluid-induced acrosome reaction distinguishes a subgroup of men with unexplained infertility not identified by semen analysis. *Fertil Steril* 1989, 52, 1048.
- 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.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW: Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res* 1986, 15, 213.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW: Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. *Biol Reprod* 1988, 38, 235.
- Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL: A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. *J Androl* 1991, 12, 98.
- Fenichel P, Donzeau M, Farahifar D, Basteris B, Ayraud N, Hsi B: Dynamic of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1991, 55, 994.
- Henkel R, Muller C, Miska W, Gips H, Schill WB: Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro. *Hum Repro* 1993, 8, 2128.
- Hirsch I, Gibbons WE, Lipshultz LI, Rossavik KK, Young RL, Poindexter AN, Dodoson MG,

- Findley WE: In vitro fertilization in couple with male factor infertility. *Fertil Steril* 1986, 45, 659.
- 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.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984, 70, 219.
- 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.
- 김석현, 방명걸, 신창재, 김정구, 문신용, 이진용, 장윤석: 한국인 남성을 대상으로 한 햄스터 난자 침투 분석법의 정상 가임역 설정. 대한 불임학회지 1991, 18, 63.
- Koukoulis GN, Vantman DJ, Dennison L, Banks SM, Sherins RJ: Low acrosin activity in a subgroup of men with idiopathic infertility does not correlate with sperm density, percent motility, curvilinear velocity, of linearity. *Fertil Steril* 1989, 52, 120.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S: Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988, 49, 112.
- 이용빈: 소의 인공수정. 가축인공수정요론. 서울: 선진문화사, 1884, 4, 106.
- McClure RD, Tom RA, Dandekar PV: Optimizing the sperm penetration assay with human follicular fluid. *Fertil Steril* 1990, 53, 546.
- Mortimer D, Curtis EF, Miller RG: Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosome membrane of the human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1987, 81, 127.
- Oehninger S, Coddington CC, Scott R, Franken DA, Burkman LJ, Acosta AA, Hodgen GD: Hemizona assay: assessment of sperm dysfunction and prediction of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1989, 51, 665.
- Pampiglione J, Tan S, Campbell S: The use of the stimulated acrosome reaction test as a test of fertilizing ability in human spermatozoa. *Fertil Steril* 1993, 59, 1280.
- Rogers BJ: The sperm penetration assay: Its usefulness reevaluated. *Fertil Steril* 1985, 43, 821.
- 신창재, 장윤석: 인간정자의 수정능부여 및 햄스터 난자 침투에 영향을 주는 인자들에 관한 연구. 대한산부회지 1990, 33, 954.
- 신창재, 방명걸, 이진용, 장윤석, 정영채, 김창근: 햄스터 난자 침투 분석법에서 대조표준 정자로서 황소정자의 유용성에 관한 연구. 대한 산부회지 1990, 33, 1758.
- Stock CE, Bates R, Lindsay KS, Edmonds DK, Fraster LR: Human oocyte-cumulus complexes stimulate the human acrosome reaction. *J Reprod Fertil* 1989, 86, 723.
- Suarez SS, Wolf DP, Meizel S: Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res* 1986, 14, 107.
- Talbot P, Chacon RS: A triple stain technique for evaluating normal acrosome reaction of human sperm. *J Exp Zool* 1981, 215, 201.
- Tesarik 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.
- Tesarik J: Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon. *Human Reprod* 1989, 4, 957.
- Wolf DP, Bold J, Byrd W, Bechtol KB: Acrosome status evaluation in human ejaculated sperm with monoclonal antibodies. *Biol Reprod* 1985, 32, 1157.
- 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 Reprod* 1976, 15,

471.

- Yovich JM, Edirisinghe WR, Yovich JL: Use of the acrosome reaction to ionophore challenge test in managing patients in an assisted reproduction program: a prospective, double blind, randomized controlled study. *Fertil Steril* 1994, 61, 902.
- Zaneveld LJD, De Jonge GJ, Anderson RA, Mack SR: Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 1991, 6, 1265.
-