Swim-up, Percoll, Sil-Select를 이용한 정자처리법에 의한 정자회수율, 운동성 및 체외수정율의 비교분석

하정희 · 엄기붕* · 정형민* · 정미경 · 김현규 · 고정재* · 윤태기* · 차광열*
차병원 여성의학연구소, 포천중문의과대학교*

Comparison of Sperm Motility, Recovery Rate, and Fertilization Rate using three different sperm preparation methods: Swim-up, Percoll, Sil-Select

J.H. Ha, K.B. Oum*, H.M. Chung*, M.K. Chung
H.K. Kim, J.J. Ko*, T.K. Yoon*, K.Y. Cha*
Infertility Medical Center, CHA General Hospital
College of Medicine, Pochon CHA University*

=Abstract=

It is well known that discard of seminal plasma from the semen and separation of motile sperm should be preceded before insemination for IUI or IVF. Till now, more than ten kinds of semen treatment methods have been developed. Of those, swim-up and Percoll methods have been used widely in ART laboratories as a routine semen treatment methods because of its advantages. However, there are reports that Percoll can make a genetic trouble because of its chemical structure and therefore the necessity has been arisen to substitute Percoll for other equivalent materials.

This study was performed to evaluate the effects of three different sperm preparation methods (swim-up, Percoll and Sil-Select) on sperm motility, sperm recovery rate and fertilization rate. Also, the feasibility of using Sil-Select instead of Percoll in ART was evaluated. Each semen samples were divided into three fractions and motile sperm were recovered by swim-up, Percoll and Sil-Select gradient centrifugation methods. Normal and sub-normal criteria of fifteen semen samples and seventeen IVF cycles were included in these study.

As results, no significant difference was found in sperm recovery rate in normal semen treated by a Swim-up, Percoll and Sil-Select method (13.2×10^6, 17.5×10^6 and 17.7×10^6 respectively). The initial sperm motility was 61.9% and this increased to 87.1%, 92.6% and 89.5% through Swim-up, Percoll and Sil-Select treatment, respectively. Higher motility was observed in Percoll and Sil-Select treated groups (81.5%, 79.2%, respectively) than swim-up group (66.8%) after incubation for 24hrs. In sub-normal group, sperm recovery rates were higher in Sil-Select group (2.9×10^6) than Percoll gradients group (1.8×10^6). In IVF cycles, the outcomes of fertilization using sperm treated by swim-up and Sil-Select group were similar (82.2%, 79.7% respectively).

In conclusion, our results indicate that Sil-Select can be used as a substitute material for sperm preparation instead of Percoll.

Key words : semen, motile sperm, swim-up, Percoll, Sil-Select

서 론

체외수정 (in vitro fertilization, IVF)이나 인공수정 (Artificial insemination)등의 생식보조시술 (Assisted Reproductive Technology, ART) 을 실시하기 위해서는 체외에서 정액을 처리하여 운동성이 있는 정자를 분리하는 과정이 필수적이다. 정액처리과정에서는 정액 및 세포잔여물과 운동성 있는 정자가 분리되고 정자의 수정능력획득 등이 시작되는데, 현재까지 Swim-up방법, Percoll 등의 물질을 이용한 분리방법등 10여가지 이상이 정자의 처리법으로 개발되어있다.

이중에서 비교적 정액처리방법이 간단하고 운동성이 있으며 정상적인 형태를 가진 정자의 회수에 효율적인 Swim-up방법이 보편적으로 사용되고 있는데, 이 방법은 정액양, 정자수, 정자의 운동성이 정상인 경우에는 효과적이지만 희소정자증 (Oligozoospermia)이나 정자무력증 (Asthenozoospermia)과 같은 남성불임에서 얻어진 정액인 경우에는 그 효용성은 낮은 것으로 보고되고 있다 (Ohashi et al., 1992). 그러므로 남성불임의 요인이 있는 환자의 정액을 처리할 때 정자의 회수율을 높이기 위하여 비중의 차이를 통한 원심분리를 실시하여 운동성 정자를 회수하는 Percoll중층분리방법이 많이 이용되는데, Percoll은 운동성이 있는 정자의 회수율이 높은 반면에 정액을 처리할 때 Percoll내에 들어 있는 조정되지 않은 물질이 정자와 함께 난자 내로 들어가서 유전학적인 문제를 일으키는 것으로 최근에 알려진 바 있다. 이러한 Percoll의 문제점 때문에 정액의 중층분리 방법을 실시할 때, Percoll의 장점을 가지면서 Percoll을 대체할수 있는 물질의 필요성이 대두되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 중층분리방법을 실시함에 있어서 Percoll과 유사한 물질로서, Bio-silane이 코팅된 silica particle인 Sil-Select를 Percoll의 대체 물질로 사용할 수 있는지의 여부를 동일한 정액표본을 대상으로 분획을 만들어서 Swim-up, Percoll 및 Sil-Select로 정액을 각각 처리하고 처리된 정액의 운동성과 회수율을 비교하였으며, 처리된 정자를 동일한 환자의 체외수정에 시도하여 수정율과 수정란의 발달상황을 상호 비교하여 정자처리에 있어서 Swim-up방법과 중층분리방법의 효율을 비교하고 또한 Percoll의 대체물질로서 Sil-Select를 사용할 수 있는지를 검토하여 다소의 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

대상 및 방법

1. 연구대상

본 차병원 여성의학연구소에 내원한 환자 중에서 세계보건기구 (WHO)의 기준에 의하여 정액양 2.0ml이상, 정자수 20×10^6/ml이상, 운동성이 50%이상의 정상적인 정액상을 보이는 11명의 환자의 정액과 정액양과 정자수, 정자의 운동성이 정상보다 떨어지는 비정상적인 정액상을 보이는 4명의 환자로부터 정액을 채취하여 시행하였고, 체외수정 시술은 총 17례를 대상으로 시행하였다.

2. 연구방법

1)정자의 처리방법

정상정액상을 보이는 환자의 정액을 3등분하여 Swim-up, Percoll, Sil-Select방법으로 처리하였

고, 비정상정액상을 보이는 정액일 경우에는 2등분하여 Percoll과 Sil-Select방법으로 처리하였다. 그리고 체외수정을 실시할 때에는 Swim-up과 Sil-Select로 정액을 처리하여 수정을 유도하였다.

① Swim-up방법

액화된 정액을 15ml의 시험관에 옮긴 후 3ml의 Bovine serum albumin (0.3%, w/v)이 첨가된 Ham`s F-10 을 넣어 잘 섞은 후 300G에서 10분간 원심 분리를 하였다. 상층액을 제거한 후에 정자괴를 잘 풀고 그 위에 2ml의 동일한 배양액을 넣고 다시 300G에서 5분간 원심 분리를 하였다. 상층액을 제거하고 0.3ml의 Ham`s F-10을 조심스럽게 올려놓은 후 CO_2배양기내에서 40분에서 1시간 동안 배양시킨 후 상층부분 0.2ml을 취하여 운동성있는 정자를 회수하였다.

② Percoll gradients방법

10배로 농축된 Ham`s F-10용액과 Percoll (Pharmacia, Sweden)을 1:9로 혼합하여 등장의 Percoll용액을 제조한 후 40%, 80%의 Percoll 용액을 준비하고 시험관에서 2개의 중층을 만들었다. 맨위에 액화된 정액을 올려놓은 뒤 250G에서 20분간 원심 분리한뒤 정자괴를 제외한 상층액을 제거하였다. 정자괴를 다시 bovine serum albumin (0.3%, w/v)이 첨가된 Ham`s F-10으로 세척한 후 상층액을 제거하고 정자괴에 배양액 0.2ml을 넣어 운동성있는 정자를 회수하였다.

③ Sil-Select방법

Sil-Select kit (FertiPro, Belgium)의 상층용액과 하층용액을 1ml pipet을 이용하여 15ml의 시험관의 밑바닥에 하층과 상층용액을 넣어 중층을 만들고 액화된 정액을 그 위에 올려놓은 뒤 350G에서 20분간 원심분리를 하였다. 이후의 과정은 Percoll과 동일하게 시행하였다.

2) 체외수정

다배란유도 후 질식초음파를 이용하여 질식난포천자법으로 난자를 채취하였고 채취된 난자는 성숙, 미성숙, 혹은 퇴행성 난자 등으로 분류하여 성숙된 난자는 CO_2 배양기내에서 5-6시간의 전배양을 실시한 후 미리 준비된 정자로 수정을 시도하였고, 이때 배양액은 P-1배양액을 사용하였다. 미리리터당 100,000의 정자를 가한 후 약 18시간 후에 투명대 주위의 난포 세포를 제거한 후 두 개의 전핵을 관찰하여 정상적인 수정 (fertilization)이 되었는지 확인하였다. 수정된 난자는 2-3일 배양 후에 수정란 이식을 실시하였다.

3) 정자의 농도 및 운동성측정

액화직후와 정자처리 후로 나누어 동일한 정액 표본을 현미경적을 사용하여 2명의 생물학자 (biologist)가 Markler chamber를 이용하여 육안으로 검경하여 측정하였고 CASA (Computer Aided Semen Analysis)를 사용하는 경우에는 Hamilton Thorn (HTM-IVOS Version 10.6, Hamilton thorn research Co., USA)을 이용하여 측정하고 두 가지 결과를 비교하여 평균값을 구하였다.

3. 유의성 검정

본 연구의 결과는 Student`s T-test와 ANOVA test로 유의성을 검정하였다.

결　　과

본 연구에 사용된 총 15개의 정액과 17례의 체외수정 결과로서 정상정액상 (n=11)을 보이는 동일한 환자의 정액을 3등분하여 Swim-up, Percoll 및 Sil-Select방법으로 처리한 후의 정자의 회수율을 보면, 최초에 총 정자수가 149.5×10^6이었던 것이 처리 후에는 각각 13.2×10^6, 17.5×10^6, 17.7×10^6으로서, Swim-up군 보다 Percoll과 Sil-Select군에서의 정자회수율이 높았다 (Table 1). 회수된 정자의 운동성을 보면 3군 모두 최초에 61.9%이던 것이 2시간 후에는 각각 87.1%, 92.6%, 89.5%이였고, 24시간 배양 후에는 66.8%, 81.5%, 79.2%로서 Percoll군과 Sil-Select군으로 정자를 처리했던 경우가 swim-up으로 처리한 경우보다 24시간 배양 후의 정자의 운동성의 변화가 적었다 (Table 3).

비정상정액군 (n=4)에서는 2군으로만 나누어 Percoll 과 Sil-select방법을 비교를 하였는데, 정자의 회수율은 최초에 총정자수가 14.6×10^6이었던 것이 처리 후 각각 1.8×10^6, 2.9×10^6으로서 Percoll 군 보다 Sil-Select 군의 정자의 회수율이 높았다 (Table 2). 회수된 정자의 운동성을 보면, 최초에 16.0%이었던 것이 2시간 후에는 79.5%, 74.0%, 24시간 배양 후에는 67.8%, 65.3%로서 양군간의 차이는 보이지 않았다 (Table 3).

체외수정 시에 동일한 환자의 정액을 2등분하여 Swim-up과 Sil-Select로 처리하고 수정을 유도했던결과로서, 정자의 회수율은 최초에 199.5×10^6의 총 정자수가 처리 후 각각 12.6×10^6, 15.2×10^6으로서 Sil-Select군이 정자의 회수율은 높았으며 회수된 정자의 운동성을 보면 최초 47.4%이었던 것이 처리 후 96.4%, 97.0%로서 두 군간의 차이는 없었다 (Table 5). 처리한 정자를 동일한 환자의 난자 군에 나누어 체외수정에 시도한 결과 전체 17례 중 2PN과 3PN을 포함한 총 수정율은 Swim-up군이 82.2%, Sil-Select군은 79.7%로서 차이가 없었으며 수정란 이식 전 수정란의 형태를 분석한 결과 G1, G2의 좋은 수정란은 Swim-up군이 53.3%, Sil-Select군이 47.3%로서 양군간의 차이는 발견되지 않았다 (Table 6).

고 찰

인공수정 (IUI)이나 체외수정 (IVF) 등의 생식보조시술 (ART)을 실시할 때 정액의 처리법의 선택에 있어서 운동성 있는 정자의 회수율과 첨체반응율을 높여 수정율을 증가시킬 수 있는 정액처리법이 선택되어야 한다. 가장 이상적인 정액 처리 방법으로는 최소한의 배양액 내에서 정상형태의 운동성 정자를 최대한 많이 회수할 수 있어야 하고 정장 (seminal plasma), 세균, 백혈구 등을 완전히 제거할 수 있어야 한다 (Reddy et al., 1979 ; Berger et al., 1982).

현재까지 개발된 운동성 있는 정자의 분리방법으로는 정자의 이동성을 이용하여 세척된 정자괴 (pellet)에서 부유된 정자를 얻는 Swim-up방법 (Lopata et al., 1976)과 albumin density gradients 방법 (Ericsson, 1973, 1977)과 비중차이를 이용하여 정자를 분리하는 Percoll density gradients방법 (Kaneko et al., 1983), Percoll방법의 변형인 Mini-Percoll (Ord et al., 1990) 및 Ficoll separation방법 (Kaneko et al., 1980)등이 있으며 Column을 이용하여 분리하는 방법으로는 Glass-wool column filtration법 (Paulson & Polakoski, 1977)과 Sephadex gel column (Quinlivan et al.,1982)방법이 있고 운동성 있는 정자의 이동하는 각도를 이용하여 고안된 Wang`s tube법 (Wang et al., 1988;1991) 등 10여가지 이상이 개발되어 있다. 현재까지 개발된 정액처리방법 중 가장 보편적으로 사용되는 Swim-up방법은 정상정액군에서 정자로부터 정장성분을 분리하고 운동성이 있는 정자를 회수하는데 효과적이지만 (Ng et al., 1992), 비정상 정액상을 보이는 정자에 있어서 Swim-up방법으로 처리할 때 정자의 회수율이 현저하게 낮다는 보고가 있다 (Ohashi et al., 1992). 정상정액상을 보이는 정액군의 처리에만 좋은 효율을 보이는 Swim-up방법에 비하여 중층분리방법인 Percoll gradients방법은 비정상 정액상을 보이는 정액군에서도 정자처리 효과가 높은 것으로 알려져 있다 (Jaroudi et al., 1993). 두 방법을 비교해 보면, 회수된 정자의 운동성측

면에서는 직진 운동성을 갖는 질이 좋은 정자와 운동성 정자의 백분율은 Percoll로 처리한 군보다 Swim-up으로 처리한 군이 높지만 정자 회수율에서는 Percoll로 처리한 군이 높다고 보고되어있다 (Ng et al., 1992). Percoll을 이용하는 방법에는 Percoll을 한가지 농도로만 이용하는 continuous Percoll방법 (Iizuka et al., 1988)과 여러가지 농도로 층을 만드는 discontinuous Percoll방법 (Lessley et al., 1988 ; Hyne et al., 1986 ; McClure et al., 1989)이 있고 소량의 Percoll을 이용한 Mini-Percoll방법 (Ord et al., 1990, 1993)이 있다. 그중 continuous Percoll방법은 처리 후 정자괴에 정자이외의 다른 세포들이 많이 관찰되는 반면 여러 단계의 비중 차이를 이용한 discontinuous Percoll방법은 정자처리 후 정자괴에 운동성이 있는 정자 외에 다른 세포가 거의 발견되지 않고 continuous Percoll법에 비해 정자의 운동성과 회수율이 높다고 보고되었다 (Lizuka et al., 1988). 또한 Percoll층의 부피를 줄여 사용하는 Mini-Percoll방법도 희소정자증 환자인 경우의 정자처리에 효과적이라고 보고하였다 (Ord et al., 1990).

위에 열거한 여러가지 정자의 처리법중에서 그 특성을 고려하여 시험관아기 실시시에는 Swim-up방법 및 중층원심분리방법인 다단계의 Percoll중층원심분리법이 일반적으로 사용되어왔다. 그러나 Percoll이 정자처리에 있어서 다양한 장점을 갖기는 하지만 최근에 Percoll의 생산자인 Pharmacia사의 보고에 의하면 Percoll을 사용하여 시험관 아기를 위한 정자처리법에 적용하는 것을 권하지 않고 있다. 그 이유로서, PVP (polyvinylpyrrolidone)로 코팅된 silica particle인 Percoll은 PVP에 다소 독성이 있고 소금이 첨가된 배양액 내에서 PVP가 silica로부터 결합이 느슨해지는 경향이 있으며, 결국에는 silica gel이 용액 내에서 노출이 되면 정자 두부의 DNA구조에 영향을 줄 수 있고 운동성에도 변화를 주기 때문에 이를 체외수정이나 ICSI시술에 사용할 때 나쁜 영향을 줄 수 있다는 점을 들 수 있다. 따라서 Percoll의 장점을 가지면서 안정적인 물질의 개발이 필요하게 되었으며 최근에 몇 개의 회사로부터 Percoll을 대신하여 운동성정자의 중층원심분리법에 사용할 수 있는 물질들이 상용화되어 판매되고 있다. 그중의 하나가 Sil-Select로서, 이것은 Percoll이 야기할 수 있는 문제점을 극복할수 있는, PVP 보다는 비교적 안정되고 소금이 첨가된 배양액 내에서도 silica로부터 결합이 단단한 Bio-silane이 코팅된 silica particle이다.

본 연구에서는 이 Sil-Select를 Percoll의 대용물질로서 사용할수 있는지의 여부를 검토하고자 Sil-Select를 사용하여 정자를 처리하면서 또한 동시에 swim-up법과 기존에 사용되었던 Percoll법과 동일한 정액을 분획을 대상으로 정자의 회수율과 정자의 운동성 및 체외수정율을 비교하였다. Percoll과 Sil-Select의 사용상의 장단점을 간단히 보면 Percoll은 삼투압이 0에 가까워서 삼투압 조절이 필요하고 농도별로 다양하게 제조할 수 있는 반면 Sil-Select는 kit으로 구성되어있어서 미리 삼투압이 조절되어 있고 일정한 농도로 제조된 2종류의 용액으로서 필요에 따라 다양한 종류의 농도로 제조하기는 불편하지만 Percoll과 같이 원액을 조정하는 불편함이 없는 장점이 있다.

본 연구의 결과로서 정상정액군에서는 Swim-up방법으로 처리한 군이 Percoll과 Sil-Select로 처리한 군 보다 정자의 회수율이 낮았고 양군간의 유의한 차이는 없어서 기존에 보고되었던 바와 같이 중층원심분리법이 정자의 회수율면은 좋았다. 비정상정액군에서는 Swim-up방법을 사용할 경우에 너무낮은 정자회수율이 예상되어서 Percoll과 Sil-Select의 두 군으로만 나누어서 정액을 처리하였는데 Sil-Select군의 정자의 회수율이 높았다. 그러나 중층원심분리를 실시하는 경우에는 원심력의 크기 (G force)나 원심분리하는 시간 등에 따라서 결과가 달라지기 때문에 Sil-Select의 정자회수율이 우수하다고 할수는 없다고 사료된다. 정상정액군에서 회수된 정자의 운동성을 보면 3군 모두 처리직후에는 큰 차이가 관찰되지 않았으며, 24시간 배양 후에는 3군 모두 운동성은 저하되었으나 Percoll과 Sil-Select로 처리한 군은 Swim-up방법으로 처리한 군보다 운동성의 변화가 적었다. 결과를 종합하여 보면 Sil-Select방법은 정상정액군과 비정상정액 군에서 모두 Percoll gradients방법과 유사한 좋은 성적을 보였고 특히 비정상정액군에서는 Percoll보다 다소 좋은 정자회수율을 나타냈다.

정액처리 방법이 체외수정율에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험은 Percoll의 문제점으로 인하

여 Percoll은 사용하지 않고 Swim-up방법과 Sil-Select방법의 두군으로만 나누어서 정액을 처리한 후 동일한 환자의 난자에 체외수정을 시도했는데 2PN은 Swim-up으로 처리했던 경우가 수치상 다소 높았고 3PN은 Sil-Select로 처리한 경우가 다소 높았는데 3PN의 생성이 정자자체보다는 난자의 상태나 수정시키는 정자의 농도등에 영향을 많이 받는 것이 일반적으로 알려져있기 때문에 Sil-Select의 처리가 3PN을 높인 것으로는 사료되지 않으며 통계적으로도 차이는 관찰되지 않았다. 2PN과 3PN을 포함한 총 수정율은 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. 정자처리법이 난자의 발달상황에 영향을 비치는지를 알아보고자 동일한 시간동안 수정란을 배양한 후 수정란이식직전에 수정란의 형태적 분석을 실시하였는데, G1과 G2등급의 좋은 수정란의 개수 등은 두군에서 동일하게 관찰되어 정자의 처리법에 따른 수정란의 질적 수준도 두 군에서 차이가 없었다.

본 연구의 결과로서 Sil-Select를 사용한 중층분리방법은 정상정액군과 비정상정액군의 정액처리 시에 Percoll과 비슷한 결과를 내는 물질로 사료되며, 체외수정이나 인공수정 등의 정자처리법으로 사용하여 운동성이 좋은 정자의 회수율을 높여 Swim-up만을 사용하는 것에 비해 수정율과 임신율을 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다.

결　　론

본 차병원 여성의학연구소에서는 보다 효율적인 정자처리법을 수립하기 위하여 현재까지 사용되었던 Percoll을 대체할 수 있는 물질을 찾고자 Sil-Select를 사용하였으며 다른 정자처리법과 비교분석해 보았다. 즉 Swim-up, Percoll 및 Sil-Select로 동일한 환자의 정액을 3등분하여 처리한 후 정자의 운동성 및 회수율을 비교하였고, 정자처리방법에 따른 체외수정에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Swim-up방법과 Sil-Select방법으로 정액을 처리한 후 동일한 환자의 난자에 체외수정을 시도하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상정액군 (n=11)에서 회수된 정자는 Swim-up으로 처리한 군이 $13.2 \pm 13.1 \times 10^6$, Percoll로 처리한 군이 $17.5 \pm 14.3 \times 10^6$이고 Sil-Select로 처리한 군이 $17.7 \pm 12.2 \times 10^6$로서 Percoll과 Sil-Select로 처리한 군의 정자의 회수율이 Swim-up군 보다 높았다 ($p < 0.05$). 회수된 정자의 운동성은 Swim-up으로 처리한 군이 87.1±16.3%, Percoll로 처리한 군이 92.6±1.9%, Sil-Select로 처리한 군은 89.5±6.9%이며, 24시간 배양 후 정자의 운동성은 각각 66.8±18.0%, 81.5±10.5%, 79.2±14.3%로서 운동성이 저하되었으나 Percoll과 Sil-Select로 처리한 군이 Swim-up으로 처리한 군 보다 정자의 운동성 변화가 적었다.

2. 비정상정액 군 (n=4)에서 회수된 정자는 Percoll로 처리한 군이 $1.8 \pm 1.6 \times 10^6$이고 Sil-Select로 처리한 군은 $2.9 \pm 3.0 \times 10^6$으로서 Sil-Select로 처리한 군의 정자의 회수율이 높았다 ($p < 0.05$). 그리고 회수된 정자의 운동성을 보면 Percoll로 처리한 군은 79.5±21.3%이고 Sil-Select로 처리한 군은 74.0±16.7%이며, 24시간 배양 후 정자의 운동성은 각각 67.8±22.1, 65.3±12.5%로서 양군간의 유의한 차이는 없었다.

3. 체외수정에서는 정액을 Swim-up과 Sil-Select방법으로 처리하고 수정을 유도하였는데 회수된 정자수는 각각 $12.6 \pm 3.1 \times 10^6$, $15.2 \pm 4.5 \times 10^6$으로서 Sil-Select로 처리한 군의 정자의 회수율이 높았다 ($p < 0.05$). 회수된 정자의 운동성은 각각 96.4±4.0%, 97.0±4.6%로서 양군간의 차이는 없었다. 처리된 정자를 체외수정 (n=17)에 시도한 결과 총 수정율은 Swim-up으로 처리한 군이 82.2%이고, Sil-Select로 처리한 군은 79.7%로서 유의한 차이는 없었고, 수정란의 형태를 분석한 결과를 보면 G1, G2의 좋은 수정란은 각각 53.3%, 47.3%로서 양군간의 차이는 발견되지 않았다.

이상의 연구결과로 정액처리방법인 Sil-Select는 인공수정이나 체외수정 시에 유용하게 이용될 수 있는 것으로 사료된다.

인용문헌

Berger RE, Karp LE, Williamson RA, Koehler J, Moor DE, Holmes LK :The relationship of pyrospermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as reflected in the sperm penetration assay. Fertil Steril 1982, 37, 557.

Berger T, Marrs RP, Moyer DL: Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. Fertil Steril 1985, 43, 268.

Ericsson RJ, Langevin CN, Nishimo M: Isolation of fraction rich in human Y sperm. Nature, 1973, 246, 421.

Iizuka R, Kaneko S, Kobanawa K, Kobayashi T: Washing and concentration of human semen by percoll density gradients and its application to AIH. Arch Androl 1988, 2, 117.

Jaroudi KA, Carver-Ward JA, Hamilton CJC, Sieck UV, Sheth KV: Percoll semen preparation enhances human oocyte fertilization in male-factor infertility as shown by a randomizes cross-over study. Hum Reprod 1993, 8(9), 1438.

Kaneko S, Moriwaki C, Sato H, Kobayashi T, Izuka R: Development multiple exposure photography method for analysis of sperm motility and preparation of washed sperm with Ficoll density gradients. JPN J Fertil Steril, 1980, 25, 491.

Kaneko S, Yamaguchi J, Kobayashi T, Izuka R :Separation of human X and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. Fertil Steril 1983, 40, 661.

Lessley BA, Garner DL: Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in percoll. Gamete Res 1983, 7, 49.

Lopata A, Patullo MJ, Chang A, James B :A method for collecting motile spermatozoa from human semen. Fertil Steril 1976, 17, 677.

McClure RD, Nunes L, Tom R : Semen manipulation ; improved sperm recovery and function with a two-layer percoll gradient. Fertil Steril 1989, 51, 874.

Ng FLH, Liu DY, Baker HMG : Comparison of percoll, mini-percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. Hum Reprod 1992, 7(2), 261.

Ohashi K, Kato M, Saji F, Tsutsui T, Watkmoto A, Tanizawa O : Preparation of oligozoospermic and asthenozoospermic semen for intrauterine insemination using the Sperm Prep semen filtration column. Fertil Steril 1992, 57(4), 866.

Ord Patrizio P, Marello E, Balmaceda JP, Asch RH : Mini-Percoll : A new method of semen preparation for IVF in severe male factor infertility. Hum Reprod 1990, 5(8), 987.

Ord T, Patrizio P, Balmaceda JP, Asch RH : Can severe male factor infertility be treated without micromanipulation Fertil Steril 1993, 60(1), 110.

Reddy JM, Stark RA, Zaneveld LJD : A higher molecular weight antifertility factor from human seminal plasma. J Reprod Fertil 1979, 57, 437.

Table 1. Effect of different sperm preparation method on sperm recovery rate ($\times 10^6$): normal semen (n=11)

	Swim-up	Percoll	Sil-Select
Initial	149.5±79.8	149.5±79.8	149.5±79.8
After treatment	13.2±13.1[a]	17.5±14.3[b]	17.7±12.2[c]

[ab] p=0.044
[ac] p=0.077

Table 2. Effect of different sperm preparation method on sperm recovery rate ($\times 10^6$): abnormal semen (n=4)

	Percoll	Sil-Select
Initial	14.6±8.8	14.6±8.8
After treatment	1.8±1.6	2.9±3.0

Table 5. Comparison of semen treatment results between Swim-up treated group and Sil-Select treated group

	Total sperm count ($\times10^6\pm$SD)		Motility (%$\pm$SD)	
	Initial	after treatment	Initial	after treatment
Swim-up	199.5±125.6	12.6±3.1[a]	47.4±13.6	96.4±4.0
Sil-Select	199.5±125.6	15.2±4.5[b]	47.4±13.6	97.0±4.6

[a]p=0.028

Table 6. Comparison of IVF outcomes between Swim-up treated group and Sil-Select treated group

	Swim-up	Sil-Select
No. of cycles	17	17
No. of inseminated oocytes	90	59
No. of fertilized embryos(%)	74 (82.2)[a]	47 (79.7)
2PN embryos(%)	69 (76.7)	42 (71.2)
3PN embryos(%)	5 (5.6)	5 (8.5)
1PN embryos(%)	2 (2.4)	1 (1.9)
No. of transferred embryos	45	38
No. of good grade embryos(%) (G1 and G2)	24 (53.3)[a]	18 (47.3)

[a]not significant

Table 3. Effect of different sperm preparation method on sperm motility (%) : normal semen (n=11)

	Swim-up	Percoll	Sil-Select
Initial	61.9±15.6	61.9±15.6	61.9±15.6
2hrs	87.1±16.3	92.6±1.9	89.5±6.9
24hrs	66.8±18.0	81.5±10.5	79.2±14.3

Table 4. Effect of different sperm preparation method on sperm motility (%) : abnormal semen (n=4)

	Percoll	Sil-Select
Initial	16.0±7.2	16.0±7
2hrs	79.5±21.3	74.0±16.7
24hrs	67.8±22.1	66.3±12.5