大韓不妊學會誌: 第29卷 第1號 2002
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 29, No. 1, 2002, 3

남성 불임의 진단 및 체외수정의 예후인자로서 정자 형태의 정밀 분석과 정자 첨체반응 및 햄스터 난자 침투 분석의 비교 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실[1], 서울대학교 의학연구원 인구의학연구소[2]

문신용[1,2] · 류범용[2] · 방명걸[2] · 오선경[1,2] · 이재훈[1] · 서창석[1,2]
김석현[1,2] · 최영민[1,2] · 김정구[1] · 이진용[1]

Comparison of Sperm Morphology Evaluation Using Strict Criteria, Acrosome Reaction Following Ionophore Challenge and Zona-free Hamster Ova Sperm Penetration Assay as Prognostic Factors in Diagnosis of Male Infertility and In Vitro Fertilization

Shin Yong Moon[1,2], Buom Yong Ryu[2], Myung Geol Pang[2], Sun Kyung Oh[1,2], Jae Hoon Lee[1], Chang Suk Suh[1,2], Seok Hyun Kim[1,2], Young Min Choi[1,2], Jung Gu Kim[1], Jin Yong Lee[1]

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine[1], Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center[2], Seoul National University, Seoul, Korea

Objective: This study was designed to investigate the interrelationship and clinical usefulness of sperm morphology by strict criteria (SM), acrosome reaction following ionophore challenge test (ARIC) and sperm penetration assay (SPA) using zona-free hamster ova as prognostic factors in in vitro fertilization.

Materials and Methods: Semen samples were provided by 83 patients undergoing IVF. We first evaluated the differences between normal fertilization group and poor fertilization group on three andrologic tests. Secondly, we analyzed the relationship between the three andrologic tests and in vitro fertilization on IVF settings. Finally, we evaluated the effectiveness of the three andrologic tests as the prognostic indicators for fertilizing ability.

Results: The fertilization rate of all men in the poor fertilization group was less than 30%; but there was no evidence that this poor fertilization was due to oocyte defects. The results of three andrologic tests were significatly higher in normal fertilization group. Fertilization rate (%) in vitro was highly correlated ($p<0.001$) with % normal sperm by SM, ARIC value (%), and SPA result. By using Receiver-Operator-Characteristic curve (ROC), we evaluated the effectiveness of these three tests. The sensitivity and specificity of SM, ARIC test and SPA in predicting fertilization potential in IVF setting were 76% and 75%, 84% and 90%, and 76% and 95%, respectively.

Conclusion: Our data suggest that the three andrologic tests can be reliable tools as prognostic factors of sperm fertilizing ability. Among these test, ARIC test and SPA gave more accurate information on fertilizing capacity. ARIC test was shown to have a predictive value for fertilizing

주관책임자: 문신용, 우) 110-744 서울특별시 종로구 연건동 28, 서울대학교 의과대학 산부인과
Tel: (02) 760-2384, Fax: (02) 762-3599, e-mail: shmoon@snu.ac.kr
*이 연구는 1995학년도 서울대학교 발전기금 일반 학술연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.

ability comparable to that of SPA that appears to be a simple and cost-effective addition to current andrology laboratory. Combined application of these three tests may give more information on predicting sperm fertilizing capacity.

Key Words: Sperm, Strict morphology, ARIC, SPA, IVF

과거 20년 동안 체외수정시술은 전세계적으로 활발히 시행되고 있으며, 불임 치료의 보편화된 시술 방법으로 인정되고 있다. 초기의 체외수정시술은 난관 요인을 중심으로한 여성측 원인에 의한 불임 치료법으로 국한되어 왔으나 최근에는 남성측 원인에 의한 불임, 원인불명의 불임 등 불임 환자의 영역이 확대됨에 따라 남성측 요인 즉, 정자의 수정능력을 정확히 평가하는 것이 임상적으로 중요한 의미를 지니게 되었다. 따라서 인간에 있어서 정자의 수정능력을 평가하는 검사법에 대한 많은 연구가 진행되어 왔으며, 특히 정자의 기능적 활성도를 검사하는 방법으로 human sperm zona-free hamster ova penetration assay (SPA),[1] hypoosmotic swelling test,[2] hemizona assay,[3] acrosin activity,[4] 정자의 첨체반응 분석[5] 및 정자 형태의 정밀 분석법[6] 등이 개발되어 일반적인 정액검사 (semen analysis)와 비교하여 체외수정시술시 수정율에 대한 예측도가 높은 검사법으로 보고되고 있다.

그러나 각 검사법들은 수정에 필요한 정자 수정능 획득 (capacitation), 투명대 (zona pellucida)와의 접촉에 따른 첨체반응 (acrosome reaction) 및 투명대와 난황막 (oolemma) 침입 후 남성전핵 (male pronucleus) 형성과 같은 일련의 수정 과정 중 일부분만을 평가하는 방법으로 어느 한 검사법만으로 정자의 수정능에 대한 모든 정보를 얻는 것은 사실상 불가능하다. 따라서 임상적으로 유용한 여러 검사법을 복합적으로 시행할 경우 정자의 수정능력에 대한 보다 폭넓은 정보를 얻을 수 있기 때문에 정자의 수정능력을 판정하는데 있어서 정확도를 높일 수 있다는 의견이 제시되었다.[7]

본 연구는 체외수정시술을 시행받는 남성 환자를 대상으로 정자 형태의 정밀 분석과 정자 첨체반응 유발인자인 calcium ionophore에 반응하여 나타나는 정자의 첨체반응 (acrosome reaction following ionophore challenge; ARIC)[8] 분석 및 SPA를 시행하여 각 검사법의 체외수정시술시 수정율에 대한 예측도를 비교 분석하고 상관관계를 규명함으로써, 각 검사법 간의 상호 보완성 여부와 체외수정시술시 수정율에 대한 예후지표로서의 유용성을 알아보기 위하여 시행하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 1995년 1월부터 10월까지 불임을 원인으로 서울대학교 병원 불임크리닉에서 체외수정시술을 받는 환자 중 83명을 임의로 선택하여 수정율 (배아이식에 적합한 배아수 / 수정시킨 총 난자수 × 100) 30%를 기준[9,10]으로 63명을 정상수정군으로, 20명을 비정상수정군으로 정의하여 연구 대상으로 하였다. 본 연구에 대한 동의서를 작성한 후 본 연구를 시작하였다.

2. 연구 방법

1) 과배란유도 및 체외수정

대상 환자에서 GnRH agonist (GnRHa; Decapeptyl, D-trp-6-LH, Ferring, Malmo, Sweden)를 사용한 황체기 장기투여법을 실시하여 과배란유도를 시행하였다. 과배란유도주기전 월경주기 제3일 오전 8시에 채혈하여 LH, FSH 및 E_2 농도를 측정하였으며, 질식 초음파 검사를 시행하여 골반 내 이상 유무를 확인하였다. 월경주기가 일정한 환자에서는 월경주기 제14일에 난포의 크기 및 배란 유무를 확인하여 월경주기 제21일에 GnRHa의 피하주사를 시행하였다.

GnRHa의 주사 후 월경이 있으면 월경주기 제3일에 뇌하수체의 기능 억제 유무를 확인하기 위하여 혈중 LH, E_2, P_4를 측정하여 LH <5 mIU/ml, E_2 50 pg/ml, P_4 <1 ng/ml인 경우 과배란유도를 시작하였다. 또한 월경주기 제3일에 질식 초음파를 시행하여 GnRHa에 의한 난소낭종이 발생하였거나 난관 수종이 있는 경우를 확인하여 질식 초음파 유도하에

질식천자를 실시하여 흡인 제거하였다. 월경주기 제3일에 과배란유도를 시작하였으며, 과배란유도제는 FSH (Metrodin, Serono, Switzerland)를 사용하였다. 과배란을 시작하는 날을 과배란유도 제1일로 하고, 제3일에는 오후 6시에 FSH 150~300 IU를 근육주사하면서 환자의 난소반응 상태 및 혈중 E_2 농도에 따라 과배란유도제 용량의 증감을 조절하였다. 과배란유도 제6일부터는 혈중 E_2 농도와 질식 초음파 검사를 시행하여 난포 성장을 관찰하였다. 우성난포 크기의 평균 직경이 18 mm 이상이거나 16 mm 이상인 난포가 3개 이상 관찰되면서 혈중 E_2 농도가 계속 상승하고, 직경 10 mm 이상인 난포 당 혈중 E_2 농도가 300 pg/ml 이상이면 hCG (Profasi, Serono, Switzerland) 10,000 IU를 근육주사 하여 배란을 유도하였다.

hCG 근육주사 36시간 후 질식 초음파 유도하에 난자를 채취하였다. 채취된 난자는 4~6시간 배양 후 percoll과 부유 (swim-up) 방법에 의하여 얻어진 정자로 체외수정을 시켰으며, 배아이식 직전인 수정 후 44~46시간에 정상수정율을 관찰하였다.

2) 정자 형태의 정밀 분석

(1) 정액검사

채취된 정액을 실온에서 30분간 방치하여 액화시키고 액화된 정액 중 10 ?l를 취하여 37℃로 미리 예열된 Makler counting chamber를 이용하여 정자 농도, 운동성 및 생존지수 (motility index; MI) 등의 일반적인 정액검사를 시행하였다. 정자의 생존지수는 이용빈[11]의 정자 생존지수 조견표에서 정자의 운동력 (kinetics)과 운동성 (motility)을 이용하여 분석하였다.

(2) Diff - Quik 염색

액화된 정액 10 ?l를 micro-pipette을 사용하여 70% ethyl alcohol로 세척, 건조한 슬라이드 위에 떨어뜨린 후 coverslip를 사용하여 얇게 펴고 실온에서 건조시켰다. 건조된 슬라이드를 Diff-Quik 염색액 (국제시약주식회사 16920, Japan)을 이용하여 염색하였으며, 염색 방법은 우선 슬라이드를 고정액에 15초간 담가서 고정한 후 염색액 I에 10초간 담가서 염색하고 과다한 염색액이 슬라이드에 남아 있지 않도록 흡수용지를 이용하여 염색액을 제거하였다. 이후 염색액 II에 5초간 담가서 염색한 후 증류수를 이용하여 잔류 염색액을 씻어내었다. 염색이 끝난 슬라이드는 실온에서 건조시킨 후 관찰하였다.

(3) 현미경을 이용한 정자 형태의 정밀 분석

슬라이드 상에 염색된 정자 형태의 관찰은 정자의 크기를 측정하기 위하여 ocular meter를 설치한 위상차현미경에서 ×1,000의 배율로 시행하였다. 정자의 형태에 따른 분류는 Kruger 등[6]의 기준에 의거하여 정자의 두부가 매끈한 타원형으로 잘 구분되며 첨체 (acrosome)가 정자 두부의 40~70%를 차지하고, 크기가 정자 두부의 1/2 이상 되는 세포질 방울 (cytoplasmic droplet)이 없으며, 정자 두부의 크기가 5~6 ?m × 2.5~3.5 ?m 및 정자의 목 부분이나 정자 미부에 결함이 없는 경우만을 정상으로 분류하였다.

각 슬라이드마다 200개 이상의 정자를 관찰하여 정밀 기준에 의한 정자의 정상형태비 (정상형태 정자의 백분율)를 산출하였다.

3) ARIC 검사

(1) Stock solution의 제조

Calcium ionophore A23187 (A23187; Sigma C-7522, USA) 1.0 mg을 382 ?l의 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma D-8779, USA)에 녹여 최종 농도 5 mM/L stock solution을 제조한 후 알미늄호일에 싸인 eppendorf tube에 20 ?l 씩 분주하여 -20℃에 보관하였다. 사용 당일 분주된 20 ?l의 stock sollution에 4.98 ml의 Ham's F-10을 첨가하여 최종 농도 20 ?M/L의 A23187 용액과 대조군으로는 4.98 ml의 Ham's F-10에 DMSO 20 ?l를 첨가한 용액을 제조하여 사용하였다. Hoechst 33258 (H33258; Sigma B-2883, USA)을 Ham's F-10으로 1 mg/ml의 농도로 조정한 후 알미늄호일에 싸인 eppendorf tube에 20 ?l 씩 분주하여 -20℃에 보관하였다. 사용 당일 분주된 stock solution을 Ham's F-10으로 희석하여 최종 농도 1 ?g/ml로 조정한 후 사용하였다. Fluorescein isothiocyanate-conjugated Pisum sativum lectin (FITC-PSA; Sigma L-0770, USA)을 증류수로 1 mg/ml 농도로 조정한 후 알미늄호일에 싸인 eppendorf tube에 100 ?l 씩 분주하여 -20℃에 보관하였다. 사용 당일 분주된 FITC-PSA 용액을 증류수로 희석 (1 : 9)하여 최종 농도 100 ?g/ml로 조정한 후 사용하였다.

(2) Ionophore Challenge

액화된 정액을 반분하여 SPA와 ARIC test를 시행하였으며, ARIC test용은 0.3% Human Serum Albumin (HSA; Sigma A-3782, USA)이 함유된 Ham's F-10으로 희석한 후 750×g로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 3 ml의 Ham's F-10 (0.3% HSA 함유)으로 희석한 후 750×g로 10분간 2차 원심분리하고 상층액을 제거한 후 정자괴 (sperm pellet)의 양을 고려하여 적당량의 Ham's F-10 (1.0% HAS 함유)으로 희석하여 1시간 부유시켰다. 부유 후 상층의 정자 부유액을 회수하여, 정자의 수정능 획득을 위하여 2시간 동안 37℃ 5% CO_2 배양기 내에서 추가 배양하였다. 배양 후 상층의 정자 부유액을 반분하여 각각을 동량의 20 ?M/L A23187 용액 (최종 농도 10 ?M/L)과 DMSO 용액으로 희석하여 30분간 37℃ 5% CO_2 배양기 내에서 배양하였다.

(3) 정자 염색 및 첨체반응 분석

배양 후 정자 부유액에 동량의 H33258 용액을 첨가하여 상온에서 어두운 상태를 유지하면서 7분간 염색하였다. 이후 1.5 ml의 정자 부유액을 phosphate buffered saline (PBS)으로 희석된 4 ml의 2% polyvynylpyrollidone (Sigma P-0930, USA) column 위에 올려놓고 750×g로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 정자괴를 Ham's F-10으로 희석하여 정자 농도가 20×10^6/ml 되게 조정하였다. 이후 20 ?l의 정자 부유액을 슬라이드 위에 떨구어 얇게 펴서 건조시킨 후 95% ethanol에서 5분간 고정하였다.

고정, 건조된 슬라이드 위에 FITC-PSA (100 ?g/ml) 100 ?l를 떨어뜨린 후 4℃ moist chamber에서 15분간 정치시켰다. 증류수로 염색액을 제거하고 건조시킨 후 정자에 염색된 형광이 사라지는 것을 방지하기 위하여 propyl gallate mountant로 봉입하였다. 슬라이드의 관찰은 mercury burner와 epi-illumination module이 장착된 Olympus 현미경하에서 ×1000의 배율로 H33258 염색에 의한 정자 생존 여부 관찰을 위하여 filter cube U를 사용하였고, FITC-PSA 염색에 의한 정자 첨체 부위 관찰을 위하여 filter cube B를 사용하였다.

두 장의 슬라이드 각각에서 200개 이상의 정자를 관찰하여 H33258이 염색되어 밝은 청색을 나타내는 죽은 정자와 정자 두부 전체가 염색되지 않았거나, 비정상적인 첨체 형태를 지닌 정자는 제외하고 첨체 부위가 완전히 염색된 것, 적도대 (equatorial segment) 부위가 염색되고 첨체 부위가 부분적으로 염색된 것, 적도대 부위만이 염색된 정자의 총 수에서 정상적인 투명대 (zona pellucida) 통과 및 난황막 (oolemma)과의 융합이 가능한 첨체내막 (inner acrosomal membrane)이 노출되고 온전한 적도대를 지닌 적도대 부위만이 염색된 정자[1]의 비율로 대조군과 A23187 처리군 각각에서 첨체반응율 (%)을 조사하였다.

A23187에 반응하여 첨체반응을 나타낼 수 있는 ARIC value는 A23187 처리군의 첨체반응율 (induced acrosome reaction rates)에서 대조군의 첨체반응율 (spontaneous acrosome reaction rates)의 차이로서 산정하였다. 몇몇 반응이 낮았던 경우에서 counting 가변성으로 인하여 A23187 처리군보다 대조군에서 첨체반응율이 높게 나타났다. 이들 경우에는 ARIC의 음성 (negative) 결과로서 ARIC value를 "0"으로 평가하였다.[8]

4) SPA

SPA의 시행 방법은 신 등[12,13]과 방 등[10]의 방법을 이용하여 시행하였다.

(1) 정자 처리

액화된 정액을 N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid (TES) 211 mM, hydroxymethyl amino methane (Tris) 96 mM, dextrose 11 mM, 1% penicillin-streptomycin 용액에 20% 신선 계란 노른자를 첨가하고 pH 7.4, 삼투압 290~320 mOsm/kg으로 조정한 TEST-yolk buffer (TYB)와 용량비 1 : 1로 서서히 혼합하였다. 이 혼합액을 냉장고에서 4℃까지 서서히 냉각시켜 42시간 동안 저온배양하여 정자의 수정능력이 획득되게 하였다. 그 후 4℃의 정액과 TYB 혼합액에 37℃의 Ham's F-10 (0.3% HSA 함유) 3 ml를 첨가하여 750×g로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 남은 정자괴에 Ham's F-10 (0.3% HSA 함유) 1 ml를 첨가하여 750×g로 5분간 2차 원심분리하였다. 이후 상층액을 제거하고 남은 정자괴에 Ham's F-10 (1.0% HSA 함유)을 추가하여 2시간 동안 37℃, 5% CO_2 배양기 내에서 부유시켰다.

(2) 투명대 제거 햄스터 난자의 준비

생후 12~16주된 암컷 햄스터를 대상으로 과배란

유도를 시행하여 투명대 제거 햄스터 난자를 준비하였다. 햄스터를 매 12시간마다 명암에 교대로 노출시키며 환경에 적응시킨 후 발정주기 제1일째 P-MSG (Sigma G-4877, USA) 35 IU를 복강 내로 주사하고, 발정주기 제3일째 오후에, hCG (Sigma C-1063, USA) 35 IU를 복강 내로 주사하여 과배란을 유도하였다. hCG 투여 15~16시간 후 경추탈구법 (cervical dislocation)으로 햄스터를 희생시키고, 복강을 열어 양측 난관을 분리하여 PBS (0.3% HSA 함유)가 담긴 배양접시에 옮긴 후 실체 현미경하에서 난관팽대부를 절단함으로써 난구체 (cumulus complex)가 흘러나오게 하였다. 난구체는 0.1% hyaluronidase를 포함한 PBS (0.3% HSA 함유)에서 제거하였으며, 투명대는 0.1% trypsin을 포함한 PBS (0.3% HSA 함유)에서 제거하였다.

(3) 수정

2시간 부유시킨 정자를 배양접시에 운동성 정자가 1×10^6/ml이 되도록 떨구어 37℃ 5% CO_2 배양기 내에서 환자 당 10개 이상의 투명대 제거 햄스터 난자와 0.3% HSA를 포함한 Ham's F-10에서 3.5시간 배양하여 수정시켰다.

(4) 고정, 염색 및 판독

수정 후 난자를 회수하여 신선한 배양액으로 3회 세척하여 난자에 과다하게 부착된 정자들을 제거한 후, 슬라이드 위에 소량 (5~10 ?l)의 배양액과 함께 난자를 옮겼다. Coverslip 주위 네 곳에 소량의 vaseline-paraffin 혼합액을 떨구고 슬라이드에 덮은 후 실체 현미경으로 관찰하면서 난자가 파손되지 않도록 조절하며 coverslip을 최대한 슬라이드 위에 눌렀다. 슬라이드를 고정액 (methanol : glacial acetic acid= 3 : 1)에 넣어 24시간 이상 고정시킨 후 0.25% acetic lacmoid로 염색하여 위상차현미경 ×1,000 배율하에서 정자의 난자 내 침투 여부를 관찰하였다.

이때 정자의 두부가 부풀었거나 남성전핵이 보이며 해당 정자의 미부가 난자 세포질 내에서 식별될 때 정자가 난자 내로 침투된 것으로 간주하였다. 모든 예에서 정자의 난자 침투 정도는 난자 침투율 (penetration rate; PR; 정자가 한 개 이상 침투된 난자수 / 수정시킨 총 난자수) 및 난자 침투지표 (penetration index; PI; 침투된 총 정자수 / 수정시킨 총 난자수)로 나타내었다.

3. 정자 형태 정밀 분석, ARIC 검사 및 SPA의 체외수정시 정상수정율에 대한 예견치

각 검사법의 체외수정시 정상수정율에 대한 임상적 예견도를 알아보기 위하여 Receiver-Operator-Characteristic (ROC) curve를 이용하였다. ROC curve 상에서 대상자 각각에서 나타났던 정상 정자 형태비와 PI 및 ARIC 값을 기준으로 각각의 수치에서 민감도 (sensitivity)와 위양성 (flase positive=1-specificity) 결과를 비교하였으며, 민감도가 높고 위양성이 낮은 점을 체외수정시 정상수정율을 예측하는 기준값 (cut-off)으로 설정하였다.

4. 통계 분석

연구 결과에 대한 통계학적인 분석은 student t-test, multiple regression analysis 등을 이용하였으며, ROC curve는 epistat 프로그램을 이용하였다. $p<0.05$인 경우 통계학적인 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 정액검사

정상수정군 63명의 정액검사 결과 정액양은 평균 2.5±1.0 ml 이었으며, 정자수는 평균 108.7±69.2×10^6/ml 이었다. 운동성 정자는 평균 69.4±17.1% 이었으며, 정자 생존지수 (MI)는 평균 46.1±18.7 이었다.

비정상수정군 20명의 정액검사 결과 정액양은 평균 2.9±1.2 ml 이었으며, 정자수는 평균 105.0±77.1 ×10^6/ml 이었다. 운동성 정자는 평균 47.5±24.3% 이었으며, 정자 생존지수 (MI)는 평균 30.9±23.4 이었다.

양군을 비교할 때 운동성 정자와 생존지수에 있어서 통계학적으로 유의한 차이를 보였다 ($p<0.01$) (Table 1).

2. 정자 형태의 정밀 분석

정자 형태의 정밀 분석 결과 정상수정군의 정상 정자 형태는 평균 15.7±8.4% 이었으며, 비정상수정군에서는 평균 7.5±5.3%로 통계학적으로 유의한 차이를 보였다 ($p<0.01$) (Table 2).

Table 1. Results of semem analysis for normal and abnormal fertilization groups in IVF

Semen parameter	Normal	Abnormal	Significance
No.	63	20	
Seminal volume (ml)	2.5±1.0 (0.8~3.5)	2.9±1.2 (1.0~6.0)	NS
Concentration ($\times 10^6$/ml)	108.7±69.2 (15.0~300.0)	105.0±77.1 (10.0~300.0)	NS
Motility (%)	69.4±17.1 (20.0~90.0)	47.5±24.3 (10.0~90.0)	p=0.0015
Kinetic	2.8±0.4 (1.0~4.0)	2.4±0.5 (1.0~4.0)	p=0.0153
Motility index	46.1±18.7 (7.5~80.0)	30.9±23.4 (5.0~80.0)	p=0.0038

Mean±SD (Range), NS: Not significant

Table 2. Results of strict sperm morphology for normal and abnormal fertilization groups in IVF

	Normal	Abnormal	Significance
% Normal sperm morphologic features	15.7±8.4 (2.0~40.0)	7.5±5.3 (0.0~19.0)	p=0.0001

Mean±SD (Range)

Table 3. Results of spontaneous and induced acrosome reactions and ARIC value for normal and abnormal fertilization groups in IVF

Acrosomal factor measured (%)	Normal	Abnormal	Significance
Spontaneous reaction	9.1±6.2 (2.0~25.0)	7.4±5.3 (1.0~24.0)	NS
Induced reaction	21.8±9.0 (2.0~39.0)	11.1±7.2 (1.8~30.0)	p=0.0001
Difference: ARIC value	12.7±6.1 (1.8~32.0)	3.9±3.9 (-3.0*~15.0)	p=0.00001

Mean±SD (Range), NS: Not significant, *More reaction was observed in control suspension than in ionophore-challenged suspensions, the ARIC is taken as zero (not negative).

3. ARIC 검사

정상수정군의 ARIC 검사 결과 DMSO만을 처리한 자발적인 첨체반응율은 평균 9.1±6.2% 이었으며, A23187 처리로 야기된 첨체반응율은 평균 21.8±9.0% 이었다. 동일 환자에서 야기된 반응율과 자발적인 반응율간의 차이를 나타내는 ARIC value는 평균 12.7±6.1% 이었다.

비정상수정군의 ARIC 검사 결과 자발적인 첨체반응율은 평균 7.4±5.3% 이었으며, 야기된 첨체반응율은 평균 11.1±7.2% 이었고 ARIC value는 평균 3.9±3.9% 이었다.

양군을 비교할 때 자발적인 반응율은 통계학적으로 유의한 차이가 없었으나, 야기된 반응율과 ARIC value는 통계학적으로 유의한 차이를 보였다 (p< 0.01) (Table 3).

4. SPA

정상수정군의 SPA 결과 난자 침투율 (PR)은 평균 92.7±20.2% 이었으며, 난자 침투지표 (PI)는 평균 5.0±3.2% 이었다.

비정상수정군의 SPA 결과 PR은 평균 47.9±33.7% 이었으며, PI는 평균 0.7±0.9% 이었다.

양군을 비교할 때 PR과 PI에 있어서 통계학적으로 유의한 차이를 보였다 (p<0.01) (Table 4).

5. 정자 형태의 정밀 분석, ARIC 검사 및 SPA의 체외수정율에 대한 예견치와 각 검사법간의 상관관계

정자 형태 정밀 분석법에 있어서는 cut-off 10.0%를 기준으로 민감도 (sensitivity)는 76.2% 이었고, 특이도 (specificity)는 75% 이었다.

Table 4. Results of SPA for normal and abnormal fertilization groups in IVF

SPA	Normal	Abnormal	Significance
Penetration rate[a]	92.7±20.2 (0.0~100.0)	47.9±33.7 (0.0~100.0)	p=0.00001
Penetration index[b]	5.0±3.2 (0.0~13.7)	0.7±0.9 (0.0~3.1)	p=0.00001

Mean±SD (Range), [a] Ova penetrated/ova inseminated (%), [b] Sperm penetrated/ova inseminated

Table 5. Correlation matrix among the fertilization rates, normal sperm morphology, ARIC value and penetration index in SPA for overall patient population (n=83)

	FR	SM	AV	PI
FR	1.00			
SM	0.45***	1.00		
AV	0.54***	0.47***	1.00	
PI	0.43***	0.53***	0.54***	1.00

*** p<0.0001, FR: Fertilization rates (%) in IVF, SM: Normal sperm morphologic feature (%), AV: ARIC value (%), PI : Penetration Index

ARIC 검사에 있어서는 cut-off 8.5%를 기준으로 민감도는 84.1% 이었고, 특이도는 90% 이었다. SPA에 있어서는 cut-off 3.0을 기준으로 민감도는 76.2% 이었고, 특이도는 95% 이었다.

체외수정율과 각 검사법 및 검사법간의 상관관계를 살펴본 결과는 Table 5에 요약된 것과 같다.

각 요소간에 모두 유의한 상관관계 (p<0.01)가 나타났으며, 특히 체외수정율과 각각의 검사법에 있어서는 ARIC 검사에서 가장 높은 상관관계가 나타났고 (r=0.54), 검사법간에는 ARIC 검사와 SPA에서 가장 높게 나타났다 (r=0.54).

고 찰

체외수정시술은 불임 영역에 있어서 중요한 치료 방법으로 발전하여 왔다. 현재 체외수정시술에 있어서 수정율은 평균 50~80%를 나타내고 있지만 10~15% 정도의 환자에서는 수정이 불가능하다고 보고되었다.[14]

아직까지 수정실패에 대한 정확한 원인은 밝혀지지 않았지만 여성측 요인의 불임 부부와 비교하여 남성불임 부부에서 높은 빈도의 수정실패가 관찰됨에 따라 완전한 수정실패의 원인은 난자의 결함이나 미성숙 상태보다는 정자의 수정능 결함이 주요 원인으로 보고되고 있다.[7] 따라서 불임 영역에 있어서 남성측 요인 (male factor)이 강조되었으며, 남성의 수정능력을 예측할 수 있는 임상 검사법의 개발에 관심이 집중되었다.

일반적인 정액검사 (semen analysis)가 남성의 수정능력 검사로 널리 사용되고 있지만 정자의 농도와 운동성 및 형태의 분석에 있어서 주관적인 요소가 많이 작용하게 되고 변이성도 크기 때문에 검사의 민감도가 떨어진다. 특히 정액검사 결과는 불임 남성에서도 정상 소견을 보일 수 있으므로 수정능력을 반영하는데 미흡한 점이 보고되고 있다.[15]

Kruger 등[6]은 정액검사 항목 중 하나인 정자의 형태 검사에 있어서 정자 두부의 길이, 폭, 첨체 부위의 분포 및 중편부의 세포질 방울의 크기 등을 더욱 엄격히 규정하여 정자의 형태를 정밀한 기준에 의하여 평가하는 방법을 처음 보고하였다. 또한 Kruger 등[16]은 정자 형태를 정밀 분석한 결과 정상형태비 14%를 기준으로 정자의 정상형태비가 기준보다 높았던 군과 낮았던 군 사이에 체외수정시술 시 수정율에 유의한 차이가 나타났으며, 특히 정상형태가 4% 미만인 경우 체외수정시 수정율이 극히 낮았다고 보고하였다. 정자 형태의 정밀 분석은 시행이 간편하고 짧은 시간 내에 결과를 알 수 있는 장점이 있다. 그러나 정자 형태 정밀 분석에 있어서 가임능력에 대한 cut-off 값은 연구자에 따라 차이를 보이고 있다. Hargreave 등[17]은 Kruger 등[6]의 보고와 유사한 결과로서 정자의 정상형태가 14% 이상인 경우 체외수정시술에서 정상적인 수정율을 보인 반면, 정상정자의 형태가 4% 미만인 경우에서는 7~8%의 낮은 수정율을 보고하였다. 반면 Ombelet 등[18]은 9%를 cut-off 값으로 보고하였으며, 본 연구에서는 cut-off 값 10%에서 체외수정시 정자의 수정능에 대한

가장 높은 예견도를 보여주었다. 이와 같이 정자 형태 정밀 분석법은 관찰자의 주관에 따른 차이가 나타날 수 있기 때문에 첨체 부위의 분포에 대한 좀더 객관적인 기준이 요구되고 있다.

따라서 정자의 수정능을 예측하는 방법으로서 정자의 기능적 활성도를 검사하는 방법에 관심이 집중되고 있으며, 여러 가지 방법들이 개발되었다.[1~5] 이들 방법 중 SPA는 정자의 수정능 부여 (capacitation), 난황막 통과 및 정자핵의 탈응축 (decondesation)과 같은 여러 단계의 수정 과정을 체외에서 평가하는 방법으로 널리 사용되어 왔다. 현재까지 SPA는 실험 기법상의 오차를 줄이고 정자의 첨체반응을 극대화시키는 처리법들이 개발됨에 따라 검사의 신뢰도를 높이고 있지만 시행 방법이 복잡하고 시간과 경비 소요가 많다는 단점을 지니고 있으며, 최근에는 이종간의 수정을 통한 실험을 점차 금지하는 추세에 있다.

최근에는 투명대 통과 및 난황막과의 융합에 필수적인 정자의 첨체반응 정도가 정자의 수정능과 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다.[5,8] 정자의 첨체반응은 수정의 선결 조건으로서 체내에서는 난자 투명대 (zona pellucida)에 존재하는 특이적인 당단백과 접촉함에 따라 일어난다.[19,20] 생식생리학적인 지식이 축적됨에 따라 난포액[21]이나 progesterone,[22] cAMP analogues,[23] calcium ionophore A23187[24] 등을 이용하여 체외에서 정자의 첨체반응 정도를 증진시킬 수 있게 되었다. 또한 정자의 첨체반응 유도제에 반응하여 야기된 첨체반응 정도를 분석하는 방법이 개발되었으며, 정자의 수정능 판정 및 체외수정시 수정율을 예측하는데 있어서 높은 예견치가 보고되고 있다.[5,8,25]

본 연구에서는 정자의 첨체반응 분석법인 ARIC 검사를 실시한 결과 자발적인 반응율 (spontaneous reaction)에서는 체외수정시술시 정상수정군과 비정상수정군간에 유의한 차이가 없었으나 첨체반응 유도제에 반응하여 나타나는 첨체반응 정도인 ARIC value는 정상수정군에서 유의하게 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 생리적인 자극제에 반응하여 나타나는 첨체반응 정도가 정자의 수정능과 높은 상관관계에 있다는 Tesarik[26]의 보고와 일치한다.

Calvo 등[27]은 체외수정시술시 정자의 수정능을 예측하는 방법으로 첨체반응 분석법을 사용하여 정자 수정능에 대한 높은 예견치를 보고하고 있다. 그러나 이들의 연구 결과 첨체반응 분석법이 정자 수정능과는 밀접한 관계가 있지만 결과 분석시 위음성 (false negative)과 위양성 (false positive) 결과를 배제할 수 없었다고 했으며, 다른 여러 연구자들도 유사한 결과를 보고하고 있다.[8,28] 이와 같은 결과는 정자의 첨체반응 분석이 일련의 복합적인 수정 과정 중 일부분만을 반영하는 것에 주요 원인이 있는 것으로 생각된다. 그러나 정자의 수정능 검사에서 나타나는 음성 결과는 단지 정자의 첨체반응 분석법에서만 나타나는 것이 아니라 현재까지 개발되어 온 모든 임상적 방법에서 중요한 문제점으로 대두되고 있다. 따라서 정자의 수정능에 대한 정확한 정보를 얻기 위해서는 임상적으로 유용성이 인정된 검사법들의 특성, 즉 수정 과정에 있어서 관련되는 적용범위를 고려하여 최적화된 여러 검사법을 복합적으로 시행하는 것이 매우 중요하다.[7]

본 연구에서 정자 형태의 정밀 분석 및 정자의 기능적 활성도를 검사하는 ARIC 검사와 SPA를 동시에 실시한 결과 각 방법 모두에서 정자의 수정능에 대한 임상적 유용성이 입증되었다. 그러나 체외수정율과의 상관관계에 있어서는 검사법 중 ARIC 검사에서 가장 높은 상관관계 (r=0.54)가 나타났으며, 검사법간에는 ARIC 검사와 SPA간에 가장 높은 상관관계를 보였다. 따라서 본 연구 결과 정자의 기능적 활성도를 측정하는 방법이 정자 형태의 정밀 분석 방법에 비하여 수정율과 좀더 밀접한 연관성이 있는 것으로 생각된다.

83명의 환자에 있어서 본 연구에서 설정된 정자의 정상형태비, ARIC value 및 난자 침투지표의 cut-off 값을 기준으로 동시에 비교하였을 때, 정상수정군 (n=63)에서는 단지 3명의 환자에서 세가지 검사법 모두 cut-off 값 미만의 결과가 나타났으나 (positive predictive value=95.2%), 비정상수정군 (n=20)에서는 세가지 검사법 모두 cut-off 값을 초과한 환자는 없었다 (negative predictive value=100%).

이와 같은 결과는 단일 검사법보다는 특징적인 여러 검사법을 동시에 비교하는 것이 임상적으로 중요한 위음성 결과를 최소화 시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 본 연구에서 정자의 수정능에 대한 세가

지 검사 방법을 동시에 시행한 결과 개별적으로 시행된 경우와 비교하여 정자의 수정능에 대한 보다 많은 정보를 얻을 수 있었으며, 정자의 수정능에 이상이 관찰된 경우 수정 과정 중 문제가 발생된 단계에 대한 자료도 얻을 수 있었다. 또한 각 검사 방법의 상호 보완성에 의한 효과로서 검사시 발생될 수 있는 실험상의 오차에 따른 음성 결과도 배제할 수 있었다.

최근 세포질 내 정자주입법의 급속한 발전으로 인하여 정액검사 소견상 일반적인 체외수정시술로 치료가 불가능한 극심한 남성불임 환자 뿐 아니라 정액성상은 정상이며 정자의 기능 이상을 가진 환자에 있어서도 높은 수정율과 임신율이 보고되고 있다.[29,30] 따라서 복합적인 정자 수정능 검사법들의 적용은 남성불임증 환자에서 보조생식술 시행시 치료 방법 설정에 있어서 중요한 정보를 제공할 것이다.

본 연구 결과 정자의 첨체반응율을 평가하는 ARIC 검사는 다른 검사법과 비교하여 체외수정율과 가장 밀접한 연관성을 나타냈으며, 특히 ARIC 검사와 정자 형태의 정밀 분석법은 SPA와 비교하여 시행이 간편하고, 경제적으로도 유용한 방법으로 생각된다. 또한 위의 방법들을 복합적으로 시행할 경우 각 검사법들의 특성으로 인하여 정자의 수정능을 예측하는데 있어서 위음성 결과를 최소화 시킬 수 있으며, 정자의 수정능에 대한 보다 정밀한 정보를 얻을 수 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. The use of zona-free animal ova as atest system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol Reprod 1976; 15: 471-6.
2. 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: 219-28.
3. 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: 665-70.
4. 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: 20-127.
5. 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: 1048-54.
6. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. Sperm morphological features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril 1986; 46: 1118-23.
7. Liu DY, Baker HWG. Test of human sperm function and fertilization in vitro. Fertil Steril 1992; 58: 465-83.
8. Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. J Androl 1991; 12: 98-103.
9. 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: 135-47.
10. 방명걸, 오선경, 신창재, 문신용, 이진용, 장윤석. Sperm Penetration Assay의 임상적 타당성에 관한 연구. 대한불임학회지 1993; 20: 1-7.
11. 이용빈. 소의 인공수정. 가축인공수정요론. 서울: 선진문화사, 1984; 4: 106.
12. 신창재, 장윤석. 인간정자의 수정능력 부여 및 햄스터 난자 침투에 영향을 주는 인자들에 관한 연구. 대한산부회지 1990; 33: 954-75.
13. 신창재, 방명걸, 이진용, 장윤석, 정영채, 김창근. 햄스터 난자 침투 분석법에서 대조표준 정자로서 황소정자의 유용성에 관한 연구. 대한산부회

지 1990; 33: 1758-63.
14. Cohen JC, Edwards R, Fehilly S, Fishel S, Hewitt J, Purdy J, Rowland G, Steptoe P, Webster J. In vitro fertilization: a treatment for male infertility. Fertil Steril 1985; 43: 422-32.
15. Cockett ATK, Netto ICV, Dougherty KA, Urry RL. Semen analysis: a review of samples from 225 men seen at an infertility clinic. J Urol 1975; 114: 560-3.
16. 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: 112-7.
17. Hargreave TB, Elton RA. Fecundability rates from an infertile population. Br J Uro 1986; 58: 194-7.
18. Ombelet W, Fourie F, Vandeput H, Bosmans E, Cox A, Janssen M, Kruger T. Teratozoospermia and in vitro fertilization: A randomized prospective study. Hum Reprod 1994; 9: 1979-84.
19. Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. Gamete Res 1986; 15: 213-26.
20. Fraser LR, Ahuja KK. Metabolic and surface events in fertilization. Gamete Res 1988; 491-519.
21. 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: 107-21.
22. Osman RA, Andria LA, Jones AD, Meizel S. Steroid-induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. Biochem Biophys Res Commun 1989; 160: 828-33.
23. De Jonge CJ, Han HL, Lawrie H, Mack SR, Zaneveld LJD. Modulation of human sperm acrosome reaction by effectors of adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. J Exp Zool 1991; 258: 113-25.
24. 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: 383-8.
25. 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: 902-10.
26. Tesarik J. Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon. Hum Reprod 1989; 4: 957-61.
27. Calvo L, Dennison-Lagos L, Bank SM, Dorfmann A, Thorsell L, Bustillo M, Schulman JD, Sherins RJ. Acrosome reaction inducibility predicts fertilization success at in-vitro fertilization. Hum Reprod 1994; 9: 1880-6.
28. 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 Reprod 1993; 8: 2128-32.
29. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde MP, Van Assche E, Devroey P. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination: Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. Hum Reprod 1993; 8: 1055-60.
30. Palermo G, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. Fertil Steril 1995; 63: 1231-40.