

# 남성불임 환자에서 Tray Agglutination Test 및 Indirect Immunobead Test를 이용한 항정자항체에 관한 연구

연세대학교 의과대학 비뇨기과학교실 · 제일병원 비뇨기과\*

김철수 · 이무상 · 홍재엽\*

## Antisperm Antibodies in Infertile Males as Detected by Tray Agglutination Test and Indirect Immunobead Test

Cheol Soo Kim, Moo Sang Lee and Jae Yup Hong\*

From the Department of Urology, College of Medicine, Yonsei University, and Cheil General Hospital\*, Seoul, Korea

### = Abstract =

Sera from 95 infertile males were assayed for antisperm antibodies using the Tray Agglutination Test(TAT) and indirect Immunobead Test(IBT). The correlation between antisperm antibodies and seminal analysis in infertile men was evaluated, and the TAT was compared with new indirect IBT.

The results were obtained as follows.

1. Positive rate for antisperm antibodies was high in azoospermia, oligoasthenospermia, pyospermia, in order. Especially in obstructive azoospermia, the rate was the highest in both methods.
2. Positive rates for antisperm antibodies in TAT was higher than indirect IBT.
3. Among the isotypes of the immunoglobulins, IgG were most prevalent. IgG and IgA were bound predominantly to the head and IgM predominantly to the tail tip.

### 서 론

인간의 정자에 대한 항체의 존재가 보고된(Rumke et al., 1959) 이래 여러가지 연구가 이루어져 왔으며, 최근 면역학적 요소가 생식과정에 중요한 역할을 할수 있다는 사실이 점차 명확하게 되었고(Bronson et al., 1984), 원인불명 불임증의 10-20%에서 항정자항체가 불임증의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Jones, 1980; Witkin et al., 1984).

항정자항체를 검사하는 방법에는 혈청내의 항체를 검출하는 방법과 생식기 분비물에서 검출하는 방법이 있다. 혈청내의 항체를 검출하는 전통적인 방법으로 정자응집항체 검사법과 정자부동화항체 검사법이 있으며, 새로운 방법으로 수동적 혈구응집반응 검사법, 방사성 농위원소를 이용한 항글로부린 검사법, 효소면역분석법(ELISA), 간접적 혼합 항글로부린반응 검사법(MAR Test), 간접적 Immunobead 결합 분석법(이하 IBT라 함)이 있다. 생식기 분비물에서의 항체를 검사하는 방법에는 정자에서 항정자항체를 직접적으로 MAR Test와 IBT로 검출하는 방법과 자궁점막을 고배율하 검사 혹은 간접적 IBT를 이용하여 검출할 수 있다(Shulman, 1986).

본 연구는 정자응집항체 검사법중 널리 쓰이

\*본 논문은 연세대학교 의과대학 1988년도 과별배정 연구비에 의하여 이루어졌음.

\*본 논문은 대한불임학회 1989년도 정기 학술대회에서 발표되었음.

\*본 논문은 대한비뇨기학회 제 41차 정기 학술대회에서 발표되었음.

는 Tray 응집검사법 (이하 TAT라 함(Friberg, 1974))과 종래의 항정자항체 검사와는 달리 면역글로부린의 isotype과 정자의 항체부착부위를 검출할 수 있는 간접적 IBT(Bronson et al., 1984)를 검출과 정액소견에 따른 항정자항체의 검사결과를 비교 분석코저 하였다.

## 대상 및 방법

### 대상

1987년 9월부터 1989년 8월까지 연세의료원 남성불임 clinic 및 제일병원 불임 clinic을 방문한 남성불임환자 95명을 대상으로 하였다.

### 방법

#### 1. 정액검사 소견에 따른 분류

이상정액증군은 정액검사소견에서 정액용량이 1ml미만, 정자수치가  $10 \times 10^6/\text{ml}$ 미만, 정자운동성은 40%미만, 정상 정자형태가 50%미만의 소견중 한가지 이상의 나타날때, 농정액증군은 광학현미경, 고배율시야에서 백혈구가 1이상 나타날때, 무정자증군은 정자가 나타나지 않을때, 그리고 상기 소견들이 나타나지 않을때를 정상정액증군으로 분류하였다.

#### 2. Tray 응집검사법(TAT, Friberg Test)

(1) 환자의 혈청과 대조군(항체 양성 및 음성)의 혈청을  $56^\circ\text{C}$ 에서 30분간 비활성화 시킨 후 Tyrodes용액으로 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128로 희석시킨다.

(2) 공여자의 정액에 Tyrodes용액을 섞은 후,  $300 \times \text{g}$ 로 5분간 원심분리를 2차례 시킨 후 세척한다. 현미경으로 보아 정자응집이나 세포파괴물이 있으면 glass wool로 여과하고 Markler 계산판을 이용하여 정자수를  $30 \times 10^6/\text{ml}$ 로 조정한다.

(3) Terasaki tissue typing tray에 파라핀유를  $5\mu\text{l}$ 씩 점적한다.

(4) 혈청을 Terasaki well에 점적한 뒤, 정액  $1\mu\text{l}$ 씩을 microsyringe로 첨가한다.

(5) 2-3시간 배양한 후 1:4 titer 이상에서, 도립현미경으로 40배 고배율시야에서 응집된 정자수가 전체 정자수의 10% 이상일때 양성으로 판정하였다.

#### 3. 간접적 Immunobead 결합분석법(Indirect IBT)

(1) 공여자의 정액이 액화된 뒤에, 정액을 0.3% bovine serum albumin이 포함된 Tyrodes 용

액(0.3% T-BSA)으로 희석하여  $600 \times \text{g}$ 로 5분간 3차례 원심분리시켜 세척한 후,  $37^\circ\text{C}$ 에서 30분간 배양하여 swim up을 한다. 상층 0.4ml로 활동성 정자수를  $50 \times 10^6/\text{ml}$  되도록 조정한다.

(2)  $56^\circ\text{C}$ 에서 30분간 비활성화된 혈청을 3% T-BSA에 섞어 1:4로 희석시킨다.

(3) 정자현탁액  $25\mu\text{l}$ 와 희석된 혈청  $200\mu\text{l}$ 를 섞어  $37^\circ\text{C}$ 에서 30분간 배양한 뒤, 3% T-BSA로 희석하여  $600 \times \text{g}$ 로 5분간 3차례 원심분리를 한다.

(4) Rabbit antihuman IgG, IgA, and IgM immunobeads(50mg, Bio Rad, Richmond, CA)를 무균상태에서 Tyrodes용액과 현탁시킨뒤,  $4^\circ\text{C}$ 에서 3달간 저장한다. 검사시 3% T-BSA와 재현탁 시킨다.

(5) 정자현탁액  $5\mu\text{l}$ 를 3종류의 IgG, IgA, IgM Immunobead  $5\mu\text{l}$ 에 각각 섞어 상온에서 10분간 배양한 뒤, 400배 고배율시야에서 100개의 활동성 정자중 bead가 결합된 숫자 및 결합부위를 측정한다. 이때 결합율이 20% 이상을 양성으로 판정하였으며, 결합부위는 정자두부, 정자미부, 정자미부첨단으로 표시하였다.

### 결과

#### 1. 정액검사소견에 따른 분류 및 항정자항체 양성율

남성불임환자 95명에서 무정자증군이 34례로 35.8%, 이상정액증군이 21례로 22.8%, 농정액증군이 22례로 23.2%, 그리고 정상정액증군이 18례로 18.9%이었고, 무정자증군은 다시 원인에 따라 정관절제술군 12례, 정관부발육중, 부고환염등의 폐쇄성군 11례, 원발성 고환병변 3례, 그리고 미확인군 8례이었다(표 1 및 2).

Table 1. Results of TAT and indirect IBT in infertile male

Semen Analysis	Cases (%)	TAT positive No(%)	IBT positive No(%)
Azoospermia	34 (35.8)	19(55.9)	18(52.9)
OATS	21 (22.1)	4(19.0)	3(14.3)
Normospermia	18 (18.9)	2(11.1)	1( 5.6)
Pyospermia	22 (23.2)	4(18.2)	2( 9.1)
Total	95	29(30.5)	24(25.3)

간접적 IBT결과는 부정자증군은 52.9%, 이상정액증군은 14.3%, 농정액증군은 9.1%, 정상정액증군은 5.6%의 양성율을 보였으며, 부정자증군중 정관절제술군은 75%, 폐쇄성군은 63.6%, 원발성 고환병변은 0%, 그리고 미확인군은 25%에서 양성으로 나타났다(표 1 및 2).

### 2. TAT와 간접적 IBT 결과의 상관관계

95명의 남성불임환자에서, TAT양성율은 30.5%, 간접적 IBT양성율은 25.3%이었고, TAT 양성환자 29례중 79.3%인 23례에서 IBT양성으로 나타났으며, TAT음성환자 66례중 98.5%인 65례에서 IBT음성으로 나타났다(표 3).

### 3. 항정자항체의 Isotype과 항체 결합부위

IBT양성환자 24례의 항정자항체 Isotype은 IgG 20례, IgM 7례, IgA 9례이였으며, IgG 결합부위는 정자두부 16례, 정자미부 8례, 정자미부첨단 7례이고, IgM 결합부위는 정자두부 4례, 정자미부 1례, 정자미부첨단 5례, 그리고 IgA 결합부위는 정자두부 8례, 정자미부 5례, 정자미부첨단 6례였다(표 3 및 4).

## 고 안

항정자항체의 검출에는 여러가지 방법이 이용되고 있으나, 단지 제한적으로 그 의의를 인정받고 있을 따름이며, 불임환자에서 항정자항체의 역할을 정의하는데 어려운 것은 첫째, 종래의 정자응집항체검사 및 정자부동화항체검사

에서는 항정자항체가 작용하는 정자의 부위를 구분할 수 없었고, 항정자항체를 전체적으로 검출하며, 또한 정액내 세균감염이나 혈청내 베타글로부린이 상승되었을때 항정자항원이 없더라도 응집반응을 일으켜 가양성으로 나타날 수 있었으나, 이러한 점들은 새로운 진단 방법의 개발로 부분적으로 극복되고 있다. 두번째 어려운 점은 불임에 대한 면역학적인 평가가 "all or none"이 아니라는 점이다(Gould et al., 1988).

혈청내의 항정자항체의 검출의 방법중 Tray 응집검사는 공여정자가 적게 필요하고, 항체의 결합부위 및 많은 정보를 제공하므로 널리 쓰이고 있으나, 많은 시간이 소모되고 판독에 많은 경험이 필요하다는 단점이 있다(Hinting et al., 1988)

Immunobead 결합분석법은 항정자항체의 특이성 면역글로부린(IgG, IgA, IgM)과 항체가 부착된 운동성 정자의 백분율을 알 수 있으며, 더욱 중요한 것은 특이항체가 부착된 부위를 알 수 있어 임상적으로 관례적인 진단방법으로 사용할 수 있으나, 계산코저 하는 정자의 선택과 bead가 부착된 정자의 결정이 주관적으로 이루어지는 단점이 있다(Carson et al., 1988; Hellstorm et al., 1988).

Rumke 및 Hellinger는 항체응집검사에서 역가가 1:32이상에서 양성으로 나타날때 임상적으로 의의가 있다(Rumke et al., 1959)고 하였으나, 그 이하의 역가에서도 의의있게 나타나는 결과를 그 후 보고되었으며, Shulman등은 1:4이상에서 임상적으로 의의있는 결과를 보고하였다(Shulman, 1986). 본 연구에서의 Tray

**Table 2.** Results of TAT and indirect IBT in Azoospermia

Causes	Case	TAT positive No(%)	IBT positive No(%)
Post-Va setomy	12	9(75.0)	9(75.0)
Obstruc tive	11	8(72.7)	7(63.6)
Testicular lesion	3	0	0
Unident ified	8	2(25.0)	2(25.0)

**Table 4.** Isotypes of antisperm antibodies in positive IBT

Isotypes	Cases	Antibody Binding Site		
		Head	Tail	Tail-tip
IgG	20	16	8	7
IgM	7	4	1	5
IgA	9	8	5	6

**Table 3.** Relationship between TAT and indirect IBT in infertile male

TAT	Cases	IBT negative No(%)	IBT positive No(%)	→	IgG	IgM	IgA
Positive	29	6(20.7)	23(79.3)		19	6	9
Negative	66	65(98.5)	1(1.5)		1	1	0

응집검사에서는 혈청내 항체역가가 1:4이상에서 응집이 될 때를 양성으로 판정하였다.

Immunobead 결합분석법은 정자표면에 부착된 항체를 검사하기 위한 특이성이 높고 재현 가능한 방법으로 bead가 부착된 운동성 정자의 백분율에 대한 임상적으로 의의 있는 기준이 확실히 정해져 있지 않아 Bronson등은 50%이상의 결합시에(Bronson et al., 1984), Clark등, Mandelbaum등, 그리고 Junk등은 20%이상의 결합시에 임상적으로 의의있다고 보고하였으며(Clarke et al., 1985; Mandelbaum et al., 1987; Junk et al., 1986) 본 연구에서는 20% 기준이 항정자항체에 의한 생식장애의 기준으로 대체로 비료한다는 보고에 따라 20% 기준으로 선택하였다.

정자표면의 부착부위는 임상적인 의의를 결정하는데 중요한 인자로서, 정자미부첨단예의 부착은 운동성에는 다소 영향이 있으나 불임에는 거의 영향을 미치지 않으며(Bronson et al., 1983), 정자두부 및 정자주미부에 부착시에는 운동성에 영향을 주어 자궁경부점막의 통과가 어렵게 된다. 특히 정자두부예의 부착은 선단체 반응, 투명대 결합력, 난황대와의 융합을 방해하게 된다(Lewis et al., 1986).

정자는 사춘기에 이르러 형성이 되어 항정자항원이 형성되고 혈액고환장벽에 의해 격리되어 절연항원으로 존재하나, 정관절제술과 같이 정로의 폐색이 있거나 정관형성부전이 있으면 정자가 배출되지 못하고 부고환에서 파괴 흡수되거나 내압이 증가하여 정자나 정자파괴물질이 삼출되며(Linnet, 1983), 염증, 고온, 외상, 방사선조사등으로 고환이 손상을 받은 경우에도 혈액고환장벽이 파괴되어 세정관이나 정로밖으로 방출되어 자가항체를 형성하게 된다(Jones, 1980). 그의 정계정맥류, 정액류, 부고환낭종, 정계염전, 전립선염, 부환염이 있을때도 항정자항체의 형성이 보고되었다(김세철; 1988).

원인 및 검사소견에 따른 항정자항체의 검출결광에 대해서는 여러가지가 보고되어, Alexander 및 Anderson은 정관절제술 후에 항정자항체가 50-80%에서 검출된다고 보고하였고(Alexander et al., 1979), 선천성 및 후천성 정로폐색시에 일측성 폐색은 81%의 양성율을(Hendry et al., 1983), 양측성 폐색은 71%의 양성율을(Girais et al., 1982) 보고하였다. 또한 생식기 감염의 경우 Hargreave등은 생식기 감염이 혈청내 항정자항체를 증가시키지 않는다고하였으

나(Hargreave et al., 1984), Witkin 및 Toth는 생식기 감염이 항정자항체를 증가시킨다(Witkin et al., 1983)하여 상반된 견해를 보였으며, Gerasaro등은 정액검사소견에 따른 MAR 검사결과에서 정자의 밀도, 운동성, 형태, 정액내의 백혈구수와 항정자항체 양성율간에는 상관관계가 없다고 보고하였다(Cerasaro et al., 1985). 본 연구의 결과에서는 TAT와 간접적 IBT의 양성율이 무정자증군에서 55.9%와 52.9%, 이상정액증군에서 19.0%와 14.3%, 농정액증군에서 18.2%와 9.1% 그리고 정상정액증군에서 11.0%와 5.6%로 나타났으며, 무정자증군중 정관절제술 후에는 75.0%와 75.0%, 정로의 폐색시에는 72.7%와 63.6%였으나 고환병변의 경우에는 모두 음성으로 나타나, 무정자증군, 이상정액증군, 농정액증군의 순으로 정상정액증군보다 양성율이 높게 나타났으며, 무정자증군에서 고환병변의 경우에는 항체가 검출되지 않았으나 폐색성의 경우에는 항체가 높게 검출되었다.

Carson등은 정자응집항체 검사법 및 정사부동화항체 검사법에 비해 IBT에서 항정자항체 양성율이 더 높게 나타난다고 보고(Hellstorm et al., 1987) 하였으며, Shulman등은 전자에서 더 높은 양성율을 보인다고 하여(Shulman, 1986) 상반된 견해를 보였으나, 본 연구에서는 TAT에서 30.5% 간접적 Immunobead 결합분석법에서 25.3%의 항정자항체 양성율을 보여 정자응집항체 검사법에서 IBT보다 더 높은 양성율을 보여주었다.

Shulman등은 IgG와 IgA가 IgM에 비해 더 많이 검출되고, IgG는 주로 정자두부 및 정자미부에, IgA는 주로 정자미부에 부착한다고 하였으며(Shulman, 1986), Carson등은 IgG와 IgA는 정자두부 및 정자미부에, IgM은 정자미부첨단에 부착한다고 보고하였다(Carson et al., 1988). 본 연구의 결과는 IgG가 가장 많이 검출되고, IgG와 IgA는 정자두부에, IgM은 정자미부첨단에 가장 많이 부착하여 이들의 결과와 대체로 일치하였다.

이상의 연구결과를 종합하여 불임 남성불임증에 대한 항정자항체의 역할을 규명하기 위해 더욱 광범위한 면역학적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

남성불임환자 95명의 혈청에서 Tray 정자응-

집검사법 및 간접적 Immunobead 결합분석법을 이용하여 항정자항체를 검출하여, 정액검사소견에 따른 항정자항체의 검출성적, Tray 정자응집검사법 및 간접적 Immunobead 결합분석법의 상관관계, 그리고 항정자항체의 isotype과 항체결합부위를 비교분석하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 항정자항체의 양성율은 무정자증군, 이상정액증군, 농정액증군의 순으로 정상정액증군에 비해 높게 검출되었으며, 특히 무정자증군 중 폐쇄성 무정자증군에서 가장 높았다.

2. Tray 정자응집검사법에서 간접적 Immunobead 결합분석법에 비해 다소 높은 양성율을 보였다.

3. 항정자항체의 isotype중 IgG가 가장 많이 검출되었고, IgG와 IgA는 정자두부에, IgM은 정자미부첨단에 비교적 많이 부착되었다.

## 인 용 문 헌

- Rumke P, Hellinger G: Autoantibodies against spermatozoa in sterile men. *Am J Clin Pathol* 1959, 32, 357-363.
- Bronson R, Coper G, Rosenfeld D: Sperm antibodies; their role in infertility. *Steril* 1984, 42, 171-183.
- Jones WB: Immunologic infertility—fact or fiction? *Fertil Steril* 1980, 33, 577-586.
- Witkin SS, Bongiovanni AM, Berkeley A, Ledger WJ, Toth A: Detection and characterization of immune complexes in the circulation of infertile women. *Fertil Steril* 1984, 42, 384-388.
- Shulman S: Sperm antigens and autoantibodies; effects on fertility. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1986, 10, 82-89.
- Friberg J: A simple and sensitive micro-method for demonstration of sperm agglutinating activity in serum from infertile men and women. *Acta Obstet Gynecol Scand. [Suppl]* 1974, 36, 21-29.
- Gould JE, White RWD: Immunologic infertility. In: Contemporary Management of Impotence and Infertility Edited by Tanago EA, Lue TF, McClure RD Baltimore: Williams and Wilkins, chapter 24, pp 265-267, 1988.
- Hinting A, Vermeulen L, Comhaire F: The indirect mixed antiglobulin reaction test using a commercially available kit for the detection of antisperm antibodies in serum. *Fertil Steril* 1988, 49, 1039-1044.
- Carson, Reiher J, Scommegna A, Prins GS: Antibody binding patterns in infertile males and females as detected by immunobead test, gel agglutination test and sperm immobilization test. *Fertil Steril* 1988, 49, 487-492.
- Hellstorm WJG, Overstreet JW, Samuels SJ, Lewis EL: The relationship of circulating antisperm antibodies in infertile men. *J Urol* 1988, 140, 1039-1044.
- Clarke GN, Stojanoff A, Cauchi MN, Johnston WIH: The immunoglobulin class of antispermatozoal antibodies in serum. *Am J Reprod Immunol* 1985, 7, 143-147.
- Clarke GN, Elliott PJ, Smaila C: Detection of sperm antibodies in semen using the immunobead test: a survey of 813 consecutive patients. *Am J Reprod Immunol* 1985, 7, 118-123.
- Mandelbaum SL, Diamond MP, DeCherney AH: Relationship of antisperm antibodies to oocyte fertilization in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1987, 47, 644-651.
- Junk SM, Matoson PL, O Halloran F, Yovich JL: Use of immunobeads to detect human antispermatozoal antibodies. *Clin Reprod. Fert* 1986, 4, 199-206.
- Bronson R, Cooper G, Rosenfeld D: Complement mediated effects of sperm head-directed human antibodies on the ability of human spermatozoa to penetrate zona-free hamster eggs. *Fertil Steril* 1983, 40, 90-95.
- Lewis EL, Overstreet JW: Immunologic infertility in the male. *World J Urol* 1986, 4, 77-82.
- Linnet L: Clinical immunology of vasectomy and vasovasostomy. *Urology* 1983, 22, 101-114.
- 김세철: 이상정자에 의한 불임증의 면역학적 견해. 제 6차 대한남성과학회 학술대회 보고서 1988, pp, 25-45.
- Alexander NJ, Anderson DJ: Vasectomy: Consequences of autoimmunity to sperm anti-

- ens. *Fertil Steril* 1979, 32, 253-260.
- Hendry WF, Parslow JM, Sterdronska J: Exploratory scrototomy in 168 azoospermic males. *Br J Urol* 1983, 55, 785-791.
- Girgis SM, Ekladios EM, Lskander R, El-Dakhly R, Girgis FN: Sperm antoodies in serum and semen in men with bilateral congenital absence of was deference. *Arch Androl* 1982, 8, 301-305.
- Hargreave TB, Harvey J, Elton RA, McMillan A: Serum agglutinating and immobilising sperm antibodies in men attending a sexully transmitted disease clinic. *Andrologia* 1984, 16, 111-115.
- Witkin SS, Toth A: Relationship between genital tract infections, sperm antibodies in seminal fluid and infertility. *Fertil Steril* 1983, 40, 805-808.
- Cerasaro M, Valenti M, Massacesi A, Dondero F, Lenzi A: Correlation between the direct IgG MAR test (mixed antiglobulin reaction test) and seminal analysis in men from infertile couples. *Fertil Steril* 1985, 44, 390-395.
- Hellstorm WJG, Overstreet JW, Moore SM, Samuels SJ, Chang RJ, Lewis EL: Antisperm antibodies bind with different patterns to sperm of different men. *J Urol* 1987, 138, 895-898.
-