

## 접합자 난관내 이식 환자에 있어서 수정 실패와 항정자 항체와의 관계 및 난자와 정자의 재처리에 관한 연구

차병원 여성의학연구소

정미경 · 고정재 · 도병록 · 구정진 · 한세열 · 차광열

### Study on the Detection of Anti-Sperm Antibodies in Zygote Intra Fallopian Transfer (ZIFT) Patients with Fertilization Failure or Low Fertilization Rate and Retreatment of Oocyte and Sperm

M.K. Chung, J.J. Ko, B.R. Do, J.J. Koo, S.Y. Han and K.Y. Cha

*Department of Obstetrics and Gynecology, Infertility Medical Center  
of Cha Women's Hospital, Seoul, Korea*

#### = Abstract =

Previous studies have indicated that immunological factor is responsible for the infertility. We have detected sperm antibodies in ZIFT patients which grouped as fertilization failure (A; n=18) and low fertilization rate ( $\leq 50\%$ )(B; n=20). Patients, however, had normal oocytes and sperms. We collected serum from wives and semen from husbands and donors(fertile sperm), if it was needed. We examined class, binding patterns and amounts of antisperm antibodies(ASA) by direct and indirect immunobead binding assay. In group A, 11 husbands were ASA positive showing 62.2% and 61.1% binding with IgA and IgG, respectively, and two wives were ASA positive showing 70.0% and 71.0% binding with IgA and IgG, respectively. Binding sites were mainly at the head of sperms (84%). In group B, 8 husbands were ASA positive showing 37.5% and 40.0% binding with IgA and IgG, respectively, and two wives were ASA positive showing 41.3% and 42.0% binding with IgA and IgG, respectively. Binding sites were also mainly at the head of sperms (78%). For the treatment of ZIFT patients who had fertilization failure at the first trial, we used albumin fractionation method and dilution method with 30% fetal cord serum (FCS) to reduce the titer of ASA. We used partial zona dissection (P.Z.D.) method for wives who have antisperm antibodies in their serum. According to represented method, we could enhance the fertilization rate to 60.0% by albumin fractionation and 20.0% by P.Z.D., respectively. We concluded that the use of micromanipulation like P.Z.D. or the other sperm processing methods is required to increase a chance of fertilization. This result suggested that it should be a prerequisite to test antisperm antibodies prior to entering assisted reproductive technologies (ART) programs.

#### 서 론

ART 프로그램의 실행중에는 난자의 형태나

본 논문의 요지는 1991년도 제7차 세계 체외수정 학회(World Congress on IVF and Assisted Procreation)에 발표 되었음.

정자의 정상(semen profile)이 정상으로 나타나는 환자에서도 수정이 전혀 일어나지 않는 경우가 있다. 이런 환자들에 대한 원인으로서는 정자나 난자에 대한 면역학적인 요인이나 유전적인 요인들이 생각되지만, 그 중 주요하게 대두되고 있는 것이 항정자 항체(antisperm antibody)에 의한 수정의 실패이다. 인간 정자의

수정능과 관련된 항정자 항체의 역할에 대해서 아직 확실하게 밝혀지지 않았으나, 정자와 항체의 결합 비율과 정자에 대한 결합 부위에 따라 정상적인 수정에 많은 장애를 주는 것으로 보고되어 왔다(Bronson et al., 1984). 특히 IgA가 IgG보다 수정방해에 더욱 관련되어 있다고 알려져 있으며(Combs et al., 1973), 두 항체의 공동 작용에 의해 수정을 더욱 방해한다고 하였다(Junk et al., 1986; Clarke et al., 1988). 이에 저자들은 본원에 내원한 176명의 ZIFT 환자 중 수정이 전혀 일어나지 않았거나 본원의 평균보다 매우 낮은 수정률( $\leq 50\%$ )을 나타낸 환자들을 대상으로 항정자 항체 검사를 실시하였으며, 그런 환자들의 수정률을 증가시킬 수 있도록 여러가지의 처리를 실시하여 그 결과를 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구 대상

176명의 ZIFT를 실행한 부부 중 수정이 전혀 일어나지 않았거나( $n=18$ ) 본원 체외수정(IVF) 프로그램의 평균보다 매우 낮은 수정률( $\leq 50$ )을 나타내었던 환자( $n=20$ )의 혈청과 정액을 채취하여 사용하였다. 모든 환자의 난자는 형태적으로 정상적인 상태를 나타내었고, 정액 성상에서도 WHO 기준에 따라 정상을 나타내는 환자만을 대상으로 하였다.

### 2. 직접 면역 검사법(Direct Immunobead Test)

남편의 정자에 존재하는 항체를 검사하기 위해 Mandelbaum 등(1987)의 방법을 수정하여 direct immunobead test를 실시하였다. 액화(liquefaction)된 정액은 phosphate buffered saline(m-PBS)을 이용하여 실온에서 2번 반복하여 세척한 후 3% bovine serum albumin(BSA)을 함유한 0.2ml(m-PBS)에 재차 부유시켜( $10 \times 10^6$  motile sperm/ml) 사용하였다. Rabbit anti human IgA와 IgG(50 mg, Bio-Rad, Richmond, CA)는 m-PBS 10ml에 현탁시켜 세척한 후 분석을 위해 2mg/ml로 사용전에 3% BSA를 함유한 m-PBS에 재차 현탁시켰다. 10 $\mu$ l의 immunobead 현탁액과 20 $\mu$ l의 정자 부유액을 잘 혼합시켜 slide glass에 점적시켜 cover한 후 실온에서 습도가 유지되게 10분간 방치후 현미경을 사용하여(200-400배율) 관찰하였다. 100개의

살아있는 정자를 확인하여 bead가 결합된 부위와 정도를 확인하였으며, 살아 있는 정자의 20% 이상이 bead와 결합된 경우를 양성으로 판정하였다.

### 3. 간접 면역 검사법(Indirect Immunobead Test)

부인의 혈청속에 들어있는 항정자 항체를 검사하기 위해 indirect immunobead test 실시하였다. 수정이 확인된 공여자(donor)로부터 얻어진 정자를 항체가 결합되지 않은 정자(antibody free sperm)로 사용하였다. 비활성화된 부인의 혈청을 m-PBS에 희석 시킨 후 세척된 정자( $50 \times 10^6$  motile sperm/ml)와 잘 섞은 후 30분동안 37°C에서 배양하고 원심분리를 반복 실시하였다. 얻어진 정자를 3% BSA를 함유한 m-PBS에 재부유 시킨후( $2 \times 10^6$  motile sperm/ml) direct immunobead test와 같은 방법을 사용하여 test를 실시하였다.

### 4. 수정에 실패한 환자의 재처리 방법

항정자 항체가 원인이 되어 수정에 실패했던 환자를 다음 세가지 방법에 의하여 처리하였다.

1) **Albumin Fractionation**: 정액을 30% FCS가 함유된 30ml의 배양액에 채취한 후 Berger 등(1985)의 방법에 따라 7%와 17%의 BSA로 1.5ml씩 층을 만들어 그 위에 1ml의 희석된 정자를 놓아 37°C에서 60분간 방치한후 하단부 0.5ml을 원심분리 후 사용하였다.

2) **정자 공여(Donation)**: Albumin fractionation 방법을 사용해서도 수정에 실패한 환자의 경우에 공여된 정자(donor sperm)를 사용하여 재수정(RI)하였다. 공여된 정자는 통상적인 10% FCS가 함유된 Ham's F-10을 이용한 Swim up 방법을 사용하여 처리하였다.

3) **부분적 투명대 절개법(Partial Zona Dissection)**: 부인의 혈청에서 항체가 검출되었던 환자에 대한 처리 방법으로 Cohen 등(1989)의 P.Z.D. 방법을 이용하여 성숙된 난자의 난구세포와 방사상 세포를 제거시킨 후 고정 피펫을 이용 난자를 고정시키고 미세 피펫을 이용하여 투명대 일부를 절개시킨 후 수정하여 실시하였다.

## 결 과

### 1. 수정에 실패한 환자의 항정자 항체 검사

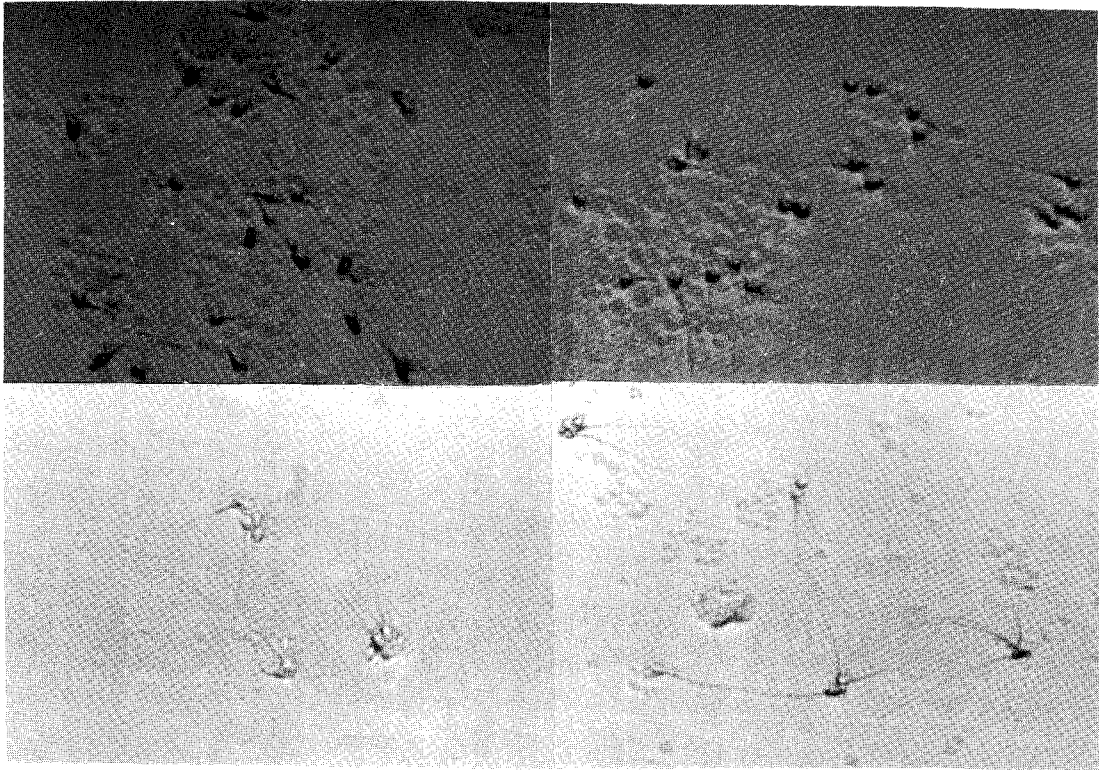
수정에 실패한 18명의 ZIFT 환자 중 항정자

**Table 1.** Reactivity of Antibodies Detected by IBT in Patients with Fertilization Failure

	Couples	No. of IUI trial (mean)	No. of oocytes retrieved (mean)	IBT (direct or indirect)		Major binding site (%)
				IgA (%)	IgG (%)	
Group 1	11	4.3	10.9	62.2	61.1	Head (80)
Group 2	2	5.5	12.0	70.0	70.0	Head (88)

Group 1 : Direct IBT (positive cases detected on spermatozoa of husband)

Group 2 : Indirect IBT (positive cases detected in serum of wife)



**Fig. 1.** Photographs of positive IBT reactions.

항체에 대한 양성 반응을 보인 환자는 표 1에서와 같이 총 13명이었으며, 11명은 남편의 정액에서, 2명의 경우는 부인의 혈청에서 양성 반응을 나타내었다. 그들은 평균 4번 이상 IUI(intra uterine insemination)에 실패한 환자들이었다. 11명의 남편은 평균 62.2%의 IgA와 61.1%의 IgG의 결합률을 나타내었으며, 2명의 부인은 평균 IgA 70.0%와 IgG 71.0%의 결합률을 나타내었다. 또한 이들의 주요 결합부위는 두부(head)였다(그림 1).

2. 저 수정률을 나타낸 환자의 항정자 항체 검사

표 2에 나타난 바와 같이, 평균 50% 이하의 수정률을 나타내었던 20명의 ZIFT 환자 중 항정자 항체에 대한 양성 반응을 보인 환자는 총 10명이었으며, 남편의 경우 평균 37.5%의 IgA와 40.0% IgG의 결합률을 나타내었으며, 부인의 경우 평균 IgA 41.3%와 IgG 42.0%의 결합률을 나타내었다. 그들의 주요 결합 부위는 역시 두부(head)였다.

3. 일차 시도에서 수정에 실패한 환자에 대한 재처리

일차 시도에서 수정에 실패한 항정자 항체 양성 반응을 보인 환자중 12명이 이차시도를

**Table 2.** Types of Antibodies Detected by IBT in Patients with Low Fertilization Rate

	Couples	No. of oocytes retrieved (mean)	Ferti. rate (%)	No. of oocytes transferred (mean)	Pregnancy	IBT (direct or indirect)		Major binding site (%)
						IgA (%)	IgG (%)	
Group 1	8	10.4	≤50	3.8	1	37.5	40.0	Head (75)
Group 2	2	8.5	≤50	3.2	0	41.3	42.0	Head (80)

Group 1 : Direct IBT (positive cases detected on spermatozoa of husband)

Group 2 : Indirect IBT (positive cases detected in serum of wife)

**Table 3.** Results of Retreatment in ZIFT Patients with Fertilization Failure After First Treatment

	Couples	Treatment	No. of oocyte retrieved (mean)	Ferti. rate (%)	No. of embryos transferred (mean)	Pregnancy
Group 1	7	Albumin Fractionation	11.0	61.0	5.5	2
Group 2	3	Donation (R.I.)	17.3	50.9	6.0	2
Group 3	2	P.Z.D.	12.5	20.0	3.0	0

Group 1 and 2: Patients with positive for antisperm antibodies in husbands (group 1 < 80, group 2 ≥ 80)

Group 3 : Patients with positive for antisperm antibodies in wives

하였다. 12명의 환자는 결합 정도에 따라 세가지 방법을 사용해 결과를 보았다. 표 3에서 보는 바와 같이 80% 미만의 항정자 항체 결합률을 보인 군에서는 albumin fractionation을 이용하여 61.0%의 수정율 증진을 나타내어 2명의 환자에서 임신이 나타내었다. 80% 이상의 항정자 항체 결합률을 보인 군에서는 albumin fractionation 처리후 수정이 일어나지 않아 공여자의 정자로 재수정하여 50.9%의 수정율 증진을 나타내었으며 두명의 환자에서 임신이 나타내었다. 또한 부인의 혈청에서 항정자 항체 양성 반응을 보였던 환자는 P.Z.D.를 이용하여 20.0%의 수정율 증진을 나타내었다.

## 고 찰

시험관아기 프로그램에서 수정에 실패한 많은 환자들이 발생하지만 원인규명이나 치료 방법에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 이에 난자나 정자의 성상이 정상이라 판단되는 ZIFT 환자 중 수정이 안된 환자에 대한 retrospective 한 분석이나 그에 대한 재처리는 매우 의의가 있다고 생각된다.

항정자 항체에 의한 수정의 방해는 투명대에서의 난자와 정자의 결합부위에 직접적으로 작용하거나 steric hindrance 의해 관련된다고 알려져 있으며, 난황막에는 작용하지 않는 것으

로 보고되어 왔다 (Liu et al., 1991). 일반적으로 항정자 항체에 양성을 나타내는 환자들은 체외 수정 프로그램을 이용하여 처치해주고 있으나 수정률은 매우 저조하게 보고되고 있다 (Mandelbaum et al., 1987).

본원의 ZIFT 환자중 정자와 난자의 성상이 정상으로 나타나면서 수정이 전혀 일어나지 않은 환자의 경우에는 평균 60% 이상의 항체 결합률을 나타내었고 수정률이 낮았던 부부에서는 35% 이상의 평균 결합률을 나타냈으므로 보아 임상적으로 수정률과 항정자 항체 사이에 매우 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다. 본 연구에서는 수정이 전혀 일어나지 않았던 군과 수정률이 낮았던 군 모두 IgA와 IgG에서 높은 결합률을 보임으로 수정률에 대한 영향은 단독작용이 아니라, IgA와 IgG의 공동작용에 의한 것이라 사료된다. 항정자 항체의 결합부위 또한 임상적 의의를 갖는다. Mandelbaum 등 (1987)은 정자 두부에 대한 항정자 항체의 결합이 수정과정에서의 주요한 장애요인이 되며 정자 미부 (tail) 및 미단부 (tail-tip)에 대한 항체는 임상적으로 많은 의의를 갖지 못한다고 보고 하였는데, 본 연구에서는 수정 실패와 관련된 주요 항체 결합부위가 정자 두부로 나타나 이들의 보고와 일치하는 견해를 보여, 두부에 결합한 항체에 의한 난자 투명대 (zona pellucida)와 정자의 결합 방해와 투명대

투과 방해가 수정 실패에 중요한 요인으로 작용함을 확인할 수 있었다.

현재까지 항정자 항체와 관련된 불임의 치료에 대한 적절한 방법이 보고된 바는 없지만 정자의 사출후 액화하는 동안 정자의 표면에 항정자 항체의 결합이 증대됨으로 다른 환자의 혈청을 이용한 정액의 빠른 희석으로 항체가 부착되지 않은 수정능력이 있는 정자를 좀더 많이 회수할 수 있었으며, 알부민을 이용하여 정자에 대한 cytotoxic activity를 월등히 줄였다고 한다(Elder et al., 1990; Hinting et al., 1989). 특히 Elder등(1990)의 보고에 의하면 50%의 혈청을 사용하여 정자를 회수하였을 경우 수정률을 대조군(21.6%)에 비해 두배(43.7%)로 높일 수 있었으며, 임신률도 대조군이 5%로 나타낸 것에 반하여 24%로 월등히 향상시킬 수 있었다고 한다. 본 실험에서는 액화전에 80% 이하의 항체 결합률을 보인 group 1에서는 30% 혈청에 의한 정자 회수와 albumin Fractionation 방법의 병용으로 61.0%로 수정률 증진을 보여 Elder 등(1990)의 결과보다 더욱 증진된 수정률을 볼 수 있었다. 그러나 80% 이상의 결합률을 보인 group 2에서는 같은 방법으로 수정이 되지 않아 공여 정자를 이용한 재수정을 하여야 하였고 이를 통해 수정률을 증진시킬 수 있었다. 앞으로 P.Z.D.와 같은 방법을 이용해 수정률을 증진 시키거나, 좀더 많은 수의 정자를 수정시켜 효과를 보고한 Hamilton(1989)등의 방법을 병용하여 수정을 시킨다면 보다 나은 결과를 얻을 수 있으리라 본다. 또한 부인의 혈청에서 높은 항체 결합률을 보인 환자에게는 난자의 미세조작법인 P.Z.D를 이용해 20.0%의 수정률 증진을 보여 Bronson등(1991)이 제시한 미세조작에 의한 면역학적 불임치료에 관한 견해를 뒷받침 할 수 있었다. 부인의 경우에 양성 반응이 나타날 경우 좀더 향상된 P.Z.D.와 같은 미세조작 기술을 이용해 많은 환자에게 수정 나아가 임신의 기회를 높여 줄 수 있으리라 생각된다.

본 연구 결과에 따라, 다양한 물질을 이용한 정자처리나, P.Z.D.와 같은 미세조작 방법을 이용한 난자처리가, 항정자 항체를 갖는 환자의 수정의 기회를 증진시키는데 매우 이상적인 방법이라 간주되며, ART 프로그램의 실행전에 불임부부의 정액 검사의 한 부분으로 항정자 항체 검사를 반드시 시행해야 한다고 생각된다.

## 결 론

난자나 정자의 상태가 정상적이면서도 수정에 실패하였거나(A; n=18), 수정률이 50% 이하로 낮았던(B; n=20) ZIFT 환자에 대해 항정자 항체의 결합률, 결합부위와 항체의 종류를 direct와 indirect immunobead binding assay를 이용하여 검사하였다. 그런 환자들에 대한 재처리 방법으로 혈청이나 BSA로 정자를 희석하거나 또는 P.Z.D.를 이용하여 수정률과 임신률을 증진시킨 결과는 다음과 같다.

1. 수정에 실패한 A군중 항정자 항체에 양성을 나타낸 환자는 총 13명이었으며 그들은 평균 60% 이상의 항체 결합률을 보였다.

2. 낮은 수정률을 나타내었던 B군중 항정자 항체에 양성을 나타낸 환자는 총 10명이었으며 그들은 평균 35% 이상의 결합률을 나타내었다.

3. A와 B군 모두 주요 결합부위는 두부(head)였다.

4. 수정에 실패한 환자 재 처리과정 중 남편의 정자에서 양성을 나타낸 경우는 혈청과 BSA를 병용하는 방법으로, 부인의 혈청에서 양성을 나타낸 경우에는 P.Z.D.를 이용해 각각 61.0%와 20.0%로의 수정률 증진을 얻을 수 있었다.

ZIFT가 남성불임과 관련된 처리에 비교적 효과적이라 할지라도 정자의 두부에 대해 높은 항정자 항체결합률을 보일 경우에 수정이 일어나지 않았다. 그래서 정자처리를 위해 혈청이나 알부민을 이용하거나 미세조작과 같은 방법을 이용하는 것은 수정 기회 증진에 매우 이상적이었으며, 앞으로 ART 프로그램 실시전에 항정자 항체 검사를 반드시 시행해야 한다고 생각한다.

## 인 용 문 헌

- Berger T, Marrs RP, Moger DL : Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertil Steril* 1985, 43, 268-273.
- Bronson RA, Cooper GW, Rosenfeld DL : Sperm antibodies : their role in infertility. *Fertil Steril* 1984, 42, 171-176.
- Clarke, GN, Hyne RV, du Plessis Y and Johnston WI : Sperm antibodies in human fertilization. *Fertil Steril* 1988, 49, 1018-1025.
- Cohen J, Malter H, Wright G, Kort H, Massey J, Mitchell D : Partial zona dissection of hu-

- man oocytes when failure of zona pellucida penetration is anticipated. *Human Reprod* 1989, 4, 435-442.
- Coombs RRA, Rumke PH, Edwards RG: Immunoglobulin classes reactive with spermatozoa in the serum and seminal plasma of vasectomised and infertile men.: In Bratanov K, Edwards RG, Vulchanov VH, Dikov V and Somlev B (eds). *Immunology of Reproduction*. Bulgarian Academy of Sciences Press. Sofia 1973, 354-359.
- Elder KT, Wick KL, Edwards RG: Seminal plasma anti-sperm antibodies and IVF: the effect of semen sample collection into 50 % serum. *Human Reprod* 1990, 5, 179-184.
- Hamilton F, Gutlay-Yeo AL, Melderum DR: Normal fertilization in men with high antibody sperm binding by addition of sufficient unbound sperm in vitro. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1989, 6, 342-344.
- Hinting A, Vermeulen L, Goethals I, Dhont M, Comhaire F: Effect of different procedures of semen preparation on antibody-coated spermatozoa and immunological infertility. *Fertil Steril* 1989, 52, 1022-1026.
- Junk SM, Matson PL, Yovich JM, Bootsma B, Yovich JL: The fertilization of human oocytes by spermatozoa from men with anti-spermatozoal antibodies in semen. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1986, 3, 350-352.
- Liu DY, Clarke GN, Gordon Baker HW: Inhibition of human-zona pellucida and sperm-oolemma binding by antisperm antibodies. *Fertil Steril* 1991, 55, 440-442.
- Mandelbaum SL, Kiamond MP, De Cherney AH: Relationship of antisperm antibodies to oocyte fertilization in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1987, 47, 644-651.
- Richard A Bronson: Sperm antibodies; Problems in infertility. *Postgraduate Obstetrics & Gynecology* 1991, 11, 1-6.
-