

Sperm Penetration Assay의 임상적 타당성에 관한 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

방명걸 · 오선경 · 신창재 · 김정구 · 문신용 · 장윤석 · 이진용

Study on the Clinical Validity of Sperm Penetration Assay

Myung-Geol Pang, Sun Kyung-Oh, Chang Jae Shin, Jung Gu Kim, Shin Yong Moon,
Yoon Seok Chang and Jin Yong Lee

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

= Abstract =

The present study was designed to test the validity of the semen analysis(S/A) and the sperm penetration assay(SPA) as a prognostic indicator of male fertility in 123 patients undergoing in vitro fertilization(IVF). We attempted to correlate the traditional semen parameters or the extent of sperm penetration in SPA with the results of human IVF rate or cleavage rate. Poor correlation was found between the results of S/A and human IVF rate(sensitivity, 80.6%; specificity, 46.7%; positive predictive value, 91.6%; negative predictive value, 25%). Conversely, good correlation was found between the results of SPA and human IVF rate(sensitivity, 100%; specificity, 80%; positive predictive value, 97.3%; negative predictive value, 100%).

Our results corroborate the conclusion that SPA can be a valuable tool as a prognostic indicator of male fertilizing ability.

서 론

불임영역에 있어 남성 정자의 수정능력을 충실히 반영해 주는 임상검사법의 개발은 불임인자의 규명 및 향후 치료 방향 설정에 절대 필요한 것이나 아직은 만족스럽지 못한 수준에 있다. 일상적으로 시행하는 정액검사는 기본적인 검사로서 정액내 정자 수, 운동성 및 형태 등의 정자의 양적인(quantitative) 측면을 보는 것이므로 해당 남성 정자의 생식능력을 정확하게 반영하지는 못한다(Cockett et al., 1975; Smith et al., 1977). 이러한 문제점을 해결해 보고자 인간정자의 수정 및 생식능력을 평가하는 체외 분석법인 Sperm Penetration Assay(SPA)가 1976년 Yanagimachi에 의해 처음 개발되었다. 그 후 Rogers등(1979)이 처음으로 생식력

유무에 따른 햄스터 난자 침투율의 범위를 규명한 이래, 여러연구가 거듭되어 남성 생식력 평가법으로서 SPA의 유용성을 재확인하였다.

그러나 기존의 SPA는 실험간의 변이, 정도 관리(quality control)의 부재, 낮은 민감도와 특이도, 까다로운 실험기법, 긴 실험기간 및 많은 실험비용 등의 문제점을 가지고 있다(Rogers, 1985; Johnson et al., 1990). 이러한 문제점 때문에 SPA는 임상적 타당성에 있어 논쟁거리로 남아 있다.

많은 연구자들은 SPA의 최종 임상적 타당성을 인간 난자의 수정과 SPA의 정자침입 정도의 상관관계로 평가하여야 한다고 주장하고 있다(Ausmanas et al., 1985; Mao & Grimes, 1988; Margalioth et al., 1986; Wolf et al., 1983). 불임의 치료법으로 체외수정기술이 출현됨에 따라 SPA에서의 정자의 난자침투정도와 체외수정시 수정율간의 상관여부를 타진해 보려는 연구, 즉 SPA가 과연 남성의 수정율을 정확히

*본 연구는 1990년도 서울대학교병원 특진 연구비의 보조로 이루어진 것임.

반영할 수 있는가에 대한 연구가 거듭되었다. 그러나 SPA를 시행하는 연구실마다 시행방법 및 정상역의 해석이 서로 다른 실정이다. 비교적 SPA가 잘 설정된 연구실에서는 체외수정율과 SPA사이에는 약 80%이상의 상관관계를 보고하고 있다. 나머지 불일치는 위음성(false-negative) 및 위양성(false-positive) 결과였다.

본 저자들은 우선 SPA 수행상 중요한 몇몇 인자들에 대하여 각각 최대의 정자침투를 보이는 조건들을 규명하여 SPA 각각의 단계를 최적화시킨 바 있으며(신과 장, 1990; Chang et al., 1990), 한국인 남성에 있어서의 정상역 및 비정상역을 설정하였고(김 등, 1991), SPA의 시행을 보다 간편화 시키기 위하여 동결보존된 인간 정자(장 등, 1990) 및 햄스터 난자(정 등, 1992; 방 등, 1992a)를 이용하여 SPA를 시행한 바 있다. 또한 SPA 시행시 복잡한 실험 기법에 의한 위음성 및 위양성 결과를 배제하기 위하여 대조표준 정자로서 냉동보존된 황소 정자를 이용하여 정도관리(quality control)를 하고 있다(신 등, 1990).

이에 본 저자들은 기존 정액검사에서 정액척도 및 SPA에서 정자의 난자침투정도와 체외수정의 결과사이에 유의한 상관관계가 있는지를 밝혀 정액검사나 SPA가 남성 수정능 평가법으로서 임상적으로 타당한 방법인지의 여부를 검정해 보고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 연구기간 및 대상

1990년 6월부터 1991년 10월까지 서울대학교병원 불임클리닉에서 체외수정 및 배아의 자궁내 이식시술(체외수정시술)을 받는 환자중 123예를 임의로 선택하여 시행하였다.

2. 실험설계

123예의 환자에 있어서 본 저자들에 의해 설정된 SPA의 임상적 타당성을 검정하기 위하여 채취된 정액을 동시에 체외수정시술, 정액검사 및 SPA를 시행하여 각각의 결과를 비교 분석하였다. 체외수정시술 당일 채취된 정액중 0.5ml을 제외한 나머지를 체외수정시술에 이용하였으며, 0.5ml의 정액은 정액검사 및 SPA에 이용하였다. 체외수정시술의 결과(정상수정율)와 정액검사결과, 체외수정시술의 결과와 SPA의 결과(난자침투지수)를 각각 비교하

였다.

3. 체외수정시술

FSH/hMG를 이용하여 과배란을 유도하였으며, hCG주사 후 35시간에 질식 초음파기기를 이용하여 난자를 채취하였다. 채취된 난자는 swim-up방법에 의해 얻어진 정자로 수정을 시켰으며, 수정 후 약 44시간, 즉 배아이식 직전에 수정율을 관찰하였으며, 결과는 정상 수정율(배아이식에 적합한 배아수/수정시킨 총 난자수×100)로 표기하였다.

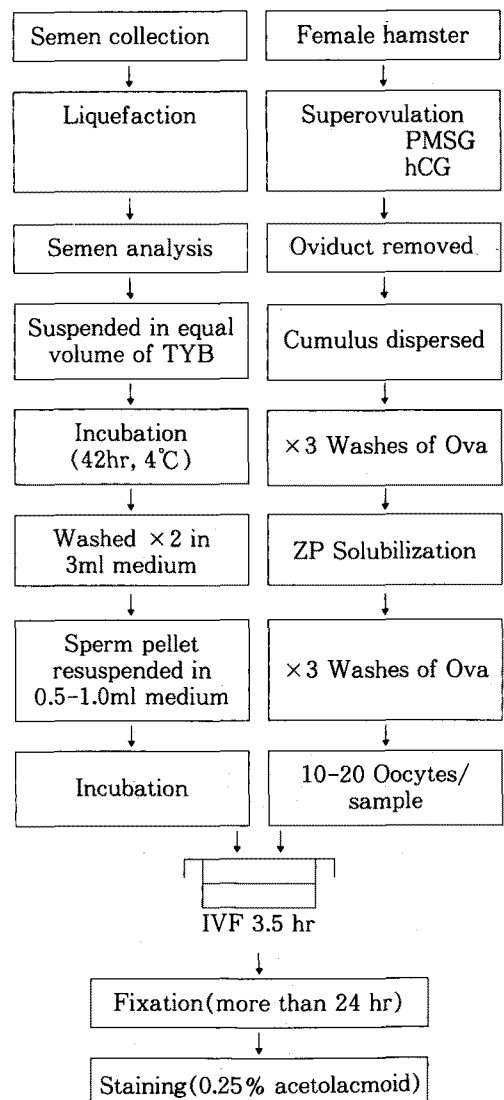


Fig. 1. Procedure of sperm penetration assay.

4. SPA(그림 1)

1) 햄스터 난자의 준비

생후 12-16주령 햄스터에 PMSG 35 IU를 복강내로 주사한 후 52시간 지나 hCG 35 IU를 복강내 주사하여 과배란을 유도하였다. hCG 투여 14-16시간 후 경추탈구법으로 햄스터를 희생시키고 복강을 열어 난소, 난관 및 자궁을 노출시켜 지방조직을 모두 제거한 후 양측난관만을 절제하여 D-PBS가 담긴 배양접시에 담아 난관 팽대부를 절단함으로써 난자-난구세포가 흘러나오게 하였다. 난구세포는 0.1% hyaluronidase를 함유한 D-PBS(+0.3% BSA)에서 제거하였으며, 투명대는 0.1% trypsin을 함유한 D-PBS(+0.3% BSA)에서 제거하였다.

2) 정액의 처리 및 수정

체외수정시술시 남은 0.5ml의 정액은 본 연구실에서 개발한 정자처리법(신과 장, 1990; Chang et al., 1990; 방 등, 1992a, b)에 의거하여 시행하였다. 즉, 채취된 정액을 상온에서 30분간 액화시키고 WHO기준에 의한 정액검사를 시행한 후 정액을 TYB(TESt-Yolk Buffer; 표 1)와 용량비 1:1로 천천히 혼합하고 4°C까지 천천히 온도를 하강시킨 후 4°C에서 42시간동안 저온 배양한 후 0.3% human serum albumin(HSA)이 첨가된 37°C의 Ham's F-10 6ml로 2회 세척(650G, 10분)한 후 정자괴(sperm pellet)에 0.1% HSA가 첨가된 Ham's F-10 0.5-1.0ml를 추가하였다. 그후 5% CO₂, 37°C배양기에서 90분간 배양한 후 상층액만 모아 이의 일부로 정자수와 운동성을 검사하였다. 처리된 운동성 정자 1×10⁶/ml와 10개 이상의 투명대 제거 햄스터 난자와 수정시켰다.

Table 1. Composition of TEST -yolk buffer (TYB)

TES(N-hydroxymethyl-methyl-2-aminoethane sulfonic acid)	211mM
Tris(hydroxymethyl-aminoethane)	96mM
Glucose	11mM
Streptomycin	0.0050g/100ml
Penicillin	0.0075g/100ml
Fresh egg yolk	20% v/v

1,000ml batches of TYB can be prepared, centrifuged(6,000G, 30 min), filtered(0.45μm) and stored frozen(-20°C) in 2-ml fraction.

3) 고정, 염색 및 판독

수정 3.5시간 후 난자들을 회수하여 신선한 배양액에서 3회 이상 세척하여 과다하게 부착된 정자들을 제거하였다. 5-10μl의 작은 방울로 각 슬라이드당 난자 10개씩을 옮겼으며, cover glass주위 네곳에 소량의 vaseline-paraffin을 떨구고 슬라이드를 덮은 후 실체현미경으로 관찰하면서 난자가 파손되지 않도록 조금씩 조절하며 cover glass를 슬라이드에 덮었다. 슬라이드를 고정액(methanol:acetic acid=3:1)에 넣어 24시간 이상 고정시킨 후 0.25% acetolacmoid로 염색하여 위상차현미경으로 ×1,000 배율 하에서 정자의 난자내 침투 여부를 관찰하였다.

이때 정자의 두부가 팽창(enlargement of sperm head)되었거나 남성전핵이 보이며 해당 정자의 미부가 난자세포질내에서 식별될 때 정자가 난자내로 침투된 것으로 간주하였다. 전에에서 장자의 난자 침투정도는 정자 침투지수(침투된 총 정자 수/수정시킨 총 난자 수)로써 나타내었다.

5. 결과분석

체외수정시술시의 정상수정율을 일상적인 정액검사 및 SPA시행시 침투지수와 비교하여 정액검사와 SPA의 민감도(sensitivity), 특이도(specificity), 양성 예측치(positive predictive value), 음성예측치(negative predictive value)를 구하여 SPA의 임상적 타당성을 검증하였다.

결 과

1. 정상수정율과 정액검사의 상관관계

정상수정율은 과배란 유도 후 채취된 총 난자수에 대한 정상적으로 수정이된 난자수의 백분율(%)로 정의하였다. 정상수정율의 cut-off value는 대부분의 연구자(Acosta, 1991; Johnson et al., 1990)들이 30-35%로 보고하고 있다. 본 연구는 30%를 기준으로 분석하였다.

정액검사가 정상인 경우의 95예중 87예(91.6%)에서 31% 이상의 정상수정율을 보였으며, 8예(8.4%)에서는 30% 이하의 수정율을 나타냈다. 정액검사가 비정상인 경우의 28예중 7예(25%)에서 30% 이하의 정상수정율을 보였으며, 나머지 21예(75%)에서는 31% 이상의 수정율을 나타냈다.

따라서 수정율 30%를 기준으로 하였을 때 정액검사의 수정능예측에 대한 민감도는 80.6

Semen Analysis	Human Ova Fertilized IVF (%)			
	0	10-30	31-90	100
Normal	5	3	67	20
Abnormal	4	3	13	8

Semen Analysis

		+	-
IVF	+	87	21
	-	8	7

Sensitivity = 80.6% (87/108)

Specificity = 46.7% (7/15)

Positive Predictive Value = 91.6% (87/95)

Negative Predictive Value = 25% (7/28)

Fig. 2. Correlation between in vitro fertilization and semen analysis.

%, 특이도는 46.7%, 양성 예측치는 91.6%, 음성 예측치는 25%이었다(그림 2).

2. 정상수정율과 SPA의 상관관계

SPA가 정상으로 판정된 111예중 108예(97.3%)에서 체외수정시술시 31% 이상의 정상수정율을 보였으며, 3예(2.7%)에서는 30% 이하의 수정율을 나타냈다. SPA가 비정상인 경우의 12예중 12예(100%) 모두 30% 이하의 정상수정율을 보였으며, SPA의 결과, 즉 침투수가 0이었던 8예에서 체외수정이 모두 실패하였다.

따라서 수정율 30%를 기준으로 하였을 때 SPA의 수정능예측에 대한 민감도는 100%, 특이도는 80%, 양성 예측치는 97.3%, 음성 예측치는 100%이었다(그림 3).

고 찰

기존의 SPA는 실험간의 변이, 정도관리의 부재, 낮은 민감도와 특이도, 까다로운 실험기법, 긴 실험기간 및 많은 실험비용 등의 문제점을 가지고 있다(Rogers, 1985; Johnson et al., 1990).

본 저자들은 우선 SPA 수행상 중요한 몇몇 인자들에 대하여 각각 최대의 정자침투를 보이는 조건들을 규명하여 SPA 각각의 단계를 최적화 시킨 바 있으며(신과 장, 1990; Chang et

Penetrations Per Hamster Ovum	Human Ova Fertilized IVF (%)			
	0	10-30	31-90	100
29.0-3.0	1	2	80	28
2.9-1.0	0	4	0	0
0	8	0	0	0

SPA

		+	-
IVF	+	108	0
	-	3	12

Sensitivity = 100% (108/108)

Specificity = 80% (12/15)

Positive Predictive Value = 97.3% (108/111)

Negative Predictive Value = 100% (12/12)

Fig. 3. Correlation between in vitro fertilization and SPA.

al., 1990), 한국인 남성에게 있어서 SPA의 정상역 및 비정상역을 설정하였고(김 등, 1991), SPA의 시행을 보다 간편화 시키기 위하여 동결보존된 인간 정자(장 등, 1990) 및 햄스터 난자(정 등, 1992; 방 등, 1992a)를 이용하여 SPA를 시행한 바 있다. 또한 SPA 시행시 복잡한 실험기법에 의한 위음성 및 위양성 결과를 배제하기 위하여 대조표준 정자로서 냉동보존된 황소정자를 이용하여 정도관리(quality control)을 시도한 바 있다(신 등, 1990).

본 저자들은 SPA의 임상적 타당성을 검증하고자 본 연구를 시행하였는데, 연구결과 다른 보고자들(표 2)에 비하여 높은 민감도, 특이도, 양성예측치 및 음성예측치를 보이므로 잘 설정된 방법임을 재확인 할 수 있었다. 본 저자들이 설정한 SPA의 정확성은 정액검사(Gerris & Khan, 1987), hemizona assay(Franken et al., 1992), 엄격한 기준에 의한 정자형태분석(Kruger et al., 1988), hypoosmotic swelling test(Van der Ven et al., 1986), acrosin활성도 검사(Tummon et al., 1991) 및 computer aided sperm analysis(Holt et al., 1985) 등의 정자의 수정능을 예측하는 여러 검사방법보다 높았다.

일상적인 정액검사는 정자의 수정능 예측의 좋은 지표가 될 수 없다. 그림 2에서 나타난 바와 같이 정액검사가 비정상적으로 판정된 28

Table 2. Validity of sperm penetration assay for predicting in vitro fertilization failure

Authors	# Pts	Abnormal range	Sensitivity	Specificity	Predictive value	
					Positive	Negative
Wolf et al.(1983)	24	<10% ^a	0.00	0.89	0.73	0.00
Rogers(1985)	29	0% ^a	0.50	0.92	0.92	0.50
Foreman et al.(1984)	37	0% ^a	0.40	1.00	0.71	1.00
Ausmanas et al.(1985)	54	<15% ^a	0.33	0.73	0.95	0.07
Van Uem et al.(1985)	19	<10% ^a	0.78	0.80	0.80	0.78
Margarioth et al.(1986)	134	<20% ^a	0.57	0.94	0.85	0.78
Rudak et al.(1986)	68	<10% ^a	0.69	0.51	0.88	0.25
Johnson et al.(1980)	138	<5.1 ^b	0.92	0.78	0.95	0.67
McClure et al.(1990)	19	<10% ^a	0.93	0.75	0.93	0.75

^aPercentage of eggs penetrated,

^bPenetration index.

예중 21예가 30% 이상의 정상수정율을 보였다. 본 연구 결과 정자의 수정능을 예측하기 위한 정액검사의 문제점으로는 낮은 특이도와 낮은 음성예측치(높은 위음성 결과)가 지적될 수 있다. 반면에 SPA는 침투지수로 수정의 정도를 예측할 수 있었으며, 민감도, 특이도, 양성예측치 및 음성예측치가 매우 높았다.

SPA 시행방법에 있어서 대부분의 연구자들은 정자처리시 swim-up 방법을 이용하고 있는데 이 경우 정자의 전배양시간이 SPA 결과에 중요변수가 된다(Johnson & Alexander, 1984; 신과 장, 1990). 전배양 시간은 개체별로 심한 차이를 보이므로(Perreault & Rogers, 1982), 전배양 시간이 잘못 설정되었을 경우에 높은 위음성 결과를 보이게 된다. 전배양 시간은 1-2시간 정도의 짧은 시간보다는 18시간 정도의 긴시간이 낮은 위음성 결과를 보이고 있다(Rogers, 1985). SPA 시행시 정자의 수정능을 향진시키는 정자처리법을 이용하는 방법들이 개발되었는데 주로 TYB(Johnson et al., 1990; 신과 장, 1990)와 인간의 난포액(McClure, 1990)을 이용하고 있으며 기존의 swim-up 방법에 비해 민감도, 특이도, 양성예측치 및 음성예측치에 있어 매우 높은 성적을 보고하고 있다. 또한 SPA 시행시 사용하는 배양액 및 첨가하는 albumin의 농도도 중요하며 SPA 결과에 유의한 영향을 끼칠 수 있다(신과 장, 1990).

SPA결과의 해석에 있어서 각각의 연구실마다 다른 기준을 가지고 있다. 기존의 일상적인 SPA를 시행하는 저자들은 정자침투율 10-20%(표 2)로 설정하고 있고, 정자의 기능을 향

진시켜 SPA에 적용하는 저자들은 투명대 제거 햄스터 난자당 침투된 정자의 수가 많으므로 난자당 평균 정자침투수, 즉 침투지수로 산정하고 있다. 후자의 경우, 기준점을 Johnson 등(1990)은 5.0으로, 본 저자들은 3.0으로 설정하고 있다(김 등, 1991). SPA결과 해석시 정상역의 설정은 매우 중요한데, 대부분의 연구자들은 소수의 수정능이 입증된 공여자의 정자를 이용하여 산정하였거나, 다른 저자들의 기준을 그대로 적용하고 있는 실정이다.

SPA는 그 실험방법이 복잡하고 여러요인에 의해 영향을 받을 수 있으므로 SPA 시행시에는 항상 대조표준 정자를 이용하여야 좀 더 정확한 결과를 얻을 수 있으며, 실험상의 오류로 인한 위음성 결과를 최소화 할 수 있다. 대조표준 정자는 신선 인간 정자(신 등, 1990), 동결 인간 정자(장 등, 1990) 및 동결 황소정자(신 등, 1990)를 이용할 수 있는데, 본 저자들의 연구결과 동결 황소정자가 SPA 시행시 침투지수에 있어서 변이계수가 가장 적은 것으로 나타났다.

만약에 각 연구실에 설정된 SPA가 정확치 못하다면 위에 언급한 여러 요인을 최적화시킨 후, 정상역과 비정상역을 다시 설정하고, 철저한 정도관리를 함으로써 SPA의 정확성을 높일 수 있을 것으로 사료되며, 본 연구 결과, 본 저자들에 의해 설정된 SPA는 남성의 수정능력을 예측하기에 매우 유용한 방법으로 사료된다.

결 론

본 연구는 남성의 수정능을 평가하기 위한 정액검사와 본 교실에 설정된 SPA의 임상적 타당성을 검정하기 위하여 시행하였으며, 그 결과는 아래와 같다.

1. 정상수정율과 정액검사의 상관관계

정액검사가 정상인 경우의 95예중 87예(91.6%)에서 31% 이상의 정상수정율을 보였으며, 8예(8.4%)에서는 30% 이하의 수정율을 나타냈다. 정액검사가 비정상인 경우의 28예중 7예(25%)에서 30% 이하의 정상수정율을 보였으며, 나머지 21예(75%)에서는 31% 이상의 수정율을 나타냈다. 따라서 수정율 30%를 기준으로 하였을 때 정액검사의 수정능력예측에 대한 민감도는 80.6%, 특이도는 46.7%, 양성예측치는 91.6%, 음성예측치는 25%이었다.

2. 정상수정율과 SPA의 상관관계

SPA가 정상인 경우의 111예중 108예(97.3%)에서 31% 이상의 정상수정율을 보였으며, 3예(2.7%)에서는 30% 이하의 수정율을 나타냈다. SPA가 비정상인 경우의 12예중 12예(100%) 모두 30% 이하의 정상수정율을 보였다. 따라서 수정율 30%를 기준으로 하였을 때 SPA의 수정능력예측에 대한 민감도는 100%, 특이도는 80%, 양성예측치는 97.3%, 음성예측치는 100%이었다.

3. 본 저자들에 의해 설정된 SPA는 남성의 수정능을 평가하기에 매우 탁월한 방법으로 사료된다.

인 용 문 헌

Acosta AA: Systemic follicle stimulating hormone treatment and sperm fertilizing ability in assisted reproduction. *Clin Adv Androl* 1991, 1(No. 3), 1.

Ausmanas M, Tureck RW, Blasco L, Kopf GS, Ribas J, Mastrianni L: The zona-free hamster egg penetration assay as a prognostic indicator in a human in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1985, 43, 433.

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.

장윤석, 김석현, 강석진, 방명걸, 신창재, 문신용: 냉동 보존된 정자를 이용한 난자의 체외수정에 관한 연구. *대한산부회지* 1990, 33, 61.

정구민, 방명걸, 김석현, 신창재, 김정구, 문신용, 이진용, 장윤석: 투명대 존재/부재 햄스터 난자의 동결보존: 1-단계 평형과 2-단계 용해의 효과. *대한불임학회지* 1992, 19, 143.

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.

Foreman R, Cohen J, Fehilly CV, Fishel SB, Edwards RG: The application of zona-free hamster egg test for the prognosis of human in vitro fertilization. *J IVF ET* 1984, 1, 166.

Franken DR, Acosta AA, Fruger TF, Lombard C: The hemizona assay: Its diagnostic role in male factor in assisted reproduction. *Fertil Steril* 1992, (Abstracts) s105.

Gerris J, Khan I: Correlation between in vitro fertilization and human sperm density and motility. *J Androl* 1987, 8, 48.

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.

Johnson JP, Alexander NJ: Hamster egg penetration: comparison of preincubation periods. *Fertil Steril* 1984, 41, 599.

Johnson A, Bassham B, Lipshultz LI, Lamb DJ: Methodology for the optimized sperm penetration assay. In: Keel BA and Webster BW (eds). *Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility. Florida: CRC Press* 1990, 135.

김석현, 방명걸, 신창재, 김정구, 문신용, 이진용, 장윤석: 한국인 남성을 대상으로 한 햄스터 난자 침투 분석법의 정상 가입역 설정. *대한불임학회지* 1991, 18, 63.

Kruger TF, Acosta AA, Simmons K, Swanson RJ, Matta JF, Oehinger S: Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988, 49, 112.

- McClure PD, Tom RA, Dandekar PV: Optimizing the sperm penetration assay with human follicular fluid. *Fertil Steril* 1990, 53, 546.
- Mao C, Grimes DA: The sperm penetration assay: Can it discriminate between fertile and infertile men? *Am J Obstet Gynecol* 1988, 159, 279.
- Margalioth EJ, Navot D, Laufer N, Lewin A, Rabinowitz R, Schenker J: Correlation between the zona-free hamster egg sperm penetration assay and human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986, 45, 665.
- 방명걸, 정구민, 김석현, 신창재, 김정구, 문신용, 이진용, 장윤석: 냉동보존된 햄스터 난자를 이용한 인간정자의 생식력 평가. 대한불임학회지 1992a, 19, 153.
- 방명걸, 김기철, 신창재, 문신용, 이진용, 장윤석: Test-Yolk Buffer에 의한 인간정자의 수정능 증진효과에 관한 연구. 대한불임학회지 1992b, 19, 57.
- Perreault SD, Rogers BJ: Capacitation pattern of human spermatozoa. *Fertil Steril* 1982, 38, 258.
- Rogers BJ: The sperm penetration assay: its usefulness reevaluated. *Fertil Steril* 1985, 43, 821.
- Rogers BJ, van Campen H, Veno M, Lambert H, Bronson R, Hale R: Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil Steril* 1979, 32, 664.
- Rudak E, Dor J, Nebel L, Maschiach S, Goldman A: Assessment of predictive ability of the zona-free hamster egg penetration for the outcome of treatment by IVF-ET. *Int J Androl* 1986, 6(suppl), 131.
- 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 침투법에서 대조표준 정자로서 황소정자의 유용성에 관한 연구. 대한산부회지 1990, 33, 1758.
- Smith KD, Rodriguez-Rigau LJ, Steinberger E: Relation between indices of semen analysis and pregnancy rate in infertile couples. *Fertil Steril* 1977, 28, 1314.
- Tummon IS, Yuzpe AA, Daniel SAJ, Deutsch A: Total acrosin activity correlates with fertility potential after fertilization in vitro. *Fertil Steril* 1991, 56, 933.
- Van der Ven HH, Rajasingam S, Jeyendran RS, Al-Hasni S, Perez-Pelaez M, Diedrich K, Zaneveld LJD: Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium and in vitro fertilization. *J Androl* 1986, 7, 190.
- Van Uem JFHM, Acosta AA, Swanson RJ, Mayer J, Ackerman S, Burkman LJ, Veek L, McDewell JS, Bernardus RE, Jones HW: Male factor evaluation in Vitro fertilization: Norfolk experience. *Fertil Steril* 1985, 44, 375.
- Wolf DP, Sokoloski JE, Quigley MM: Correlation of human in vitro fertilization with the hamster egg bioassay. *Fertil Steril* 1983, 40, 53.
- 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.