

항정자항체 검출에 있어서 gelatin 정자응집검사법 및 정자부동화검사법의 비 교 관 찰

중앙대학교 의과대학 비뇨기과학교실

소 병 역 · 김 세 철

ABSTRACT

A Comparison of the Kibrick Macro-Agglutination Test and the Isojima Micro-Immobilization Test for Antisperm Antibody in Male Sera

Byoung Uck Soh and Sae Chul Kim

from the Department of Urology, College of Medicine,

Chung-Ang University, Seoul, Korea

Various immunoserologic and cellular immunity techniques have been used to explore the presence of antisperm antibodies in the serum and seminal plasma of male patients and in the blood and genital fluid of infertile women.

Several recent comparative investigations using various assays to detect and quantify levels of antibody to human spermatozoa have produced widely varying results.

So the first WHO workshop on iso- and autonatibodies to human spermatozoa in 1974 tried to establish some unification in the techniques used.

The purpose of this study is to compare the results of two methods-the Kibrick macro-agglutination test and the Isojima micro-immobilization test-using the same test materials based on recommendation from WHO workshop.

The results are as follows:

1. Twenty normal controls showed negative reactions in all the 2 tests. Out of 25 patients, the positive sera were noted in 15 (60%) on the Kibrick test and 13 (51%) on the Isojima test.
2. Twelve (48%) out of 25 patients showed positive reactions in the two tests, and 16 (64%) out of 25 patients showed positive reaction in one or more tests.
3. The titers of the antisperm antibodies on the Kibrick test was higher than that on the Isojima test.

Therefore, it seems to be possible to increase the chances of detection of the antisperm antibodies, if two tests are employed.

본 연구비는 1984년도 중앙대학 의과대학 부속병원 및 일성신약주식회사에서 지급된 연구조성비로 이루어 졌음.

항정자항체에 대한 연구는 1899년 Landssteiner가 실험동물에서 정자의 항원성을 입증한 이래 여러 연구자들에 의해 계속되었으며 체내에 형성된 항정자항체를 검출해 내는 여러 가지 방법들이 계속 발표되었으나 그 방법들은 재현성이 낮으며 각 실험실마다 실험방법에 차이가 있고 결과판독에도 주관성이 개입되므로 그 결과가 상이하였다.

이에 저자들은 항정자항체가 형성될 가능성이 있는 남자환자 25명과 정상소견을 보이는 20명에서 항정자항체의 검사법으로 지금 널리 이용되고 있는 gelatin 정자응집검사와 정자부동화검사를 시행하여 그 결과를 비교 관찰하였다.

연구 대상

1984년 3월부터 1984년 12월까지 중앙대학교 의과대학 부속병원 및 중앙대학교 부속 용산병원 비뇨기과에 내원한 환자중 항정자항체 형성의 가능성이 있는 남자환자 25명과 정상대조군으로서 이학적검사, 과거력 및 정액 검사에서 정상소견을 보이는 의과대학생 20명을 대상으로 하였다. 25명의 환자군은 정관절제술을 시행받은 사람이 11례, 원인불명의 불임증 4례, 부고환염 5례, 정자 육아종, 정류고환, 정액류, 부고환낭종, 고환파열이 각각 1례 였다(table 1).

Table 1. Disease distributions of the patient group

Disease	Number
Vasectomy	11
Epididymitis	5
Unexplained infertility	4
Sperm granuloma	1
Cryptorchidism	1
Spermatocele	1
Epididymal cyst	1
Testicular rupture	1
Total	25

1. Gelatin 정자응집검사법 (macro-agglutination test of kibrick)

항원 : 과거력 및 이학적검사에서 정상소견을 보인 건강한 성인 남성에서 용수법에 의해 정액을 채취한 후 정액검사에서 정상소견을 보이는 정액만을 수집하여 Baker 완충용액으로 정자수가 $4 \times 10^7/ml$ 되도록 희석한 후 동량의 10% gelatin 용액과 혼합하여 항원으로 사용하였다. 이때 정자의 운동성은 50% 이상이었다.

항체 : 채혈 후 혈청을 분리하여 $-20^{\circ}C$ 에서 냉동보존하였으며 항체역가측정 당일에 실온에서 녹인 후 $56^{\circ}C$ 에서 30분간 비동화시킨 다음 Baker 완충용액으로 1:3부터 1:729까지 3배수 희석하여 사용하였다.

시약 : Gelatin을 Baker 완충용액에 용해시켜서 10% gelatin 용액을 만들어 사용하였다.

기구 : 내경이 3mm, 길이가 65mm인 Kibrick 시험관을 사용하였다.²

검사방법 : 각각의 kibrick 시험관에 $400\mu l$ 씩의 Baker 완충용액을 넣은 후 환자군 25명과 정상대조군 20명의 혈청을 $200\mu l$ 씩 이용하여 1:3부터 1:729까지 3배수 희석한 뒤 항원을 각 kibrick 시험관에 $200\mu l$ 씩 넣었다. 2시간 후 관찰하여 1974년 WHO에서 설정한 판독기준에 따라 응집이 1:20 이상에서 관찰될 경우 양성으로 판정하였다.

2. 정자부동화 검사법 (micro-immobilization test of Isojima)

항원 : 과거력 및 이학적 검사에서 정상소견을 보이는 건강한 남성에서 용수법에 의해 정액을 채취한 후 정액검사에서 정상소견을 보이는 정액만을 수집하여 정자수가 $3 \times 10^7/ml$ 되도록 Tyrode 완충용액으로 희석하여 항원으로 사용하였다. 사용 당시 정자의 운동성은 70% 정도였다.

항체 : 채혈 후 혈청을 분리하여 -20°C 에서 냉동보존하였으며 항체역가측정 당일에 실온에서 녹인 뒤 56°C 에서 30분간 비동화시킨 후 사용하였다.

시약 : 건강한 성인 남성에서 분리시킨 혈청을 Tyrode 완충용액을 이용하여 1:10 으로 희석시킨 보체용액 (complement solution) 을 사용하였다.

검사방법 : Tyrode 완충용액을 이용하여 25 명의 환자군 및 20 명의 정상대조군의 혈청을 1:2 부터 1:128 까지 2 배수 희석한 뒤 각각의 혈청 $250\ \mu\text{l}$, 보체용액 $50\ \mu\text{l}$, 항원 $25\ \mu\text{l}$ 씩을 Costar[®] 제의 조직배양평판 (tissue culture microplate with u-button) 에 넣은 후 32°C 에서 60분간 보온한 후 100배 시야에서 검경하여 정자의 운동성을 측정하였다. 결과 판정은 1974년 WHO에서 설정한 판독기준에 따라 환자군의 정자운동성이 대조군에

비해 50% 이하일 경우 양성으로 하였다.

연구 방법

정상대조군은 gelatin 정자응집검사법 및 정자부동화검사법 모두에서 음성반응을 보였다.

환자군에 대한 항정자항체 검출율은 정관절제군에서는 gelatin 정자응집검사법이 11례 중 7례 (63.6%), 정자부동화검사법은 11례 중 5례 (45.5%)가 양성이었으며 2례를 제외하고는 서로 일치되는 소견을 보였다. 부고환염환자에서는 5명 중 3명이 두가지 검사법 모두에서 양성반응을 보였다. 원인불명의 불임증 환자는 4례 중 2례가 두 검사에서 모두 양성을 보였다. 정류고환 환자에서는 정자부동화검사법에서만 양성반응을 나타냈으며 고환파열은 gelatin 정자응집검사법에서만 양성반응을 보였다 (table 2).

Table 2. Summary of Reactions

Disease	Case	Kibrick		Isojima	
		Result	Titer	Result	Titer
Vasectomized state	1	-		-	
	2	+	1:243	+	1:8
	3	-		-	
	4	+	1:27	+	1:32
	5	+	1:243	-	
	6	+	1:243	+	1:64
	7	+	1:243	-	
	8	+	1:27	+	1:32
	9	-		-	
	10	-		-	
	11	+	1:243	+	1:16
	12	-		-	
Epididymitis	13	+	1:729	+	1:32
	14	+	1:81	+	1:8
	15	+	1:243	+	1:16
	16	-		-	

	17	—	—		
Unexplained infertility	18	+	1:81	+	1:8
	19	—		—	
	20	+	1:243	+	1:16
Sperm granuloma	21	—		—	
Cryptorchidism	22	—		+	1:32
Spermatocoele	23	+	1:81	+	1:64
Epididymal cyst	24	—		—	
Testicular rupture	25	+	1:81	—	

이상의 결과를 종합하면 정상대조군은 두가지 검사에서 모두 음성반응을 보였으나 환자군에서는 25례중 16례(64%)가 한가지 검사 이상에서 양성반응을 보였고 12례(48%)가 2가지 검사 모두에 양성반응을 나타냈다. 각 검사의 양성률은 gelatin 정자응집검사법이 15례(60%), 정자부동화검사법은 13례(52%)였다. 또한 gelatin 정자응집검사법에서 양성이었으나 정자부동화검사법에서 음성이었던 예는 15례중 3례였고 정자부동화검사법에서 양성이었으나 gelatin 정자응집검사법에서 음성이었던 예는 13례중 1례였다.

고 안

1954년 Wilson³, Rumke⁴ 에 의해 인체에서 나타나는 정자에 대한 자가면역현상이 처음으로 관찰되었다.

Wilson³ 은 남성불임증 환자의 정자는 자기 정액 내에 자가항체가 있어 응집현상을 일으키며 더우기 응집된 정자는 자궁경부점액을 통과하지 못하는 현상을 관찰한 후 자가항체에 의한 자가응집현상을 불임의 원인이라고 설명하였다. Rumke⁴ 는 피정자증 환자의 혈청이 정상인의 정자를 응집시키는 현상을 발견하였으며 이러한 현상은 자가면역반응에 연유할 지도 모른다고 하였다. 또한 정자도관의 폐색이 있으면 폐쇄

부위로부터 고환 쪽의 정자도관의 내압이 상승하여 정자가 간질조직으로 누출되면 이로 인하여 항체가 생성된다고 했으며 이를 근거로 하여 정자도관의 폐색이 일측에만 있거나 또는 염증으로 일시적 폐색이 있는 남자에서는 정자응집을 일으키는 자가면역현상이 발생하여 불임의 원인이 될 것으로 추정하였다.

정자에 대한 종족내 항체 및 자가항체를 검출 측정하는 혈청검사는 정자항원을 이용하는 방법에 따라 여러가지 검사법이 있으나 주로 정자응집검사법과 정자부동화검사법이 많이 사용되고 있다.

정자응집항체를 검사하는데 이용되는 방법에는 1) tube slide 응집검사법, 2) gelatin 정자응집검사법, 3) 모세관정자응집검사법, 4) Franklin - Dukes 현미경적 정자응집검사법 등이 있으며 이중 gelatin 정자응집검사법이 가장 많이 이용되고 있다.

gelatin 정자응집검사법^{2,5,6} 은 주로 혈청내의 Ig G나 Ig M에 의해 그 반응이 나타나며 여성환자에게는 사용이 제한되어 지는데 그 이유는 여성에서 형성된 항정자항체는 정자의 두부와 두부가 결합되어지는 정자응집 반응을 일으키는데 비해 gelatin 정자응집 검사법은 미부와 미부가 결합된 형태의 정자응집반응을 잘 검출하기 때문이다. gelatin 정자응집검사법의 단점으로는 다량의 신선한 정액이 필요하

다는 점과 정자의 응집이 어떤 상태로 이루어졌는지 알 수 없다는 것과 판독시 주관이 개입될 요소가 있고 양성의 판정기준이 단일화되어 있지 않다는 점 등을 들 수 있다.^{2,5,6} 또한 피검자의 수가 많을 경우에는 일정량의 정액을 분주 및 혼합하는데 많은 시간이 소요되므로 정자의 운동성에 차이가 올 수 있다. 따라서 피검자의 수가 많을 경우는 이 검사방법은 부적절하다. Phadke와 Padukone⁸는 25명의 후천성 정자통로폐색 환자중 5명(20%)의 혈청에서 또한 정관절제술을 받은 25명의 환자중 8명(32%)의 혈청에서 정자응집항체를 발견하였으며 Ansbacher⁹는 정관절제술을 받기 전에 검사한 106례에서는 단지 1례만이 역가 1:4의 응집항체를 나타냈으나 정관절제술 후 2년이 경과한 사람에서는 62%에서 혈청내 정자응집항체가 발견되었다고 보고하였다. 또한 Amelar¹⁰ 등은 29명의 선천성정관결손환자중 18명(62.1%)에서 1:32에서 1:4096의 높은 역가의 정자응집항체를, 5명(17.2%)에서 1:16 이하의 낮은 역가의 정자응집항체를 발견하였다. 그러나 Rumke와 Hellings¹¹는 2015명의 불임남성의 혈청에서 3.3%, Fjallibrant¹²는 400명의 불임남성에서 6.8%의 비교적 낮은 정자응집항체의 양성율을 보고했다. 저자의 연구에서는 정관절제군은 11례중 7례(63.6%), 부고환염환자는 5례중 3례, 원인불명의 불임증 환자는 4례중 2례가 양성을 보였으며 전체적으로 25례중 16례(64%)의 양성율을 나타냈다.

정자부동화검사법^{5,13}은 gelatin 정자응집 검사법에 비해 특히 여성의 혈청 및 질 점액내의 항정자항체를 검출하는데 유리하며 남성 혈청 내의 정자부동화항체의 역가는 gelatin 정자응집검사법에 비해 낮게 나타난다.¹⁴ Ansbacher⁹는 정관절제술을 받은 남자의 30%에서 정관절제술 후 1년까지 정자부동화항체가 나타났으나 18개월 후에 9.5%로 감소했다고 보고하였다. 저자의 연구에서는 정관절제군은 11례중 5례(45.5%)에서 양성을 나타냈으며

부고환염에선 5례중 3례, 원인불명의 불임증에선 4례중 2례가 양성으로 나타났고 전체적으로는 25례중 13례(52%)가 양성이었다. 정자부동화항체의 임상적 의의는 이 항체가 나타나는 환자의 100%에서 정자운동성의 저하를 보이며 정액내 항정자항체의 역가와 운동성의 정도 사이에는 밀접한 상관관계를 보이는 것이다. 또한 전체적으로 정자부동화항체의 역가는 정자응집항체에 비해 Boettcher¹⁴의 보고와 같이 1단계 또는 2단계 이상 낮았다.

결 론

1984년 3월부터 1984년 12월까지 중앙대학교 의과대학 부속병원 및 중앙대학교 부속 용산병원 비뇨기과를 내원한 환자중 25명의 항정자항체가 생성되어 있을 가능성이 높은 환자와의 학적 검사 및 과거력 그리고 정액검사에서 정상소견을 보이는 20명의 정상대조군의 혈청을 이용하여 gelatin 정자응집검사법과 정자부동화검사법을 시행한 후 1974년 WHO에서 설정한 방법에 따라 판독한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 정상대조군은 두가지 검사에서 모두 음성이었다. 환자군에서 gelatin 정자응집검사법은 25례중 15례(60%), 정자부동화검사법은 25례중 13례(52%)가 양성이었다.
2. 두가지 검사법 모두에서 양성반응을 보인 것은 25례중 12례(48%)였으나 2가지 검사법중 적어도 한가지 검사 이상에서 양성반응을 보인 것은 25례중 16례(64%)였다.
3. 항정자항체의 역가는 gelatin 정자응집 검사법이 정자부동화검사법에 비해 높게 나타났다.

REFERENCES

- 1) Landsteiner, K.: *Zur Kenntnis der Spezifisch auf Blutkoeperchen Wirkenden Sera.* *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk.* 25:546, 1899.
- 2) Kibrick, S., Belding, D.L. and Merrill, B.: *Methods for the detection of antibodies against mammalian spermatozoa. II A gelatin agglutination test.* *Fertil. Steril.* 3:430, 1952.
- 3) Wilson, L.: *Sperm agglutinins in human semen and blood.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 84:642, 1954.
- 4) Rumke, P.: *The presence of sperm anti-bodies in the serum of two patients with oligospermia.* *Vox. Sang.*, 4:135, 1954.
- 5) Rose, N.R., Hjort, T., Rumke, P., Harper, M.J.K. and Vyazov, O.E.: *Technique for detection of iso- and autoantibodies to human spermatozoa.* *Clin. Exp. Immunol.*, 23:175, 1976.
- 6) Jones, W.R.: *Immunologic infertility- Fact or fiction?* *Fertil. Steril.*, 33: 577, 1980.
- 7) Haas, G.G.Jr., Cines, D.B. and Schreiber, A.D.: *Immunologic infertility: Identification of patients with antisperm antibody.* *The New Zealand J. Med.*, 303:722, 1980.
- 8) Phadke, A.M. and Padukone, K.: *Presence and significance of autoantibodies against spermatozoa in the blood of men with obstructed vas deferens.* *J. Reprod. Fertil.*, 7:163, 1964.
- 9) Ansbacher, R.: *Sperm agglutinating and sperm immobilizing antibodies in vasectomized men.* *Fertil. Steril.*, 22:629, 1971.
- 10) Amelar, R.D., Dubin, L. and Walsh, P.C.: *Male infertility.* Philadelphia. W. B. Saunders, 1977
- 11) Rumke, P. and Hellings, G.: *Autoantibodies against spermatozoa in sterile men.* *Am. J. Clin. Pathol.*, 32:357, 1959.
- 12) Fjallbrant, B.: *Interrelation between high levels of sperm antibodies reproduced penetration of cervical mucus by spermatozoa, sterility in men.* *Aacsta. Obstet. Gyneco. Scand.*, 47:102, 1968.
- 13) Isojima, S., Li, S.T. and Ashitaka, Y.: *Immunologic analysis of sperm-immobilizing factor found in sera of women with unexplained terility.* *Am. J. Obstet. Gyneco.*, 101:677, 1968.
- 14) Boettcher, B., Hjort, T., Rumke, P., Shulman, S. and Vyazov, O.E.: *Auto- and iso-antibodies to antigens of the human reproductive system. I. Results of an International Comparative Study.* *Clin. Exp. Immunol.* 30:173, 1977.