

## 냉동보존된 햄스터 난자를 이용한 인간정자의 생식력 평가

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

방명걸 · 정구민 · 김석현 · 신창재 · 김정구 · 문신용 · 이진용 · 장운석

### Assessment of Fertilizing Capacity of Human Spermatozoa Using Cryopreserved Hamster Oocytes

Myung-Geol Pang, Ku Min Chung, Seok Hyun Kim, Chang-Jae Shin, Jung Gu Kim, Shin Yong Moon, Jin Yong Lee and Yoon Seok Chang

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

#### = Abstract =

To solve the logistical problems of the sperm penetration assay (SPA) to provide just a sufficient number of hamster ova exactly when they are needed, a new method to cryopreserve the ova has been devised (1-step dehydration and 2-step thawing). After freezing & thawing of zona-intact (ZI) and zona-free (ZF) hamster ova according to this new method, the frozen-thawed ova were compared with fresh, control ova (FO) in terms of the degree of sperm penetration in SPA using semen samples from fertile donors, subfertile, and infertile male. Each sperm sample was capacitated for 42 hours in TEST-Yolk Buffer before insemination in SPA.

In fertile doner, both the penetration rate and penetration index were lower in SPA using frozen ova (ZI; 92.4 %, 6.2, ZF; 63.7 %, 3.9) than those of SPA using fresh ova (99.3 %, 8.4). There was a significant correlation between the penetration index of SPA using FO and ZI ( $p < 0.001$ ), and between those of SPA using FO and ZF and ova ( $p < 0.001$ ).

In subfertile patient, both the penetration rate and penetration index were lowered in frozen ova (ZI; 62.3 %, 1.3, ZF; 21.8 %, 0.4) than those of fresh ova (74.8 %, 1.8). There were significant correlation between the penetration rate and penetration index in ZI ova ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively).

In infertile patient, both the penetration rate and penetration index were ZI; 3.1 %, 0.0, ZF; 0.0 %, 0.0, respectively. There were significant correlation between the penetration rate and penetration index in ZI ova ( $p < 0.05$ ).

#### 서 론

불임영역에 있어 남성 정자의 수정능력을 충실히 반영해주는 임상검사법의 개발은 불임인자의 규명 및 향후 치료 방향 설정에 절대 필요한 것이나 아직은 만족스럽지 못한 수준에 있다. 일상적으로 시행하는 정액검사는 기본적인

인 검사이지만 해당 남성 정자의 생식능력을 정확하게 반영하지 못한다. 이러한 문제점을 해결해 보고자 인간정자의 수정 및 생식능력을 평가하는 체외 분석법인 Sperm Penetration Assay (이하 SPA라 함)가 1976년 Yanagimachi에 의해 처음 개발되었다. 그 후 Rogers등 (1979)이 처음으로 생식력 유무에 따른 햄스터 난자 침투율의 범위를 규명한 이래, 여러 연구가 거듭되어 남성 생식력 평가법으로서 SPA의 유용성을 재확인 하였다.

\* 본 연구는 1990년도 정부출연금 연구비의 보조로 이루어진 것임.

그러나 SPA 시행시엔 항상 미리 짜여진 실험시간표에 따라 때맞춰 햄스터의 과배란 유도, 난자 채취 및 정액 채취등을 실시해야 하므로 검사자나 피검사자가 모두에게 많은 불편을 주고 있다. 특히 SPA에서는 배란된 후 수 시간내의 신선 햄스터 난자를 사용하게 되므로 배란후 단시간 이내에 이를 이용하여야 하며 또한 햄스터 개체별로 과배란 유도에 따른 난소반응 및 배란율에 변이가 매우 심하다는 문제가 있다. 이러한 문제점들을 보완하고자 햄스터 난자나 피검사자의 정액을 동결보존하였다가 적당한 시간에 검사하는 방법이 대두되어 1976년 Tsunoda 등이 햄스터 난자의 동결보존에 성공한 이래 Parkening과 Chang (1977)이  $-75^{\circ}\text{C}$ 에서 투명대가 존재하는 햄스터 난자를, 또한 Fleming등 (1979)이 투명대를 제거한 햄스터 난자를  $-50^{\circ}\text{C}$ 까지 온도를 하강시킨 후  $-196^{\circ}\text{C}$ 에서 보존한 후 이를 융해시켜 비교적 높은 생존율과 높은 수정율을 보고하였고, Quinn등(1982)이 동결보존된 햄스터 난자를 SPA에 도입하여 남성의 생식력을 평가한 바 있다. 그러나 생식세포, 특히 인간 난자의 동결은 융해후 생존율이 아직까지 낮아 인간의 체외수정에서도 난자 채취시 얻어지는 잉여난자를 보관시킬 때 난자(oocyte)가 아닌, 배아(embryo) 상태로서 동결보존해 온 실정이었다. 또한 햄스터 난자의 경우에도 신선 햄스터 난자에 비해 동결-융해후 정자침투정도가 매우 낮은것으로 보고되어 왔으며, 이러한 문제점으로 인해 햄스터 난자의 동결보존은 아직 SPA과정에 널리 응용되지 못하였다. 그러나 최근 들어와 냉동생물학 및 냉동보존기술의 발달로 인해 생식세포의 동결-융해후 생존율이 많이 향상되어 냉동-융해한 햄스터 난자에서 높은 생존율 및 양호한 정자침투 성적을 보고하여 동결보존된 햄스터 난자의 임상적 유용성과 SPA 시행의 간편화에 대해 강조되고 있으며 (Leibo et al., 1990), 1990년 본 저자들 (장 등)이 SPA에 있어 인간 냉동정자가 신선정자를 사용할 때의 제반 문제점을 줄일 수 있어 불임질환의 진단에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 시사하였다.

본 저자들은 본 교실에서 개발된 동결-융해법 (정 등, 1992)에 의해 보존된 햄스터 난자를 이용한 SPA를 시행하여 햄스터 난자 동결보존의 임상적 유용성을 타진하여 SPA를 보다 간편화 함으로써 그 유용성을 증진시키고자 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구대상

18명의 수정능력이 입증된 정액공여자(가임군), 12명의 준가임환자(subfertile patient) 및 15명의 남성불임환자의 정자를 신선 햄스터 난자 (이하 FO로 약칭함), 투명대가 존재한 상태로 동결한 햄스터 난자(이하 ZI로 약칭함) 및 투명대가 제거된 상태로 동결된 햄스터 난자(이하 ZF로 약칭함)에 수정시켰다. 각각의 정자를 FO, ZI 및 ZF 난자에 동시에 수정시킨 후 그 결과를 비교하였다.

### 2. 햄스터 난자의 준비

생후 12-16주령 햄스터에 pregnant mare serum gonadotrophin (이하 PMSG라 함) 35 IU를 복강내로 주사한 후 52시간 지나 human chorionic gonadotrophin (이하 hCG라 함) 35 IU를 복강내 주사하여 과배란을 유도하였다. hCG 투여 14-16 시간 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. 투명대의 제거는 신선난자 및 ZF 난자의 경우 난구세포 제거직후 시행하였으며, ZI 난자의 경우 융해직후 제거하였다.

### 3. 햄스터 난자의 동결 및 융해

햄스터 난자의 동결 및 융해는 본 교실에서 개발된 1단계 탈수화와 제2단계 융해법을 이용하여 실시하였다 (정 등, 1992). ZI와 ZF 난자는 1.5M 1, 2-Propanediol과 0.1M Sucrose를 함유한 D-PBS (+0.4 BSA)에 10분간 노출시켜 탈수화를 유도하였다. 그 후 0.25 ml plastic straw에 탈수된 난자를 주입하여 자동동결기 (Planner, #Cryo-10)의 챔버안에 수직으로 장착하여 상온 ( $20^{\circ}\text{C}$ )에서  $-7^{\circ}\text{C}$ 까지 분당  $2^{\circ}\text{C}$ 씩 냉각한 다음  $-7^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 정제하였다.  $-7^{\circ}\text{C}$ 에서 1분이 경과할 때 액체질소에서 냉각된 핀셀으로 식빙 (seeding)을 실시하였다.  $-7^{\circ}\text{C}$ 에서  $-30^{\circ}\text{C}$ 까지는 분당  $-0.3^{\circ}\text{C}$ 까지는 분당  $0.3^{\circ}\text{C}$ 씩 온도

를 하강한 다음 -30°C에서 10분간 정제하였다. 그 다음 스트로를 동결기에서 액체질소통으로 옮겨 분당 약 88°C씩 온도를 내리면서 스트로를 액체질소에 넣었다. 적어도 1주일 이상 액체질소통에 보존된 스트로를 신속히 꺼내어 공기(23-25°C)에서 20초간 노출시킨 후 온수(33-35°C)에 직접 넣어 10초간 용해하였다.

#### 4. 정액의 처리 및 수정

정자 처리는 본 연구실에서 개발한 정자처리법(신과 장, 1990; Chang et al., 1990; 김 등, 1991)에 의거하여 시행하였다. 즉 채취된 정액을 상온에서 30분간 액화시키고 일상적인 정액검사를 시행한 후 정액을 TEST-Yolk Buffer(이하 TYB라 함)와 용량비 1:1로 천천히 혼합하고 4°C까지 천천히 온도를 하강시킨 후 4°C에서 42시간 동안 저온 배양한 후 37°C의 Ham's F-10(+0.3 human serum albumin, 이하 HSA라 함) 6ml로 2회 세척(650 G, 10분)한 후 정자피(sperm pellet)에 0.5-1.0ml의 Ham's F-10(+1.0% HSA)을 추가하였다. 그 후 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 90분간 배양한 후 상층액만 모아 이의 일부로 정자수와 운동성을 검사하였다. 동결-용해시킨 햄스터 난자 및 신선한 햄스터 난자를 0.1% trypsin D-PBS(+0.3% BSA)에서 투명대를 제거한 후 처리된 운동성 정자 1×10<sup>6</sup>/ml와 수정시켰으며 투명대를 제거한 후 동결한 난자는 용해 후 바로 수정시켰다.

#### 5. 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 glass 주위 네곳에 소량의 veseline-paraffine을 떨구고 슬라이드를 덮은 후 실체현미경으로 관찰하면서 난자가 파손되지 않도록 조금씩 조절하며 cover glass를 슬라이드에 눌렀다. 슬라이드를 고정액(methanol:acetic acid=3:1)에 넣어 24시간 이상 고정시킨 후 acetolacmoid로 염색하여 위상차현미경으로 ×1,000 배율하에서 정자의 난자내 침투 여부를 관찰하였다.

이때 정자의 두부가 팽창(enlargement of sperm head)되었거나 남성전핵이 보이며 해당정자의 미부가 난자세포질 내에서 식별될 때 정자가 난자내로 침투된 것으로 간주하였다. 전예에서 정자의 난자 침투정도는 정자 침투율

(정자가 한개 이상 침투된 난자 수/수정시킨 총 난자 수 ×100) 및 정자 침투지수(침투된 총 정자 수/수정시킨 총 난자 수)로서 나타내었다.

## 결 과

18명의 수정능력이 입증된 정액공여자(가임군), 12명의 준가임환자(subfertile patient) 및 15명의 남성불임환자의 정자를 신선 햄스터 난자(FO), 동결시 투명대 존재(ZI) 난자 및 투명대 제거(ZF) 난자에 수정시켰다. 각각의 정자를 FO, ZI 및 ZF 난자에 동시에 수정시킨 후 그 결과를 비교하여 냉동보존된 햄스터 난자의 임상적 유용성을 타진해 보았다. 본 실험에 이용한 동결 난자의 생존율은 ZI 난자의 경우 95.4%, ZF 난자의 경우 67.6%이었다(정 등, 1992).

표 1은 가임군에서의 FO, ZI 및 ZF 난자의 햄스터 난자 침투 분석 결과이다. FO, ZI 및 ZF 난자에서의 정자 침투율은 각각 99.3, 92.4, 63.7%로 신선난자의 침투율이 가장 높았으며, 동결시 투명대가 존재한 상태의 난자가 투명대가 제거된 난자에 비해 침투율이 높았고, 정자 침투지수도 각각 8.4, 6.2, 3.9로 침투율과 같은 양상을 보였다. 그림 1은 가임군에서 ZI 또는 ZF 난자에서의 침투율과 FO의 침투율간의 상관관계를 각각 나타낸 것인데 FO와 ZI간( $r=0.130$ ) 및 FO와 ZF간( $r=0.228$ )에 유의한 상관관계가 없었다. 그림 2는 가임군에서 ZI 또는 ZF 난자에서의 침투지수와 FO와 침투지수간의 상관관계를 나타낸 것인데 FO와 ZI간( $r=0.956$ ,  $p<0.001$ ) 및 FO와 ZF간( $r=0.820$ ,  $p<0.001$ )에 매우 유의한 상관관계가 있었다.

표 2는 준가임군에서의 FO, ZI 및 ZF 난자의 햄스터 난자 침투 분석 결과이다. FO, ZI 및 ZF 난자에서의 정자 침투율은 각각 74.8, 62.3, 21.8%로 신선난자의 침투율이 가장 높았으며, 동결시 투명대가 존재한 상태의 난자가 투명대가 제거된 난자에 비해 침투율이 높았고, 정자 침투지수도 각각 1.8, 1.3, 0.4로 침투율과 같은 양상을 보였다. 그림 3은 준가임군에서 ZI 또는 ZF 난자에서의 침투율과 FO의 침투율간의 상관관계를 나타낸 것인데 FO와 ZI간에 상관관계수  $r=0.874$  ( $p<0.001$ )로 매우 유의한 상관관계를 보였으나, FO와 ZF간에는 유의한 상관관계가 없었다. 그림 4는 준가임군에서 ZI 또는 ZF 난자에서의 침투지수와

FO의 침투지수간의 상관관계를 보였으나, FO와 ZF간에는 상관관계가 없었다.

표 3은 불임군에서의 FO, ZI 및 ZF 난자의

햄스터 난자 침투 분석 결과이다. FO, ZI 및 ZF 난자에서의 정자 침투율은 각각 12.1, 3.1, 0.0%로 신선난자의 침투율이 가장 높았으며,

**Table 1.** Sperm penetration assay of fertile donor sperm

	Fresh		Zona intact <sup>a</sup>		Zona free <sup>b</sup>	
	PR <sup>c</sup>	PI <sup>d</sup>	PR	PI	PR	PI
F- 1	100	4.2	82	2.3	27	0.5
F- 2	100	8.2	90	5.3	50	1.2
F- 3	100	8.3	100	6.3	71	4.3
F- 4	100	14.7	88	9.3	57	8.4
F- 5	100	4.7	75	2.4	57	1.4
F- 6	90	3.5	89	1.6	82	1.5
F- 7	100	4.4	74	1.3	55	0.5
F- 8	100	9.8	100	6.4	67	4.8
F- 9	100	8.7	100	6.6	67	4.7
F-10	100	5.6	89	4.4	50	3.2
F-11	100	6.9	89	5.6	67	3.7
F-12	100	10.4	100	9.9	83	8.3
F-13	100	9.1	100	8.0	83	7.5
F-14	100	11.3	100	9.6	60	1.0
F-15	100	7.2	100	5.1	30	0.9
F-16	100	10.3	100	6.1	80	4.0
F-17	100	20.0	100	19.2	100	12.0
F-18	97	3.5	88	2.5	60	1.6
Mean±SEM	99.3±2.4	8.4±4.2	92.4±8.9	6.2±4.2	63.7±18.5	3.9±3.3

<sup>a</sup> Freezing of zona-intact hamster ova, <sup>b</sup> Freezing of zona-free hamster ova, <sup>c</sup> PR; penetration rate, <sup>d</sup> PI; penetration index

**Table 2.** Sperm penetration assay of subfertile patient sperm

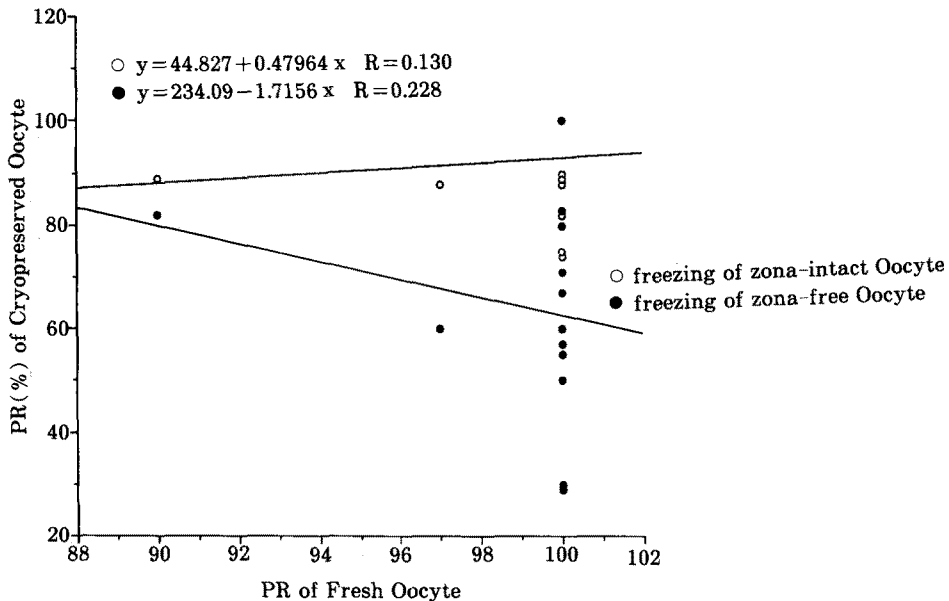
	Fresh		Zona intact <sup>a</sup>		Zona free <sup>b</sup>	
	PR <sup>c</sup>	PI <sup>d</sup>	PR	PI	PR	PI
S- 1	100	2.0	91	1.7	0	0.0
S- 2	100	2.2	88	1.6	29	0.4
S- 3	90	1.7	75	1.3	29	0.6
S- 4	80	2.3	50	1.8	10	0.2
S- 5	80	2.3	50	1.8	10	0.2
S- 6	83	1.2	47	0.6	20	0.3
S- 7	50	1.9	38	1.8	17	0.3
S- 8	30	1.2	25	1.1	13	0.3
S- 9	65	2.0	50	0.9	10	0.1
S-10	65	2.0	50	0.9	10	0.1
S-11	80	1.8	71	1.1	30	0.5
S-12	90	2.1	88	1.3	40	0.8
Mean±SEM	74.8±21.8	1.8±0.4	62.3±23.8	1.3±0.4	21.8±12.8	0.4±0.2

<sup>a</sup> Freezing of zona-intact hamster ova, <sup>b</sup> Freezing of zona-free hamster ova, <sup>c</sup> PR; penetration rate, <sup>d</sup> PI; penetration index

**Table 3.** Sperm penetration assay of infertile patient sperm

	Fresh		Zona intact <sup>a</sup>		Zona free <sup>b</sup>	
	PR <sup>c</sup>	PI <sup>d</sup>	PR	PI	PR	PI
I- 1	0	0.0	0	0.0	0	0.0
I- 2	0	0.0	0	0.0	0	0.0
I- 3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
I- 4	0	0.0	0	0.0	0	0.0
I- 5	0	0.0	0	0.0	0	0.0
I- 6	0	0.0	0	0.0	0	0.0
I- 7	0	0.0	0	0.0	0	0.0
I- 8	0	0.0	0	0.0	0	0.0
I- 9	27	0.3	0	0.0	0	0.0
I-10	10	0.1	0	0.0	0	0.0
I-11	47	0.6	14	0.3	0	0.0
I-12	27	0.4	0	0.0	0	0.0
I-13	20	0.3	0	0.0	0	0.0
I-14	33	0.5	0	0.0	0	0.0
I-15	17	0.3	0	0.0	0	0.0
Mean±SEM	12.1±15.5	0.2±0.2	3.1±5.1	0.0±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0

<sup>a</sup> Freezing of zona-intact hamster ova, <sup>b</sup> Freezing of zona-free hamster ova, <sup>c</sup> PR; penetration rate, <sup>d</sup> PI; penetration index



**Fig. 1.** Correlation between penetration rates (PR) of cryopreserved hamster oocyte and PR of fresh hamster oocyte by SPA in fertile donors.

동결시 투명대가 존재한 상태의 난자가 투명대가 제거된 난자에 비해 침투율이 높았고, 정자 침투지수는 각각 0.2, 0.0, 0.0이었다. 그림 5는 불임군에서 ZI 또는 ZF 난자에서의 침투율과

FO의 침투율간의 상관관계를 나타낸 것인데 FO와 ZI간에 상관계수  $r=0.624$  ( $p<0.05$ )로 유의한 상관관계를 보였으나, FO와 ZF간에는 유의한 상관관계가 없었다. 그림 6은 불임군에

서 ZI 또는 ZF 난자에서의 침투지수와 FO의 침투지수간의 상관관계를 보였으나, FO와 ZF 간에는 유의한 상관관계가 없었다.

대체로 신선 햄스터 난자와 동결-융해 햄스터 난자 사이에 침투율보다는 침투지수에 있어서 매우 밀접한 관계를 보였으며, 동결-융해 햄스터 난자간에서는 동결시 투명대 존재 난자

(ZI)가 투명대 제거 난자(ZF)에 비해 침투율과 침투지수 모두가 신선난자와 보다 더 밀접한 관계를 보였다.

## 고 찰

SPA 시행시엔 항상 미리 짜여진 실험시간

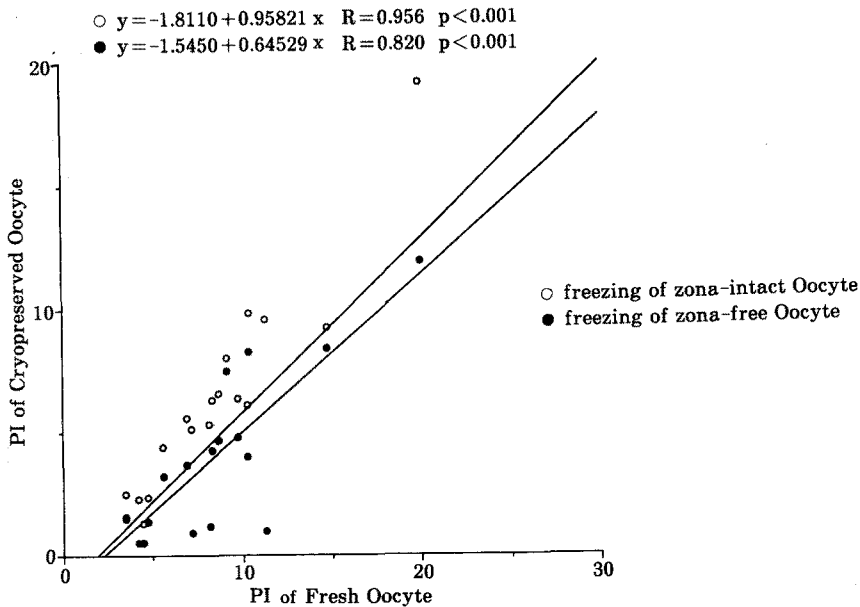


Fig. 2. Correlation between penetration indexes (PI) of cryopreserved hamster oocyte and PI of fresh hamster oocyte by SPA in fertile donors.

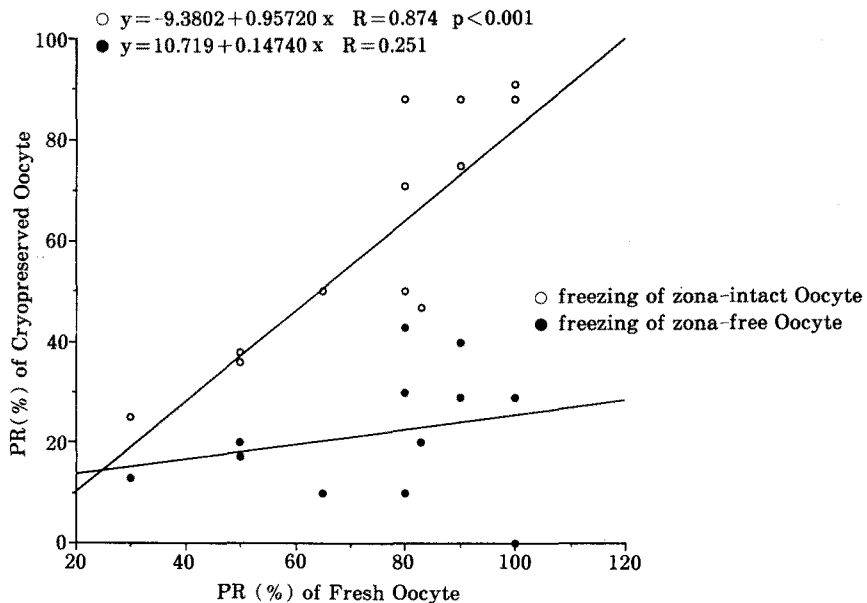


Fig. 3. Correlation between penetration rates (PR) of cryopreserved hamster oocyte and PR of fresh hamster oocyte by SPA in subfertile patients.

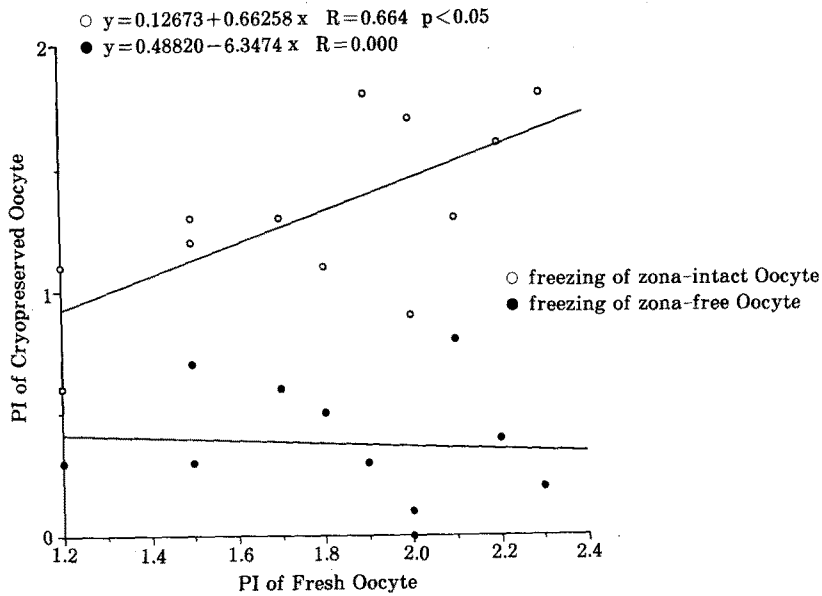


Fig. 4. Correlation between penetration indexes (PI) of cryopreserved hamster oocyte and PI of fresh hamster oocyte by SPA in subfertile patients.

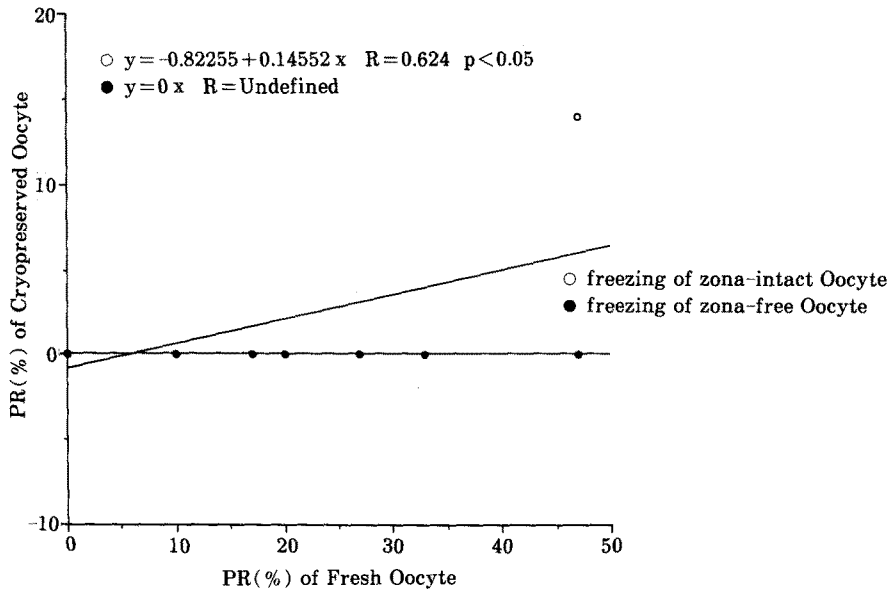


Fig. 5. Correlation between penetration rates (PR) of cryopreserved hamster oocyte and PR of fresh hamster oocyte by SPA in infertile patients.

표에 따라 매맞춰 햄스터의 과배란 유도, 난자 채취 및 정액채취 등을 실시해야 하므로 검사자나 피검사자 모두에게 많은 불편을 주고 있다. 특히 SPA 시행시 배란된 후 수 시간내의 신선 햄스터 난자를 사용하게 되므로 배란후 단시간 이내에 이를 이용하여야 하며 또한 햄

스터 개체별로 과배란 유도에 따른 난소반응 및 배란율에 변이가 매우 심하다는 문제가 있다. 이러한 문제점들을 보완하고자 햄스터 난자가 피검사자의 정액을 동결보존하였다가 적당한 시간에 검사하는 방법이 대두되어 왔으며 햄스터를 사육-유지할 수 없는 병원이나 햄스

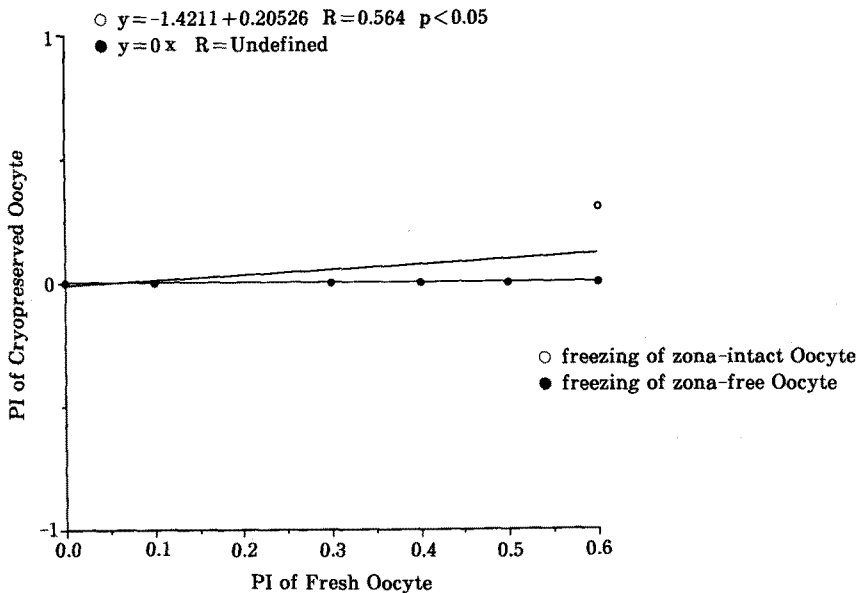


Fig. 6. Correlation between penetration indexes (PI) of cryopreserved hamster oocyte and PI and fresh hamster oocyte by SPA in infertile patients.

터를 구하기 어려운 나라(오스트레일리아)에서는 동결된 햄스터 난자의 효용성이 매우 클 수 있고 (Rogers, 1985), 신선 햄스터 난자를 이용할 수 없는 경우 동결 난자의 가치는 매우 클 수 있다. 1990년 본 저자들(장 등)이 SPA에 있어 인간냉동정자가 신선정자를 사용할 때의 제반 문제점을 줄일 수 있어 불임질환의 진단에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 시사하였다.

본 연구의 주목적은 위에서 언급한 SPA의 여러 문제점을 보완하여 SPA의 효용성을 증대시키기 위해서 햄스터 난자에 적합한 동결-융해 방법을 개발하고 이것을 임상적용하여 동결-융해한 햄스터 난자의 임상적 가치를 타진하는데 있었다.

1976년 Tsunoda등이 햄스터 난자의 동결보존에 성공한 이래 Parkening과 Chang (1977)이  $-75^{\circ}\text{C}$ 에서 투명대가 존재하는 햄스터 난자를, 또한 Fleming등(1979)이 투명대를 제거한 햄스터 난자를  $-50^{\circ}\text{C}$ 까지 온도를 하강시킨 후  $-196^{\circ}\text{C}$ 에서 보존한 후 이를 융해시켜 비교적 높은 수정율을 보고하였고, Quinn등(1982)이 동결보존된 햄스터난자를 SPA에 도입하여 남성의 생식력을 평가한 바 있다. 그러나 생식세포, 특히 난자의 동결은 융해 후 생존율이 아직까지 비교적 낮아 인간의 체외수정에서도 난자채취시 얻어지는 잉여난자를 보관시킬 때 난

자(oocyte)가 아닌, 배아(embryo) 상태로 동결보존해 온 실정이었다. 또한 햄스터 난자의 경우에도 신선 햄스터 난자에 비해 동결-융해 후 정자침투정도가 매우 낮은 것으로 보고되어 왔으며, 이러한 문제점으로 인해 햄스터 난자의 동결보존은 아직 SPA과정에서 널리 응용되지 못하였다. 그러나 최근 들어와 냉동생물학 및 냉동보존기술의 발달로 인해 생식세포의 동결-융해 후 생존율이 많이 향상되어 냉동-융해한 햄스터 난자에서 높은 생존율 및 양호한 정자침투 성적을 보고하여 동결보존된 햄스터 난자의 임상적 유용성과 SPA 시행의 간편화에 대해 강조되고 있다 (Leibo et al., 1990).

일반적으로 SPA는 냉동 햄스터 난자보다는 신선 난자를 이용하여 시행되어왔는데 이는 냉동난자의 경우 융해 후 생존율이 저하되며, 정자의 침투정도가 감소된다는 보고에 근거하고 있다. 그러나 냉동 햄스터 난자에 대한 정자침투의 감소 정도에 있어서는 보고자마다 차이가 있고, 최근에는 신선 난자와 동결-융해 난자사이에 SPA 결과, 즉 정자 침투정도에 있어서 차이가 없다는 연구결과가 보고되고 있다 (Leibo et al., 1990). 이미 여러 보고자들이 SPA시행을 위한 햄스터 난자 동결보존의 임상적 유용성에 관한 가능성을 제시한 바 있으나 폭 넓게 임상 연구에 적용한 보고는 아직 없다. Critser 등(1986)은 초자화(vitrification) 방법으로 햄



스터 난자를 동결하여 융해한 후 생존율은 유의적으로 감소하였으나, 정자 침투율에 있어서는 유의한 감소가 없었다고 보고 하였고, Sachs등(1989)은 1, 2-propanediol-sucrose를 이용하여 동결-융해 후 생존율과 정자침투정도가 신선 난자와 별차이가 없음을 보고하였으며, Leibo등(1990)도 위의 두 연구자와 같은 결과를 보고하였다. 본 저자들(정등, 1992)에 의해 개발된 햄스터 난자 동결-융해법(1단계 탈수화 및 2단계 융해법)의 동결-융해 후 생존율은 투명대가 존재하는 경우 95.4%, 투명대를 제거한 경우 67.6%이었는데, 이 결과는 다른 보고자들에 비해 다소 높은 결과였다. 투명대 존재시 본 저자들에 의해 개발된 햄스터 난자의 동결-융해 방법에 의거하여 얻어진 난자를 이용한 SPA를 분석하여 보면, 가임군, 준가임군 및 불임군의 정자에 의한 침투정도가 침투지수에 있어서 신선 햄스터 난자의 결과와 밀접한 상관관계를 보였으며 이러한 방법으로 얻어진 햄스터 난자는 임상적으로 큰 가치를 가진다고 사료된다. 그러나 투명대가 제거된 상태로 동결한 햄스터 난자는 동결시 투명대가 존재한 난자에 비해 융해 후 생존율 및 침투정도가 감소된 양상을 보였는데 이는 투명대의 존재 여부가 동결-융해 후의 난자의 생존성 및 정자 침투정도에 큰 영향을 주는 것으로 사료된다. 대부분의 연구자들은 햄스터 난자의 동결시 투명대가 존재하는 상태에서 시행하고 있는데 그 원인은 투명대를 제거한 상태에서 동결-융해시 생존율이 16-46%로 낮기 때문이다(Quinn et al., 1982). 그러나 SPA 시행시에는 투명대가 제거된 상태에서만 시행할 수 있으므로 동결시 투명대를 제거한 상태에서 시행하는 것이 좀더 바람직할 것이다.

투명대 존재 난자의 동결 및 융해 방법은 융해 후 생존율이 높고, 정자의 침투정도가 신선 난자와 비교할 때 감소되기는 하나 침투지수에 있어서 가임군, 준가임군 및 불임군 모두 유의한 상관관계가 있으므로 SPA를 위한 햄스터 난자의 동결 및 융해에 적절한 방법으로 사료된다. 또한 동결 보존된 햄스터 난자를 이용하여 SPA의 정상 가임역(fertile range)과 불임역(infertile range)을 잘 설정한다면 동결보존된 햄스터 난자는 임상적으로 매우 높은 효용성을 가질 수 있다. 그러나 투명대 제거 난자의 동결 방법은 융해 후 생존율이 낮고, 정자의 침투지수가 낮게 나타나는 준가임군과 불임

군에 있어서는 상관관계가 전혀 존재하지 않았다. 이는 투명대를 제거한 후 동결-융해하는 방법에는 아직 보완하여야 문제점이 많음을 인지할 수 있었다. 그러나 정자의 침투지수가 높은 가임군에서는 투명대를 제거한 후 동결-융해한 햄스터 난자의 침투지수가 신선난자의 침투지수와 비교할 때 매우 유의한 상관관계가 존재하였으므로 남성이 정상일 경우에만 그 효용성을 인정할 수 있었다.

## 결 론

18명의 수정능력이 입증된 정액공여자(가임군), 12명의 준가임환자 및 15명의 남성불임환자의 정자를 신선 햄스터 난자(이하 FO로 약칭 함), 투명대가 존재한 상태로 동결한 햄스터 난자(이하 ZI로 약칭 함) 및 투명대가 제거된 상태로 동결된 햄스터 난자(이하 ZF로 약칭 함)에 수정시켰다. 각각의 정자를 FO, ZI 및 ZF 난자에 동시에 수정시킨 후 그 결과를 비교하여 냉동보존된 햄스터 난자의 임상적 유용성을 타진해 보았다.

1. 가임군에서 FO, ZI 및 ZF 난자에서의 정자 침투율은 각각 99.3, 92.4, 63.7%로 신선난자의 침투율이 가장 높았으며, 정자 침투지수도 각각 8.4, 6.2, 3.9로 침투율과 같은 양상을 보였다. 침투율에 있어서 FO와 ZI간( $p < 0.001$ )에, FO와 ZF간( $p < 0.001$ )에 매우 유의한 상관관계가 있었다.

2. 준가임군에서 FO, ZI 및 ZF 난자에서의 정자 침투율은 각각 74.8, 62.3, 21.8%로 신선난자의 침투율이 가장 높았으며, 정자 침투지수도 각각 1.8, 1.3, 0.4로 침투율과 같은 양상을 보였다. 침투율에 있어서는 FO와 ZI간에 매우 유의한 상관관계를 보였으나( $p < 0.001$ ), FO와 ZF간에는 상관관계가 없었다. 침투지수에 있어서는 FO와 ZI간에 유의한 상관관계를 보였으나( $p < 0.05$ ), FO와 ZF간에는 상관관계가 없었다.

3. 불임군에서 FO, ZI 및 ZF 난자에서의 정자 침투율은 각각 12.1, 3.1, 0.0%로 신선난자의 침투율이 가장 높았으며, 정자 침투지수도 각각 0.2, 0.0, 0.0이었다. 침투율에 있어서 FO와 ZI간에 유의한 상관관계를 보였으나( $p < 0.05$ ) FO와 ZF간에는 상관관계가 없었다. 침투지수에서는 FO와 ZI간에 유의한 상관관계를 보였으나( $p < 0.05$ ), FO와 ZF간에는 상관관계가 없었다.

대체로 신선 햄스터 난자와 동결-융해 햄스터 난자 사이에 침투율보다는 침투지수가 더 밀접한 상관관계를 보였으며, 동결-융해 햄스터 난자간에서는 동결시 투명대 존재 난자(ZI)가 투명대 제거 난자(ZF)에 비해 침투율과 침투지수 모두가 신선난자와 보다 더 밀접한 관계를 보였다.

본 연구 결과 SPA에 있어 동결-융해 햄스터 난자가 신선 햄스터 난자를 이용할 때의 제반 문제점을 줄일 수 있어 남성불임진단에 매우 유용하게 사용될 수 있다고 사료된다.

## 인용문헌

- Chang YS, Lee JY, Moon SY, Kim JG, Pang MG, Shin CJ : Factors affecting penetration of zona-free hamster ova. *Arch of 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 : 생존성과 수정능력을 향상시키는 1-단계 평형과 2-단계 융해의 효과. *대한불임학회지* 1992, 19, 143.
- Critser JK, Arneson BW, Aaker DV, GD : Cryopreservation of hamster oocytes : Effect of vitrification or freezing on human sperm penetration of zone-free hamster oocytes. *Fertil Steril* 1986, 46, 277.
- Fleming AD, Yanagimachi R, Yanagimachi H : Fertilizability of cryopreserved zona-free hamster ova. *Gamete Res* 1979, 2, 357.
- 김석현, 방명걸, 신창재, 김정구, 문신용, 이진용, 장윤석 : 한국인 남성을 대상으로 한 햄스터 난자 침투 분석법의 정상 가임역 설정. *대한불임학회지* 1991, 18, 63.
- Leibo SP, Giamberti TA, Meyer TK, Bastias MC, Rogers BJ : The efficacy of cryopreserved hamster ova in the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 1990, 53, 906.
- Parkening TA, Chang MC : Effects of cooling rates and maturity of the animal on the recovery and fertilization of frozen-thawed rodent eggs. *Biol Reprod* 1977, 17, 527.
- Quinn P, Barros C, Whittingham DG : Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1982, 66, 161.
- Rogers BJ : The sperm penetration assay : Its usefulness reevaluated. *Fertil Steril* 1985, 43, 821.
- Sachs HH, Pink MJ, Gwatkin RBL : Hamster oocyte penetration tests with oocytes frozen in propanediol : Comparison with non-frozen oocytes. *Gamete Res* 1989, 24, 31.
- 신창재, 장윤석 : 인간정자의 수정능부여 및 햄스터난자 침투에 영향을 주는 인자들에 관한 연구. *대한산부회지* 1990, 33, 954.
- Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Frydman R : High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 1986, 46, 268.
- Tsunoda Y, Parkening TA, Chang MC : In vitro fertilization of mouse and hamster eggs after freezing and thawing. *Experientia* 1976, 32, 223.
- Whittingham DG, Wood M, Farrant T, Lee H, Halsey JA : Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from  $-196^{\circ}\text{C}$ . *J Reprod Fert* 1979, 56, 111.
- 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.