

인간정자에 있어서 정자처리법의 비교

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

방명걸 · 정구민 · 신창재 · 김정구 · 문신용 · 장윤석 · 이진용

중앙대학교 의과대학 산부인과학교실

이 상 훈*

중앙대학교 산업대학 축산학과

정 영 채** · 김 창 근**

Comparison among the Sperm Preparation Methods on the Human Spermatozoa

Myung-Geol Pang, Ku Min Chung, 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

Sang Hoon Lee*

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Chung-Ang University

Yung Chai Chung** and Chang Keun Kim**

Department of Animal Science, Chung-Ang University

= Abstract =

Procedures to separate motile, normal & motile and acrosome-reacted sperm with high efficiency have clinical application in Assisted Reproductive Technology in terms of increasing the probability of fertilization by a normal sperm and subsequent normal embryonic development. This study evaluated the effects of 10 sperm preparation techniques [Swim-up from a washed pellet (SU), Swim-up from semen (SO), Continuous Percoll Gradients I (PIC), Discontinuous Percoll Gradients I (PID), Continuous Percoll Gradients II (P IIC), Discontinuous Percoll Gradients II (P IID), SpermPrep (SFC), Wang's tube (WT), Albumin Gradients (AG), Low temperature capacitation (LTC)] on motility (%), normal morphology (%), motile sperm recovery rate (%), morphologically normal & motile sperm recovery rate (%), true acrosome reaction (%) and fertilizing ability.

A P IID proved to be an effective means of separating morphologically normal & motile sperm. Our results indicated the P IID has advantages as compared with other methods in terms of recovery rate, enhancement of motility and normal morphology. And a LTC seems to be an effective means of enhancing the true acrosome reaction and fertilizing ability. These results suggest that the combined method of LTC and P IID for separation of morphologically normal & motile sperm and acrosome reacted sperm may be a useful procedure for intrauterine insemination and in vitro fertilization in the management of male factor infertility as well as for isolation of subpopulation of sperm for basic research.

*본 연구는 1989년도 서울대학교 병원 임상연구비의 보조로 이루어진 것임.

서 론

정액으로 부터 정장성분을 제거하고 운동성 정자를 분리하는 것이 Assisted Reproductive Technology (ART)의 중요단계이다. 그 이유는 정장성분이 수정에 유해한 영향을 끼치기 때문이며 (Kanwar et al., 1979; Reddy et al., 1979), 죽은 정자, 백혈구 및 정액내 정자이외의 세포 존재는 수정의 빈도를 감소시키기 때문이다 (Reddy et al., 1979; Berger et al., 1982). 또한 배양액 및 기타 첨가제가 정자의 수정능 획득 및 침체반응을 야기시키는 것으로 보고되고 있다 (Rogers, 1978). 따라서 ART를 위한 정액은 액화가 되자마자 가능한 빨리 처리를 하여야 한다.

인간에서 운동성정자를 회수하는 방법들이 개발되어 왔다. 크게 회석 및 세척법 (Aitken & Clarkson, 1988), migration법, 선택적 세척법, adherence법 및 정자의 수정능을 향진시키는 augmentation법 등으로 구분할 수 있다 (Mortimer, 1990). Migration법으로는 정액으로 부터 직접 swim-up시키는 방법 (Harris et al., 1981), 세척된 정자괴 (sperm pellet)에서 swim-up시키는 방법 (McDowell et al., 1985; Andolz et al., 1987) 및 albumin gradients 방법 (Ericsson et al., 1973; Perrone & Testart, 1985)이 ART를 위한 정자처리에 주로 이용되고 있으며, 선택적 세척법으로는 Percoll이 주로 이용되는데 continuous법 (Bolton & Braude, 1984; Oshio et al., 1987), discontinuous법 (Pousette et al., 1986; Berger et al., 1985; Lessley & Garner, 1983; Hyne et al., 1986) 및 mini-Percoll법 (Ord et al., 1990)으로 구분된다. Adherence법으로는 glass-wool column filtration법 (Van der Ven et al., 1988)과 glass beads법 (Daya et al., 1987)이 있으며, augmentation법으로는 TEST-yolk buffer를 이용하는 저온수정능 획득 방법 (Katayama et al., 1989; 방 등, 1992), 인간의 난포액 (Tesarik, 1985; McClure et al., 1990), progesterone (Oehninger et al., 1992) 및 Ionophore A23187 (Tesarik, 1985)을 이용하는 방법 등이 보고되고 있다. 또한 정액처리를 간편화하기 위하여 1회용으로 swim-up방법을 변형시켜 개발된 Wang's tube (Wang et al., 1988; 1991)와 polysaccharide bead column을 이용하는 SpermPrep (Ohashi et al., 1992) 등이 있다.

남성불임증 환자의 정자는 수, 운동성(%), 침체반응 및 수정능력이 정상인 정자에 비해 크게 떨어지므로 ART시술시 운동성 정자의 회수율을 높이고, 침체반응율을 높혀 수정의 빈도를 증진시키는 정자처리법을 개발하는 것이 가장 시급한 상황이다.

본 저자들은 위에 언급된 정자처리법중 정액으로 부터 직접 swim-up시키는 방법, 세척된 정자괴에서 swim-up시키는 방법, albumin gradients 방법, continuous Percoll gradient 방법, discontinuous Percoll gradient 방법, 저온 수정능 획득방법, Wang's tube 방법 및 SpermPrep 방법을 이용하여 처리 후 운동성 정자의 회수율, 형태가 정상이면서 운동성을 가지는 정자의 회수율, 침체반응 및 수정에 각각의 정자처리법이 어떠한 영향을 끼치는가를 연구하여 남성불임환자 정액 처리시 필요한 기초정보를 얻고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구에서는 최근 2년 이내에 여성에게 임신을 시킨 경험이 있는, 생식력이 입증된 10명의 가임남성을 대상으로 하여 1회 사정된 정액을 동일한 양으로 양분하여 2가지 정자처리법을 각각 5회, 총 10가지 정자처리법에 이용하였다. 10명의 정액중 한 정액이라도 이상이 발생했을 경우 실험에 이용하지 않았다.

2. 정자처리

1) 세척된 정자괴 (sperm pellet)에서 swim-up시키는 방법 (SU로 약칭함)

액화된 정액을 15ml cornical tube 밑부분에 넣고, 그 위에 2ml의 Ham's F-10 (+0.3% human serum albumin, HSA로 약칭 함)을 넣어 잘 섞은 후, 원심분리 (300 G, 10 min)를 하였다. 상층액을 조심스럽게 제거한 후 정자괴를 잘 풀고, 그 위에 2ml의 Ham's F-10을 넣어 잘 섞은 후 위의 원심분리와 동일한 방법으로 2차 세척하였다. 상층액을 조심스럽게 제거한 후 tube의 끝 부분을 손가락으로 툭툭 쳐서 정자괴를 잘 푼 후 정자의 수와 정자괴의 양을 고려하여 0.2-1.0ml의 Ham's F-10 (+0.3% HSA)을 조심스럽게 올려 놓은 후 2시간 swim-up시켜 이용하였다.

2) 정액으로 부터 직접 swim-up시키는 방법

(SO로 약칭함)

액화된 정액 0.5ml을 15ml cornical tube 밑부분에 넣고, 그 위에 2ml의 Ham's F-10 (+0.3% HSA)을 정액과 섞이지 않게 서서히 넣어 층을 형성한 후 37°C의 water bath에서 90분간 배양하였다. 배양 후 상층액을 조심스럽게 떠내어 한 tube에 모은 후 원심분리(300 G, 10 min)하여 적절히 정자의 수를 농축 혹은 희석하여 이용하였다.

3) Percoll Gradients 방법 I

(1) Continuous Percoll Gradients 방법 I(이하 PIC로 약칭함)

0.1M HEPES-Buffered 1.5M NaCl과 Percoll(Pharmacia, Sweden)을 1:9 (v/v)로 혼합하여 등장의 Percoll용액을 제조하였다. 이 Percoll용액에 HSA를 1.0% (w/v) 첨가한 후 10mM HEPES-buffered Hank's solution을 혼합하여 80%의 Percoll을 제조하였다. 이 80% Percoll 6ml을 15ml의 cornical tube에 넣은 후 가장 윗부분에 액화된 정액을 살며시 올려 놓은 뒤 300 G로 30분간 원심분리한 다음 상층액을 제거하고 0.3ml Percoll용액과 정자과만을 남긴 후 잘 섞어 실험에 이용하였다.

(2) Discontinuous Percoll Gradients방법 I(이하 PID로 약칭함)

0.1M HEPES-Buffered 1.5M NaCl과 Percoll(Pharmacia, Sweden)을 1:9 (v/v)로 혼합하여 등장의 Percoll용액을 제조하였다. 이 Percoll용액에 HSA를 1.0% (w/v) 첨가한 후 10mM HEPES-buffered Hank's solution을 혼합하여 50, 60, 70, 80, 90%의 농도별 Percoll을 제조하였다. 각 농도의 Percoll용액을 15ml의 cornical tube에 밑바닥부터 100에서 50%까지 1ml씩 섞이지 않게 층을 형성시켰다. Percoll층의 가장 윗부분(50%)에 1ml의 액화된 정액을 살며시 올려 놓은 뒤 300 G로 30분간 원심분리한 후 90%까지의 상층액을 제거하고 0.3ml의 100% Percoll용액과 정자과만을 남긴 후 잘 섞어 실험에 이용하였다.

4) Percoll Gradients방법 II

(1) Continuous Percoll Gradients방법 II(이하 PII로 약칭함)

10배로 농축된 Ham's F-10과 Percoll용액을 1:9 (v/v)로 혼합하여 등장의 Percoll용액을 제조하였다. 이 Percoll용액에 HSA를 1.0% (w/v) 첨가한 후 1배의 Ham's F-10을 혼합하여 80%의 Percoll을 제조하였다. 이 80% Percoll 6ml

을 15ml의 cornical tube에 넣은 후 가장 윗부분에 액화된 정액을 살며시 올려 놓은 뒤 300 G로 30분간 원심분리한 상층액을 제거하고 0.3ml Percoll용액과 정자과만을 남긴 후 잘 섞어 실험에 이용하였다.

(2) Discontinuous Percoll Gradients방법 II(이하 PII로 약칭함)

10배로 농축된 Ham's F-10과 Percoll용액을 1:9 (v/v)로 혼합하여 등장의 Percoll용액을 제조하였다. 이 Percoll용액에 HSA를 1.0% (w/v) 첨가한 후 1배의 Ham's F-10을 혼합하여 50, 60, 70, 80, 90%의 농도별 Percoll을 제조하였다. 각 농도의 Percoll용액을 15ml의 cornical tube에 밑바닥부터 100에서 50%까지 1ml씩 섞이지 않게 층을 형성시켰다. Percoll층의 가장 윗부분(50%)에 1ml의 액화된 정액을 살며시 올려 놓은 뒤 300 G로 30분간 원심분리한 후 90%까지의 상층액을 제거하고 0.3ml의 100% Percoll용액과 정자과만을 남긴 후 잘 섞어 실험에 이용하였다.

5) Sperm Filtration Column방법(이하 SFC로 약칭함)

1회용 polysaccharide bead column인 Sperm-Prep(Fertility Technologies, USA)을 이용하였다. 액화된 정액을 15ml cornical tube 밑부분에 넣고, 그 위에 2ml의 Ham's F-10 (+0.3% HSA)을 넣어 잘 섞은 후, 원심분리(300 G, 10 min)를 하였다. 상층액을 조심스럽게 제거한 후 정자과를 잘 풀고, 정자과를 Ham's F-10으로 희석하여 전체양이 1ml이 되도록 하였다. 원심분리하는 도중에 SpermPrep을 15ml tube에 올려놓고 4ml의 Ham's F-10을 polysaccharide bead column내로 통과시켜 가수화를 시켰고, 이 column을 다른 tube에 옮긴 후 원심분리된 1ml을 column내로 옮겨 여과시킨 후 여과된 정자를 실험에 이용하였다.

6) Wang's tube방법(이하 WT로 약칭함)

Wang's tube(Fertec Co., Taiwan)의 기본형인 WT-S1에 Ham's F-10 (+0.3% HSA)을 채운 후 37°C CO₂ 배양기에서 정치하여 tube와 Ham's F-10의 온도를 37°C로 유지시켰다. 액화된 정액을 15ml cornical tube 밑부분에 넣고, 그 위에 2ml의 Ham's F-10 (+0.3% HSA)을 넣어 잘 섞은 후, 원심분리(300 G, 10 min)를 하였다. 상층액을 제거하고, 정자과를 Wang's tube에 넣은 후 37°C CO₂ 배양기에서 2시간 정치한 후 swim-up된 정자를 회수하여 이용하였다.

7) Albumin Gradients방법 (이하 AG로 약칭함)

정액을 30분간 액화시킨 후 Ham's F-10으로 용량비 1:1로 혼합하고 용량을 측정하였다. 이 용량에 대하여 2배의 7.5% albumin gradient (20% solution of liquid human serum albumin, salt poor, 녹십자)를 제조하였다. 15ml cornical tube 밑에 1ml의 7.5% albumin gradient를 넣고 그 위에 0.5ml의 희석된 정액을 조심스럽게 올려놓은 후 37°C의 water bath에서 1시간 배양하였다. 배양 후 희석된 정액을 조심스럽게 제거하고 7.5% albumin gradient를 모은 후 300 G에서 10분간 원심분리하였다. Albumin gradient와 정자괴 1ml을 남기고 상층액을 버렸다. 15ml cornical tube 밑에서부터 차례로 0.5ml 20% albumin과 1ml 12.5% albumin를 조심스럽게 넣어 층을 형성하고 그 위에 원심분리된 1ml의 용액을 잘 섞어 조심스럽게 올려놓은 후 37°C의 water bath에서 1시간 배양하였다. 배양 후 상층액을 조심스럽게 제거하고 20% albumin gradient만 남겼다. 남은 용액을 모은 후 300 G에서 10분간 원심분리하여 적절히 정자의 수를 농축 혹은 희석한 다음 실험에 이용하였다.

8) 저온수정능 획득방법(이하 LTC로 약칭함)

액화된 정액을 TEST-yolk buffer (이하 TYB라 함)와 1:1 (v/v)로 천천히 혼합하고 4°C까지 서서히 온도를 하강시킨 다음 4°C에서 48시간 동안 저온 배양한 후 TYB와 정장이 혼합된 상층액을 제거하고 그 위에 2ml의 Ham's F-10 (+0.3% HSA)을 넣어 잘 섞은 후, 원심분리 (300 G, 10 min)를 하였다. 상층액을 조심스럽게 제거한 후 정자괴를 잘 풀고, 그 위에 2ml의 Ham's F-10을 넣어 잘 섞은 후 위의 원심분리와 동일한 방법으로 2차 세척하였다. 상층액을 조심스럽게 제거한 후 tube의 끝 부분을 손가락으로 톡톡 쳐서 정자괴를 잘 푼 후 정자의 수와 정자괴의 양을 고려하여 0.2-1.0ml의 Ham's F-10 (+0.3% HSA)을 조심스럽게 올려놓은 후 2시간 swim-up시켜 이용하였다.

3. 정액분석

액화직후 및 정액처리후 정액분석을 시행하였다. 정자의 농도 및 운동성 (%)는 CTS-60/200 system (Motion Analysis Co., USA)을 이용하여 측정하였으며, 정상형태율 (%)은 Diff Quik (국제시약주식회사, 일본)으로 염색 후

WHO기준에 의거하여 분석하였다. 침체반응을 분석하기 위해 Didion 등 (1989)의 이중염색법을 이용하여 시행하였으며, 정자의 침체반응 판정은 살아있으면서 침체를 손실한 정자만을 실제 침체반응으로 판정하였다. 운동성 정자의 회수율과 형태적으로 정상이면서 운동성을 가지는 정자의 회수율은 아래의 공식에 근거하여 산출하였다.

Motile Sperm Recovery Rate (%)

$$= \frac{\text{Concentration}(i) \times \text{Volume}(i) \times \text{Motility}(i)}{\text{Concentration}(f) \times \text{Volume}(f) \times \text{Motility}(f)} \times 100$$

Normal, Motile Sperm Recovery Rate (%)

$$= \frac{\text{Concentration}(i) \times \text{Volume}(i) \times \text{Motility}(i) \times \text{Normal Morphology}(i)}{\text{Concentration}(f) \times \text{Volume}(f) \times \text{Motility}(f) \times \text{Normal Morphology}(f)} \times 100$$

i: 액화직후의 정액분석 결과

f: 정액처리후 정액분석결과

4. Sperm Penetration Assay (SPA)

위의 언급한 10가지 정자처리법에 의해 얻어진 정자를 신과 장 (1990)의 방법에 의하여 시행하였으며 이때 정자의 두부가 팽창되었거나 남성전핵이 보이며 해당정자의 미부가 햄스터 난자 세포질내에서 식별이 될 때 정자가 난자내로 침투된 것으로 간주하였다. 전 예에서 정자의 난자침투 정도는 난자침투 지수 (침투된 총 정자수/수정시킨 총 난자수)로 나타냈다.

결 과

세척된 정자괴에서 swim-up시키는 방법 (SU), 정액으로부터 직접 swim-up시키는 방법 (SO), Percoll gradients방법 I [continuous Percoll gradients방법 I (PI)]; discontinuous Percoll gradients방법 I (PID)], Percoll gradients방법 II [continuous Percoll gradients방법 II (PII C); discontinuous Percoll gradients방법 II (PII D)], SpermPrep방법 (SFC), Wang's tube방법 (WT), albumin gradients방법 (AG), 저온수정능 획득방법 (LTC)의 처리 후 운동성 (%), 정상형태율 (%), 실제침체율 (%), 운동성 정자의 회수율 (%), 형태학적으로 정상이면서 운동성을 가

Table 1. Comparison among the sperm preparation methods on the human spermatozoa

Method	% Motility	% Normal Morphology	% True Acrosome Reaction	% Motile Sp. Recovered	% Normal & Motile Sp. Recovered	SPA
Fresh	63.0	58.2	5.3			
SU	77.8	78.4	15.1	21.6	16.9	1.8
SO	93.2	74.9	12.1	61.4	46.0	1.5
PIC	74.1	87.4	13.7	36.4	31.8	1.9
PID	88.2	82.9	14.2	40.6	33.7	2.0
P I I C	91.8	85.9	13.9	54.8	47.1	2.1
P I I D	95.2	87.9	14.7	69.1	60.7	2.3
SFC	71.9	87.0	9.8	55.9	48.6	1.2
WT	90.7	97.0	9.1	8.6	8.3	1.4
AG	96.8	90.4	16.0	29.6	26.8	2.1
LTC	77.2	92.2	24.2	26.7	24.6	10.8

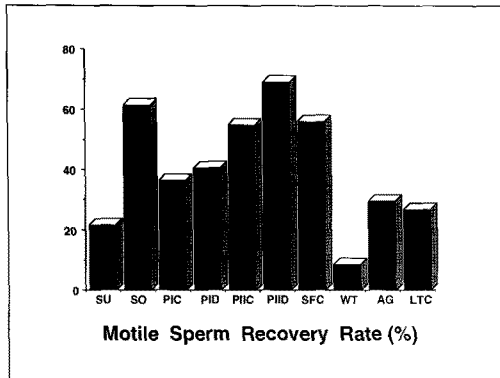


Fig. 1. Effect of different sperm preparation method on motile sperm recovery rate (%) (SU : Swim-up from a washed pellet, SO : Swim-up from semen, PIC : Continuous Percoll Gradients I, PID : Discontinuous Percoll Gradients I, P I I C : Continuous Percoll Gradients II, P I I D : Discontinuous Percoll Gradients II, SFC : SpermPrep, WT : Wang's tube, AG : Albumin Gradients, LTC : Low temperature capacitation).

지는 정자의 회수율 (%) 및 sperm penetration assay의 결과는 표 1, 그림 1, 2, 3 및 4와 같다. 처리 후 정자의 운동성 (%), 정상형태율 (%) 및 실제첨체반응율 (%)은 액화직후에 비해 10가지 처리법 모두 현저히 증가되었다. 운동성 정자의 회수율은 8.6%에서 69.1%범위였는데 P I I D가 가장 높았고 WT가 가장 낮았다. 형태학적으로 정상이면서 운동성을 가지는 정자의 회수율 (%)에서는 8.3%에서 60.7%의 범위였는데 운동성 정자의 회수율과 마찬가지로 P I I D가 가장 높았고 WT가 가장 낮았다. 처리

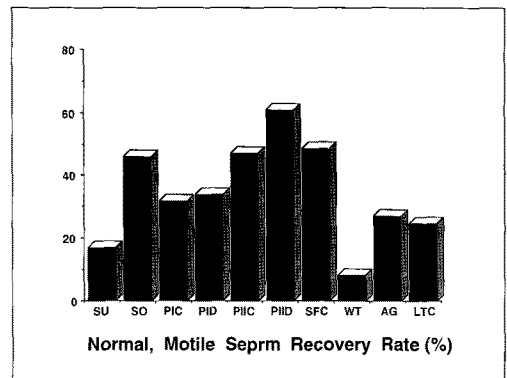


Fig. 2. Effect of different sperm preparation method on morphologically normal & motile sperm recovery rate (%) (SU : Swim-up from a washed pellet, SO : Swim-up from semen, PIC : Continuous Percoll Gradients I, PID : Discontinuous Percoll Gradients I, P I I C : Continuous Percoll Gradients II, P I I D : Discontinuous Percoll Gradients II, SFC : SpermPrep, WT : Wang's tube, AG : Albumin Gradients, LTC : Low temperature capacitation).

후 정자의 수정능력을 알아보기 위한 SPA결과에서는 각 처리법마다 큰 차이를 보이지는 않았으나, LTC방법에서는 현저히 높았다. 실제 첨체반응율의 결과도 SPA과 같이 LTC방법에서 현저히 높았다.

고찰

정자처리후의 운동성 정자의 낮은 회수율과 낮은 수정능력은 IVF시행시 낮은 수정을 및

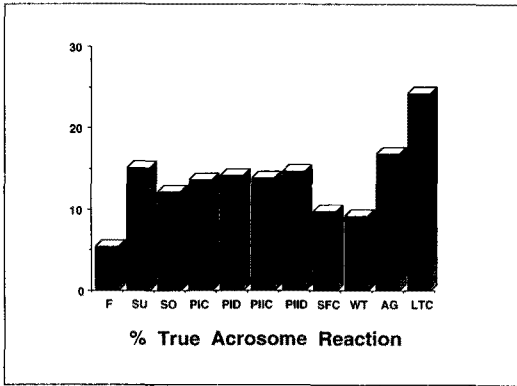


Fig. 3. Effect of different sperm preparation method on true acrosome reaction (%) (F: Fresh semen, SU: Swim-up from a washed pellet, SO: Swim-up from semen, PIC: Continuous Percoll Gradients I, PID: Discontinuous Percoll Gradients I, P I C: Continuous Percoll Gradients II, P I I D: Discontinuous Percoll Gradients II, SFC: SpermPrep, WT: Wang's tube, AG: Albumin Gradients, LTC: Low temperature capacitation).

낮은 임신율을 나타내게 한다. 즉 정자처리시 운동성 정자의 회수율과 정자의 수정능력을 높일 수 있다면 Assisted Reproductive Technology (ART)의 성공율은 더욱 증진될 것이다.

남성불임증 환자의 정자는 수, 운동성(%) 및 수정능력이 정상인 정자에 비해 크게 떨어지므로 ART시술시 운동성 정자의 회수율을 높이고, 첨체반응율을 높혀 수정의 빈도를 증진시키는 정자처리법을 개발하는 것이 가장 시급한 상황이다.

정자처리법 중 가장 흔히 이용되는 방법은 swim-up인데 이 방법은 처리후 운동성 정자의 회수율이 낮기때문에 정자희소증이나 정자 무력증 정자의 경우 그 효용성이 매우 낮다 (Ohashi et al., 1992). 비정상적인 정액조건을 보이는 환자의 정자처리시 많은 양의 운동성 정자를 얻을 수 있는 방법들이 개발되어 왔다. Berger 등(1985)은 운동성 정자의 회수율에 있어서 Percoll gradients 방법을 swim-up 및 albumin gradients 방법과 비교하였는데 swim-up 방법이 가장 낮았고, Percoll gradients 방법이 가장 높았다. Ohashi 등(1992)은 Percoll과 SpermPrep 처리후 운동성 정자의 회수율을 비교한 결과 SpermPrep이 Percoll에 비해 1.9배의 운동성 정자를 회수하였다고 보고하였다. 본 연구결과에서도 Ohashi 등(1992)과 동일한

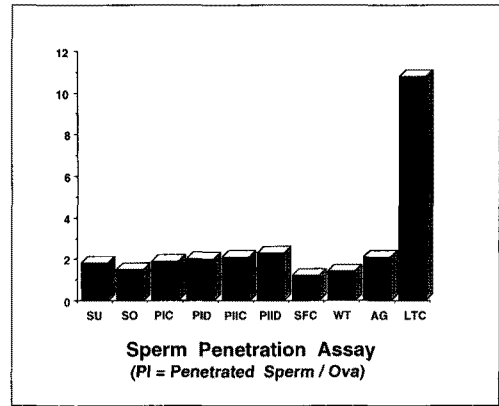


Fig. 4. Effect of different sperm preparation method on sperm penetration assay (SU: Swim-up from a washed pellet, SO: Swim-up from semen, PIC: Continuous Percoll Gradients I, PID: Discontinuous Percoll Gradients I, P I C: Continuous Percoll Gradients II, P I I D: Discontinuous Percoll Gradients II, SFC: SpermPrep, WT: Wang's tube, AG: Albumin Gradients, LTC: Low temperature capacitation).

경향을 보였으나 P I I D에서는 SpermPrep에 비해 더 좋은 회수율을 보였다. Percoll 방법에는 여러 방법이 보고되고 있는데, 일반적으로 continuous보다 discontinuous 방법이 운동성 정자의 회수율에 있어 높은 성적을 보고하고 있으며 (Iizuka et al., 1988), mini-Percoll과 discontinuous Percoll 방법에서는 동일한 성적을 보고하고 있다 (Ng et al., 1992). 또한 정자처리시 사용하는 buffer나 배양액의 조성이 정자처리 후의 정자의 운동성(%) 및 운동속도에 유의한 영향을 끼치므로 buffer 및 배양액의 선택이 중요한데 (Pousette et al., 1986) 본 연구 결과 Percoll 처리시 Hank's solution으로 희석한 PID와 PIC보다 Ham's F-10으로 희석한 P I I D와 P I C에서 운동성 정자의 회수율 및 정상 정자의 회수율이 높았다. 정자처리 후의 운동성(%) 및 정상형태율은 어느 방법에서나 액화직후 정액내 정자에 비해 유의하게 증진되었다. Le Lannou와 Blanchard (1988)는 Percoll이 swim-up 방법 보다 비정상적인 형태를 가지는 정자제거에 효과적이었다고 보고하였으며, 본 연구에서도 동일한 결과를 보였다. WT 방법은 운동성 정자의 회수율은 다른 방법에 비해 떨어지나 세균이나 정자이외의 세포로부터 운동성 정자만을 회수하는 방법으로는 그 효용성을 인정받고 있다 (Wang et al., 1988).

Morales 등(1991)은 Percoll gradient와 swim

-up 처리 후 침체반응 및 인간투명대에 결합하는 능력을 비교한 결과 Percoll 처리에서 높은 성적을 얻었으며, McClure 등(1989), Tanphachitr 등(1988) 및 Chan과 Tucker(1992)도 Percoll이 swim-up 방법에 비해 운동성 정자의 회수율 및 수정능력에 있어 높은 결과를 보고하고 있다. Katayama 등(1989)은 7명의 환자를 대상으로 swim-up 방법과 LTC 방법으로 처리된 정자를 이용한 체외수정 시술에서 2명의 환자에서는 동일한 수정율을, 5명의 환자에서는 LTC 방법에서 매우 높은 수정율을 얻었으며 이 5명의 환자중 3명은 swim-up 방법에서는 전혀 수정이 일어나지 않았으나 LTC 방법에서는 3명 모두 60% 이상의 수정율을 얻을 수 있었다고 보고하였다. 또한 방 등(1992)은 LTC 방법으로 처리된 정자가 swim-up 방법에 의해 처리된 정자에 비해 정상형태율, 과활성화 정자운동성(hyperactivation) 빈도, 실제침체율 및 SPA결과가 유의하게 높았으며, 인간 IVF에 응용시 LTC 방법이 유의하게 높은 수정율을 보임으로써 LTC 방법이 침체반응 유도 및 수정을 증진에 있어 훌륭한 방법임을 입증하였다.

정자처리후에 운동성, 운동성 정자의 회수율, 형태적으로 정상이면서 운동성을 가지는 정자의 회수율, 침체반응율 및 SPA를 시행하였는데, 그 이유는 이러한 척도(parameter)들이 체외수정율과 매우 밀접한 관계를 가지기 때문이다(Baker & Liu, 1989). 본 연구결과, 여러 연구자들의 보고와 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 정자운동성(%) 및 정상형태율(%)은 액화직후의 정자운동성 및 정상형태율에 비해 10가지 정자처리법 모두에서 증가하였는데 이는 각각의 정자처리법이 정도의 차이는 있으나 정액내 죽은 정자, 기형정자 및 정자이외의 다른세포로부터 형태가 정상이면서 운동성을 가지는 정자를 잘 분리해내는 방법임을 시사하는 것이다. 운동성 정자의 회수율(%) 및 형태가 정상이면서 운동성을 가지는 정자의 회수율에 있어서 PII D가 가장 높은 성적을 보였으며, WT가 가장 낮은 성적을 보였다. 이는 정액검사가 불량한 환자의 정자처리시 PII D가 가장 유리한 방법임을 시사하는 것이다. 그러나 PII D도 침체반응 및 수정능력에 있어서는 다른 방법에 비해 현저한 증진효과는 없었다. 정자의 수정능을 예견하는 실제침체율 및 SPA에서 LTC의 방법이 실제침체율에 있어 신선정자

의 약 5배의 침체반응을 보였으며, 다른 정자처리법에 비해 현저히 높은 실제침체율을 보였고, SPA에 있어서도 실제침체율과 같이 LTC 방법이 가장 좋은 성적을 보였다. 이는 정자의 기능, 즉 수정능력에 문제가 있는 환자의 정자처리시 LTC 방법이 가장 유리한 방법임을 시사하는 것이다. 본 연구결과 남성측 원인에 의한 불임부부에서 ART시행시 정자처리법으로 TYB를 이용하는 저온수정능 획득법과 discontinuous Percoll gradients 방법을 혼용함으로써 침체반응이 야기된 정자 및 형태학적으로 정상이면서 운동성을 가지는 정자의 회수율을 높여 수정율 및 임신율을 증진시킬 수 있을 것이며, 또한 정자를 이용한 기초실험시 매우 유용하게 이용될 것으로 사료된다.

결 론

수정능력이 입증된 10명의 정액 공여자로부터 정액을 채취하여 10가지 정자처리법 세척된 정자괴에서 swim-up시키는 방법(SU), 정액으로 부터 직접 swim-up시키는 방법(SO), Percoll gradients 법 I[continuous Percoll gradients 방법 I(PIC); discontinuous Percoll gradients 방법 I(PID)], Percoll gradients 방법 II[continuous Percoll gradients 방법 II(PIC); discontinuous Percoll gradients 방법 II(PID)], SpermPrep 방법(SFC), Wang's tube 방법(WT), albumin gradients 방법(AG), 저온수정능 획득방법(LTC)의 10가지 정자처리후 운동성(%), 정상형태율(%), 실제침체율(%), 운동성 정자의 회수율(%), 형태학적으로 정상이면서 운동성을 가지는 정자의 회수율(%) 및 수정율을 조사하여 남성불임증 환자 정자의 ART시행시 필요한 지식을 얻고자 본 연구를 시행하였다. 처리 후 정자의 운동성(%), 정상형태율(%) 및 실제침체반응율(%)은 액화직후에 비해 10가지 처리법 모두에서 현저히 증가되었다. 운동성 정자의 회수율은 8.6%에서 69.1%범위였는데 PII D가 가장 높았고 WT가 가장 낮았다. 형태학적으로 정상이면서 운동성을 가지는 정자의 회수율(%)에서는 8.3%에서 60.7%의 범위였는데 운동성 정자의 회수율과 마찬가지로 PII D가 가장 높았고 WT가 가장 낮았다. 처리 후 정자의 수정능력을 알아보기 위한 SPA결과에서는 각 처리법마다 큰 차이를 보이지는 않았으나, LTC방법에서는 현저히

높았다. 실제침체반응율의 결과도 SPA과 같이 LTC방법에서 현저히 높았다.

인 용 문 헌

- Andolz P, Bielsa MA, Genesca A, Benet J, Egozcue J: Improvement of sperm quality in abnormal semen samples using a modified swim-up procedure. *Hum Reprod* 1987, 2, 99.
- Aitken RJ, Clarkson JS: Significance of reactive oxygen species and autooxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 1988, 9, 367.
- Baker HWG, Liu DY: New tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Reprod Fertil Dev* 1989, 1, 179.
- Berger RE, Karp LE, Williamson RA, Koehler J, Moor DE, Holmes LK: The relationship of pyrospermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as reflected in the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 1982, 37, 557.
- Berger T, Marrs RP, Moyer DL: Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertil Steril* 1985, 43, 268.
- Bolton VN, Braude PR: Preparation of human spermatozoa for in vitro fertilization by isopycnic centrifugation on self-generating density gradients. *Arch Androl* 1984, 13, 167.
- Chan SYW, Tucker MJ: Differential sperm performance as judged by the zona-free hamster egg penetration test relative to differing sperm penetration techniques. *Hum Reprod* 1992, 7, 255.
- Daya S, Gwatkin RBL, Bissessar H: Separation of motile human spermatozoa by means of a glass bead column. *Gamete Res* 1987, 17, 375.
- Didion BA, Dobrinsky JR, Giles JR, Graves CN: Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res* 1989, 22, 51.
- Ericsson RJ, Langevin CN, Nishino M: Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature* 1973, 246, 421.
- Harris SJ, Milligan MP, Masson GM, Dennis KJ: Improved separation of motile sperm and its application to artificial insemination. *Fertil Steril* 1981, 36, 219.
- Hyne RV, Stojanoff A, Clarke GN, Lopata A, Johnston WIH: Pregnancy from in vitro fertilization of human eggs after separation of motile sperm by density gradient centrifugation. *Fertil Steril* 1986, 45, 93.
- Iizuka R, Kaneko S, Kobanawa K, Kobayashi T: Washing and concentration of human semen by Percoll density gradients and its application to AIH. *Arch Androl* 1988, 20, 117.
- Kanwar KC, Yanagimachi R, Lopata A: Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 1979, 31, 321.
- Katayama KP, Stehlik E, Roesler M, Jeyendran RS, Holmgren WJ, Zaneveld LJD: Treatment of human spermatozoa with an egg yolk medium can enhance the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1989, 52, 1077.
- Le Lannou D, Blanchard Y: Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J Reprod Fertil* 1988, 84, 551.
- Lessley BA, Garner DL: Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in Percoll. *Gamete Res* 1983, 7, 49.
- McClure PD, Tom RA, Dandekar PV: Optimizing the sperm penetration assay with human follicular fluid. *Fertil Steril* 1990, 53, 546.
- McClure RD, Nunes L, Tom R: Semen manipulation: improved sperm recovery and function with a two-layer Percoll gradient. *Fertil Steril* 1989, 51, 874.
- McDowell JS, Veeck LL, Jones HW: Analysis of human spermatozoa before and after processing for in vitro fertilization. *J IVF ET* 1985, 2, 23.
- Morales P, Vantman D, Barros C, Vigil P: Human spermatozoa selected by Percoll gradi-

- ent or swim-up are equally capable of binding to the human zona pellucida and undergoing the acrosome reaction. *Hum Reprod* 1991, 6, 401.
- Mortimer D: Semen analysis and sperm washing techniques. In: Gagnon C (eds). Controls of sperm motility: Biological and clinical aspects. Florida: CRC Press, 1990, 263.
- Ng FIH, Liu DY, Baker HWG: Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Hum Reprod* 1992, 7, 261.
- Oehninger S, Sueldo C, Burkman LJ, Mahony M, Alexander NJ: Effect of progesterone on human sperm functions: Hyperactivated motility, acrosome reaction, zona pellucida binding and oocyte penetration. *Fertil Steril* 1992 (abstract), S181.
- Ohashi K, Saji F, Wakimoto A, Kato M, Tsutsui T, Tanizawa O: Preparation of oligozoospermic and/or asthenozoospermic semen for intrauterine insemination using the SpermPrep semen filtration column. *Fertil Steril* 1992, 57, 866.
- Ord T, Patrizio P, Mareello E, Balmaceda JP, Asch RH: Mini-Percoll: a new method of semen preparation for in-vitro fertilization in severe male factor infertility. *Hum Reprod* 1990, 5, 987.
- Oshio S, Kaneko S, Iizuka R, Mohri H: Effects of gradient centrifugation on human sperm. *Arch Androl* 1987, 17, 85.
- 방명걸, 김기철, 신창재, 문신용, 이진용, 장윤석: TEST-yolk buffer에 의한 인간정자의 수정능 증진효과에 관한 연구. 대한불임학회지 1992, 19, 57.
- Perrone D, Testart J: Use of bovine serum albumin column to improve sperm selection for human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1985, 44, 839.
- Poussette A, Akerlof E, Rosenborg L, Tredricsson B: Increase in progressive motility and improved morphology of human spermatozoa following their migration through Percoll gradients. *Int J Androl* 1986, 9, 1.
- Reddy JM, Stark RA, Zaneveld LJD: A higher molecular weight antifertility factor from human seminal plasma. *J Reprod Fertil* 1979, 57, 437.
- Rogers BJ: Mammalian sperm capacitation, fertilization in vitro: a critique of methodology. *Gamete Res* 1978, 1, 165.
- 신창재, 장윤석: 인간정자의 수정능 부여 및 햄스터 난자 침투에 영향을 주는 인자들에 관한 연구. 대한산부학회지 1990, 33, 954.
- Tanphaichitr N, Millette CF, Agulnick A, Fitzgerald LM: Egg penetration ability and structural properties of human sperm prepared by Percoll-gradient centrifugation. *Gamete Res* 1988, 20, 67.
- Tesarik J: Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J Reprod Fertil* 1985, 74, 383.
- Van der Ven HH, Jeyendran RS, Al-Hasani S, Tunnerhoff A, Hoebbel K, Diedrich K, Krebs D, Perez-Pelaez M: Glass wool column filtration of human semen: relation to swim-up procedure and outcome of IVF. *Hum Reprod* 1988, 3, 85.
- Wang FN, Peterson EM, Maza LM, Stone SC: Preparation of motile sperm free contaminating bacteria. *Am J Gyn Health* II 1988, 2, 61.
- Wang FN, Chou TS, Cheng CM, Merino G, Karow WG: Male sex preselection by using Wang tube and Y-medium. *ARTA* 1991, 2, 383.