

정자 수정능력 예측의 중요성

방 명 결

중앙대학교 산업과학대학 동물자원학과

I. 서 론

가축에서 수정능력은 중요한 경제형질 중 하나이다 (Gadea, 2005). 전통적인 정액검사는 정자 농도, 전진성 운동 비율, 생존 정자 비율, 형태 등을 측정한다. 이러한 방법들은 정자의 수정능력을 양적인 기준에서 측정하므로 수정능력 예측 능력이 정확하지 못하다 (Xu et al., 1998). 특히 인간에선 정액이 정상 소견을 보이거나 수정능이 낮은 형태인 위양성(false positive) 결과가 24%나 된다(Sigman et al., 1997). 즉 현재 전문가에 의하여 시행된 정액 검사를 이용하여 수정능력을 예견할 수 있는 정확성은 76% 이하이다. 본 고찰에서는 수정능력의 정의, 평가법, 정확한 평가법의 설정 등을 검토하겠다.

II. 정자의 수정능력

정자가 난자와 정상적인 수정을 하려면 먼저 수정부위까지 이동하여야 하며 난자-난구세포 복합체와 만나 난구세포와 투명대를 통과하고 이후 난황막내로 침입하여 활성화된 남성전핵을 형성하고 최종적으로 배아의 발달을 활성화시킬 수 있어야 한다. 즉 정자의 수정능력이란 첫째 양적개념(quantitative)으로 일반적으로 정액검사기준을 만족시키며, 둘째, 질적개념(qualitative)으로 정자의 수정능획득(capacitation) 및 첨체반응(acrosome reaction) 능력이 정상인 경우로 정의할 수 있다.

III. 수정능력의 평가

암컷의 생식기도에 사출된 정자는 정장으로부터 분리되어 경관점액을 통과·횡단하여 수정부위인 난관팽대부까지 긴 여행을 한다. 이후 정자가 난자내로 침입하기까지 일련의 생리과정을 겪는다. 수정능획득, 첨체반응, 정자-투명대 결합, 투명대 침입, 난황막 침입 및 남성전핵 형성 등이다. 이러한 일련의 수정과정 중 어느 한 과정에서 문제가 발생된다면 정상적인 수정은 이루어질 수 없다.

지금까지 개발된 정자의 질적 평가법은 이러한 일련의 수정과정 중 한 단계의 정자 수정과정을 평가하여 전반적인 수정능력을 예견하고자 시도되어 왔다. 이러한 시도 중 정자-난자의 상호작용을 직접 평가하는 방법들이 정자의 수정능력을 보다 잘 예견할 수 있다고 보고되고 있다. 현재 이용되고 있는 수정능력 예측방법으로 다음과 같은 방법들이 개발되었으며 가축보다도 인간에서 활발하게 적용되고 있다.

1) 수정능획득 및 침체반응의 접근

수정능획득이란 포유동물에 있어서 성숙의 최종단계이며 수정능력이 획득된 정자는 그 후 침체반응을 하여 난자와 수정하게 된다. 수정능획득은 정자 표면의 당단백의 변형을 초래하므로 이를 이용하여 수정능획득을 평가하는 sperm surface lectin labeling(Ahuja, 1985; Cross and Overstreet, 1987)과 수정능획득 과정과 연관된 chlortetracyclin fluorescence의 변화를 평가하는 방법(Lee et al., 1987)이 보고되고 있다. 또한 수정능획득과 연관된 정자의 운동성 변화를 이용하여 정자의 수정능력을 예측하고자 하는 연구가 진행되어 왔다. 이 변화는 hyperactivation으로 명명되었으며 매우 활력적이면서 전진성 운동은 감소하는 현상을 말한다. 이 운동성은 체외 혹은 체내에서 난자-난구세포 복합체 (oocyte-cumulus complexes)를 통과하는데 필수적이다. Computer Assisted Sperm Analyzer를 이용하여 hyperactivation을 측정하며 인간에선 Mortimer와 Mortimer(1990)가 hyperactivation의 기준을 설정하였다.

정자가 난자의 투명대를 통과하여 난자내로 침입하기 위해서는 수정능획득에 이어 형태적인 변화를 하여 침체효소를 방출하여야 하는데, 이를 침체반응이라 한다. 이 침체반응을 평가하기 위하여 triple-stain technique(Talbot and Chacon, 1981), fluorescent lectin labeling(Mortimer et al., 1987), acrosome reaction inducibility(Cummins et al., 1991; Calvo et al., 1994) 등이 소개되었다. 그 중 ionophore A23187 challenge(acrosome reaction following ionophore challenge, 이하 ARIC으로 약함)를 이용하는 방법이 정자의 수정능력을 비교적 잘 반영하는 것으로 보고되고 있다. ARIC 시행 후 정자를 관찰하면 우선 Hoechst 염색에 의해 죽은 정자(밝은 청색)와 염색이 안된 살아있는 정자로 구분된다. 이후 FITC-PSA 염색에 의한 침체 형태를 분석하게 된다. 이때 살아있으면서 침체의 염색이 적도대 부위만 염색된 정자만을 침체반응이 일어난 정자로 간주한다. Ionophore에 반응하는 침체반응율을 나타낼 수 있는 ARIC value는 Ionophore 처리군의 침체반응율에서 대조군의 침체반응율의 차이로서 산정한다. 이 방법은 침체반응을 야기할 수 있는 능력을 측정함으로써 수정능력을 예측하게 된다.

2) 정자-투명대 결합의 접근

침체반응이 야기된 정자는 난자의 투명대와 결합한 후 투명대를 통과하게 된다. 이 생리과정을 평가하기 위하여 hemizona assay(Burkman et al., 1988)와 competitive zona binding test(Liu et al., 1988)가 소개되었다. 다른 정자 수정능력평가법에 비해 위의 두 방법은 항상 대조군의 정자를 대조표준 정자(internal control)로 사용할 수 있어 정도관리 (quality control)의 시행이 가능하다는 장점이 있다. 두 방법 모두 체외수정시 수정율과 유의한 상관관계를 보이나(Liu and Baker, 1992) 후자의 방법이 고가의 micromanipulator가 필요 없고 간편하다.

3) 정자 난황막 침입의 접근

대부분 포유류의 경우 정자와 난자의 수정현상은 종특이성(species specificity)을 지니고 있다. 이 종특이성은 난자의 투명대에 의하여 조절되는데 Yanagimachi(1976) 등은 투명대를 제거한 햄스터 난자를 수정능력을 부여한 guinea pig 정자를 결합시키면 수정과정 중 종특이성이 소실되고 정자가 침투되어 활성화된다는 사실을 보고하였다. 이후 투명대를 제거한 햄스터 난자는 인간정자를 포함한 여러 포유류 정자에 침투될 수 있다는 사실이 연구되었다. 그 후 Rogers 등

(1979)이 정자의 생식력 유무에 따른 햄스터 난자의 침투율의 범위를 규명한 이래, 여러 연구가 거듭되어 정자의 수정능력 평가방법으로서 유용성이 재확인되었다. 그러나 위음성(false negative) 결과가 생길 수 있으며 시행방법이 까다롭다는 단점이 있다.

가축에선 동종의 난자를 처리된 정자로 체외수정을 시행한 후 수정능력을 평가하는 방법도 개발되었다. 돼지에선 신선 (Gadea et al., 1998) 및 동결정액 (Selles et al., 2003)을 이용한 연구에서 정자 침투율과 수태율 및 산자수간에 높은 상관관계를 보고하였으나 현장 적용을 앞두고 아직 해결해야 할 문제들이 많이 남아 있다.

IV. 수정능력 검사법의 적정화

위에서 정자의 수정능력을 예측할 수 있는 다양한 방법을 소개하였다. 그렇다면 “어떠한 검사법을 설정하고 어떻게 각 연구실 사정에 맞게 적정화할 것인가?” “어떻게 결과의 정확도를 높일 수 있을까?” 등의 질문을 던져볼 수 있다.

위 질문의 해답을 찾기 위하여 먼저 본인이 설정한 방법 중 투명대 제거 햄스터 난자 침입법 (sperm penetration assay; 이하 SPA로 약함)을 소개하겠다. 먼저 이 방법을 연구실 사정에 적합하도록 하기 위하여 각 실험과정의 적정화를 시도하였다. 적정화의 목표는 수정능력이 높은 정자는 수정능획득 및 침체반응을 최대화시켜 정자와 햄스터 난자의 융합이 최대화하도록 하였고 수정능력이 낮은 정자는 햄스터 난자로의 침입이 최소화하도록 설정하여 결과의 스펙트럼이 넓게 형성되도록 하여 결과 판정이 용이하도록 하였다. 이 단계는 기존의 SPA기법들이 대부분 이러한 단계를 무시하였으므로 수정능력의 차이가 크지 못하여 분별력이 적은 문제점을 보완하기 위함이었다. 즉 수정능력이 높은 군과 낮은 군의 정자침투 사이에 넓은 간격을 만들어 쉽게 수정능력 차이를 구분하고자 하였다 (Chang et al., 1990). 가축에서 수정능력 예측의 주요 목표 중 하나는 종모축 집단에서 수정능력이 낮은 개체를 구별하여 제거하는 것(Waberski et al., 2005)이므로 이 단계의 설정은 매우 중요하다.

음성결과가 돌출되었을 때 실험상 오류인지 실제로 수정능력이 낮은 것인지를 간파하기 위하여 매 실험시 냉동정액을 대조표준 정자로 이용하여 정도관리를 시행하였다 (장 등, 1990; 신 등, 1990). 이러한 실험조건하에서 정상역(fertile range)의 설정이 가능하였다 (김 등, 1991).

본 SPA의 유용성을 검증하고자 시험관 아기 프로그램에 참여한 환자에서 체외수정율과 SPA 결과를 비교·분석하여 수정율을 예견할 수 있는 SPA의 정확성을 확인하였다 (방 등, 1993). 또한 그 후 계속 이러한 과정을 반복한 결과, 표 1과 같은 정확성을 얻을 수 있었다 (김 등, 1998). SPA의 임상적 유용성은 논쟁거리로 남아 있다. 반대의견을 주장하는 연구실의 경우 적은 논문

Table 1. Result of SPA predicting fertility potential in 299 patients undergoing IVF-ET

	Fertilization rate \geq 30%	Fertilization rate <30%
Normal SPA result (n=227)	223	4
Abnormal SPA result (n=72)	15	57
Sensitivity	93.7%	
Specificity	93.4%	
Positive predictive value	98.2%	
Negative predictive value	79.2%	
Overall Accuracy	93.6%	

만을 발표하고 있는 반면, 찬성의견을 주장하는 연구실의 경우 비교적 많은 논문을 발표하고 있다. 즉 SPA를 얼마나 잘 설정하여 운영하고 있는가의 문제이지 SPA 자체가 정확한 도구이나 아니냐의 문제는 아닐 것이다. 본 실험실의 SPA를 예로 들었으나 다른 방법도 마찬가지로 단계 목표에 부합하도록 설정하여야만 한다.

V. 폭넓은 수정능력 평가

각 검사법들은 수정에 필요한 정자의 수정능획득, 침체반응, 투명대와 결합, 난황막 침입 및 남성전핵 형성과 같은 일련의 수정과정 중 한 부분만을 평가하는 방법으로 어느 한 검사법만으로 정자의 수정과정 및 수정능력에 대한 모든 시나리오를 얻는 것은 불가능하다.

따라서 유용한 여러 검사법을 복합적으로 시행할 경우 정자의 수정능력에 대한 보다 폭넓은 정보를 얻을 수 있기 때문에 정자의 수정능력을 판정하는데 있어서 그 정확도를 높일 수 있다는 의견이 제시되었다 (Liu and Baker, 1992).

이와 같은 결과는 단일 검사법보다는 특징적인 여러 검사법을 동시에 시행하는 것이 단일 검사시 문제시되는 위음성 결과를 최소화할 수 있는 것을 나타냈다. 그러나 현장에서 여러 검사법을 동시에 시행한다는 것은 불가능하다. 실제로 정자의 수정능획득, 침체반응, 난황막내 침투 및 남성전핵 형성 등의 일련의 수정과정은 각각의 과정이 전 수정과정과 긴밀한 상관관계가 있으므로 여러 검사법 중 정확성이 가장 높으며 기법이 까다롭지 않은 방법을 잘 설정하여 이용하는 것이 바람직할 것이다.

VI. 결 론

정액검사는 위음성 및 위양성 결과가 높아 정확한 수정능력을 반영에는 충분치 못한 방법이다. 최근 정자의 수정능력이 배아분활율 및 임신율에도 영향을 끼친다고 보고되어 있어 흥미롭다 (방 등, 2003; Aoki et al., 2005). 방 등(2003)은 정자의 수정능력이 낮은 경우에 체외 수정율은 감소를 하지 않았다 하더라도 성공적인 임신에 도달하는 확률이 낮다고 보고하였다. 수정능력이 낮은 경우에는 배아발달율 및 임신율에 감소를 예측할 수 있을 것이다. 정자의 수정능력은 단지 정상적인 수정 현상만의 결과가 아닌 성공적인 임신을 야기할 수 있는 부계의 능력 (paternal capacity)으로 확대 정의하여도 무방하리라 본다. 그러므로 수정능력은 경제동물의 가장 주요한 경제형질이며 동물의 수정능력을 정확히 예측할 수 있는 기술을 잘 설정하여 이용함으로써 경제동물의 번식효율을 극대화할 수 있다.

VII. 참고문헌

1. Ahuja KK (1985): Carbohydrate determinants involved in mammalian fertilization. Am J Anat 174:207-223.
2. Aoki VW, Peterson CM, Parker-Jones K, Hatasaka HH, Gibon M, Huang I, Carrell D (2005): Correlation of sperm penetration assay score with polyspermy rate in *in-vitro* fertilization. J Exp Clin Assist Reprod 2:1-4.

3. Burkman LJ, Coddington CC, Franken DA, Kruger TF, Rosenwaks Z, Hodgen GD (1988): The hemizona assay (HZA): development of diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil Steril* 49:688-697.
4. Calvo L, Dennison-Lagos, Banks SM, Dorfmann A, Thorsell LP, Bustillo M, Schulman JD, Sherins RJ (1994): Acrosome reaction inducibility predicts fertilization success at *in-vitro* fertilization. *Hum Reprod* 9:1880-1886.
5. Chang YS, Lee JY, Moon SY, Kim JG, Pang MG, Shin CJ (1990): Factors affecting penetration of zona-free hamster ova. *Arch Androl* 25:213-224.
6. Cross NL, Overstreet JW (1987): Glycoconjugates of the human sperm surface: distribution and alterations that accompany capacitation *in vitro*. *Gamete Res* 15: 213-35.
7. Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, Hartmann PE (1991): A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge: Relationship to fertility and other seminal parameters. *J Androl* 12:98-103.
8. Gadea J (2005): Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. *Theriogenology* 63:431-444.
9. Gadea J, Matas C, Lucas X (1998): Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. *Anim Reprod Sci* 54:95-108.
10. Lee MA, Trucco GS, Bechtol KB, Wummer N, Kopf GS, Blasco L, Storey BT (1987): Capacitation and acrosome reactions in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil Steril* 48:649-658.
11. Liu DY, Baker HWG (1992): Tests of human sperm function and fertilization *in vitro*. *Fertil Steril* 58:1178-1184.
12. Liu DY, Lopata A, Johnston WIH, Baker HWG (1988): A human sperm-zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize *in vitro*. *Fertil Steril* 50:782-788.
13. Mortimer D, Curtis EF, Miller RG (1987): Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J Reprod Fertil* 81:127-135.
14. Mortimer ST, Mortimer D (1990): Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J Androl*, 11:195-203.
15. Rogers BJ, Van Campen H, Ueno M, Lambert H, Bronson R, Hale R (1979): Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil Steril* 32:664-670.
16. Selles E, Gadea J, Romar R, Matas C, Ruiz S (2003): Analysis of *in vitro* fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reprod Domest Anim* 38:66-72.
17. Sigman M, Lipsultz LI, Howards SS (1997): Evaluation of the subfertile male. In: *Infertility in the male*, Lipsultz LI and Howards SS (Ed.), 3rd ed., Mosby St. Louis, USA.
18. Talbot P, Chacon R (1981): A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zool* 215:201-208.
19. Waberski D, Magnus F, Mendonca Ferreira F, Petrunkina AM, Weitze KF, Topfer-Petersen E (2005). Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. *Theriogenology* 63:470-484.
20. Xu X, Pommier S, Arbov T, Hutchings B, Sotto W, Foxcroft GR (1998): *In vitro* maturation and

fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. J Anim Sci 76:3079-3089.

21. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ (1976): The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol Reprod 15:471-476.
22. 김석현, 김명희, 지병철, 정병준, 김희선, 류범용, 방명걸, 오선경, 서창석, 최영민, 김정구, 문신용, 이진용 (1998): 인간 정자의 수정 능력 평가에 있어서 SPA 검사의 유용성에 관한 연구. 대한산부회지 41:2401-2410.
23. 김석현, 방명걸, 신창재, 김정구, 문신용, 이진용, 장윤석 (1991): 한국인 남성을 대상으로 한 햄스터 난자 침투 분석법의 정상 가임역 설정. 대한불임학회지 18:63-71.
24. 방명걸, 오선경, 신창재, 김정구, 문신용, 장윤석, 이진용(1993): Sperm Penetration Assay의 임상적 타당성에 관한 연구. 대한불임학회지 20:1-7.
25. 방명걸, 정병준, 문신용 (2003): 체외수정기술에서 정자의 수정능력이 배아의 발생능 및 임신율에 미치는 영향. 대한불임학회지 30:105-109.
26. 신창재, 방명걸, 이진용, 장윤석, 정영채, 김창근 (1990): 햄스터 난자 침투 분석법에서 대조 표준 정자로서 황소정자의 유용성에 관한 연구. 대한산부회지 33: 1758-1763.
27. 장윤석, 김석현, 강석진, 방명걸, 신창재, 문신용 (1990): 냉동 보존된 정자를 이용한 난자의 체외수정에 관한 연구. 대한산부회지 33: 61-68.