

정자 준비에서의 Wang's Tube 효과에 관한 연구

고려대학교 의과대학 산부인과학교실

김영태 · 김용욱 · 김해중 · 김선행 · 나중열 · 구병삼

A Study of Effects of Wang's Tube in Semen Preparation

Young Tae Kim, M.D., Yong Ook Kim, M.D., Hae Jung Kim, M.D., Sun Haeng Kim, M.D.,
Joong Yol Rha, M.D. and Pyong Sahm Ku, M.D.

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

= Abstract =

Swim-up and Wang's tube system are known methods of motile sperm selection and aerobic bacterial removal from the raw semen.

This study was designed to evaluate the recovery rate of motile sperm, % normal morphology of sperm, the efficiency of bacterial removal after sperm preparation by the above two methods.

The results were as follows.

1. There was more significant increase of sperm concentration in preparation by swim-up than Wang's tube ($p < 0.05$). The concentration of sperm by swim-up was changed from 82.5×10^6 /ml to 68.6×10^6 /ml, and Wang's tube was changed from 82.5×10^6 /ml to 36.0×10^6 /ml.
2. There was significant increase in sperm motility after preparation by two methods in comparison with initial sperm motility ($p < 0.05$), but no statistical difference between two methods was noted. The % motility of sperm by swim-up was increased from 66.1% to 95.7% and Wang's tube from 66.1% to 98.1%.
3. There was significant increase of % normal morphology of sperm in the samples prepared by two methods ($p < 0.05$), from 49.2% to 85.3% in swim-up and from 49.2% to 92.1% in Wang's tube, but there was no statistical significance between them.
4. There was no bacterial growth in aerobic culture after preparation by two methods.

서 론

불임치료의 방법으로 인공 수정(Artificial Insemination), GIFT (Gamete Intrafallopian Transfer), 또는 체외 수정 및 자궁내 이식(IVF-ET, in vitro fertilization-embryo transfer) 등이 널리 사용되고 있다. 자궁 경관 점액은 활동성 높은 정자를 선택하고 수정에 나쁜 영향을 주는 여러 인자를 제거하게 되는 natural barrier

* 본 논문의 요지는 1990년 대한 불임학회 추계 학술대회에서 발표되었음.

* 본 연구는 1989년도 고려대학교 의과대학 산부인과 동문회 연구비 보조로 이루어진 것임.

역활을 하는데(Moghissi, 1984), 상기 시술들은 자궁 경관 점액을 우회(bypass)하므로 다양한 미생물의 감염으로 골반의 염증 또는 수정 과정의 장애등을 초래할 수 있다(Levia et al., 1985).

따라서 성공적인 수정에는 난자의 성숙도와 함께 잘 선택된 정자가 필수적이며 이를 위한 정자 준비의 목적은 정자의 수정 능력 획득, 운동성 정자획득, 정자액내 프로스타글란딘 제거, 각종 미생물, 미운동성 정자, 백혈구 및 기타 세포 제거등에 있다(Pardo & Bancells, 1989).

본 연구는 정자 준비의 여러 방법중 하나인 Wang's tube를 사용하여 운동성 정자획득과

정상 형태 정자 획득 및 세균제거 효과등에 주안점을 두고 swim-up 방법과 비교 시행하였다.

실험 대상 및 방법

본 실험은 1990년 7월 초부터 동년 8월 말 까지 고려대학교 의과대학 해화병원 산부인과 불임 클리닉을 내원한 정자 공여자 20명을 대상으로 하였다.

미국 불임학회 지침(The American Fertility Society, 1986)에 의한 정자 공여자의 병력과 혈액 검사등을 거친 적격자로 판명된 후 3-4 일간의 금욕기간을 거쳐 수음에 의해 사정된 20예의 신선정액을 실온에 30분간 방치, 액화시킨 후 BAP(Blood agar plate)와 MacConkey agar에 각각 100 μ l를 접종하여 고르게 편후 35 $^{\circ}$ C 배양기에 18-24시간 호기성 배양을 한 후 집락수를 세어서 단위 ml당 CFU(colony forming unit)을 판정하였다.

또한 Markler chamber를 이용하여 최초의 정자수와 운동성을 광학 현미경을 이용 관찰하였다. 동일 정액을 2군으로 나누어 제일군은 swim-up 방법을 사용하였는데, 정액 0.5ml와 0.4% bovine serum albumin (BSA)를 함유하고 항생제 Streptomycin 6,000 unit/100ml, Penicillin 12,000 unit/100ml을 첨가한 Ham's F-10 배양액 1ml를 섞은 후 300G로 10분간 원심분리한 후 상층액은 제거하고 침전된 정자 pellet 위에 다시 동일 배양액을 넣어 섞은 후 동일한 방법으로 세척하였다. 다시 정자 pellet 위에 1ml의 동일 배양액을 넣고 배양기(Forma, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ in air)에서 1시간 배양 후 상층액 1ml를 채취하여 정자수, 정상형태의 정자, 운동성등을 관찰하고, 전술한 방법으로 세균 배양을 하였다.

Wang's tube 방법은 Wang's tube(Fertec Co., Taiwan)의 표준형인 WT-S1(그림 1)을 37 $^{\circ}$ C

배양기에 10분간 방치 후 항생제가 첨가되지 않은 4% BSA 함유 Ham's F-10 배양액을 A지점에서 D지점까지 채운 후 다시 10분간 37 $^{\circ}$ C 배양기에 보온시켰다. 제 2군의 액화된 1ml의 신선정액에 3ml의 상기 배양액을 섞은 후 실온에서 300 \times G, 7분간 원심분리하여 상층액은 다른 시험관에 보관하고 정자 pellet은 pipette을 이용하여 조심스럽게 P지점에 옮기고, 보관된 상층액을 다시 300 \times G, 7분 원심분리하여 얻은 정자 pellet을 같은 방법으로 P지점에 다시 옮긴 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂배양기에 2시간 방치후 꺼내어 C지점과 D지점을 절단하여 약 0.11ml의 sperm specimen을 얻어 전술한 정액 검사와 세균 배양검사를 시행하였다.

통계처리는 Student's paired t-test를 사용하였다.

실험 결과

정자의 수는 신선 정액에서 82.5 $\times 10^6$ /ml이었고 swim-up 방법 후 68.6 $\times 10^6$ /ml, Wang's tube 방법 후 36.0 $\times 10^6$ /ml로써, 양군에서 통계학적으로 유의있게 감소했으며(p < 0.05), 운동성 정자율은 신선정액은 66.1%에서 swim-up 방법 후 95.7%, Wang's tube 방법 후 98.1%로

Table 1. All of the results of raw semen, swim-up, and Wang's tube system (values are means)

Sample	Sperm count $\times 10^6$ /ml	Motility %	Morphology % normal
Raw semen	82.5	66.1	49.2
Swim-up	68.6	95.7	85.3
Wang's tube	36.0	98.1	92.1

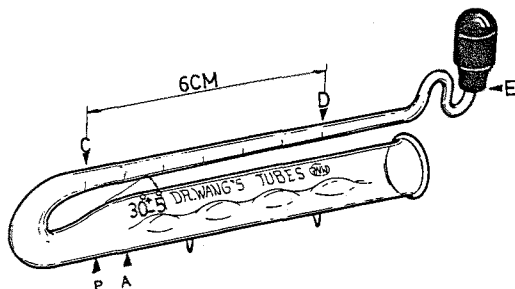


Fig. 1. Wang's tube-S1.

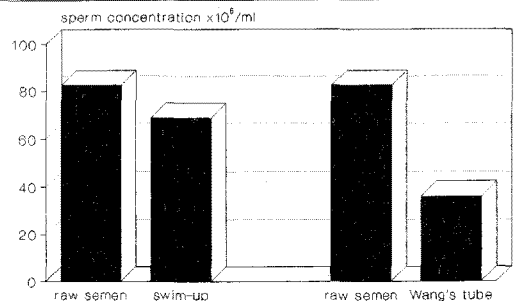


Fig. 2. Sperm concentration of raw semen, swim-up, and Wang's tube.

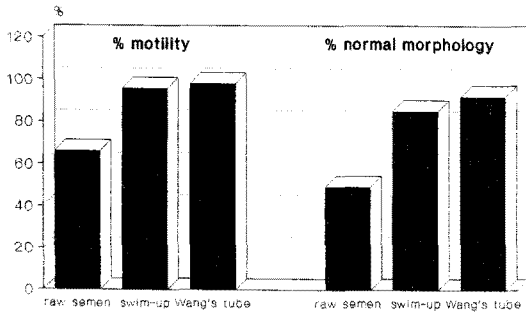


Fig. 3. Sperm % motility & % normal morphology of raw semen, swim-up, and Wang's tube.

양군 모두 통계학적으로 유의하게 증가되었으나($p < 0.05$) 양군간의 차이는 없었다(표 1, 그림 2, 3).

정상형태의 정자율은 신선 정액의 49.2%에서 swim-up 방법 후 85.3%, Wang's tube 94.1%로 역시 통계학적으로 유의하게 증가되었으나($p < 0.05$) 양군의 통계학적 차이는 없었다(표 1, 그림 3).

호기성 배양 검사 결과 신선 정액 20예 중 17예에서 각종 세균이 자랐으나(표 2), swim-up 방법과 Wang's tube 방법에서는 세균이 자라지 않았다.

고 찰

정자의 수정 능력에 영향을 미치는 변수로써 정자의 수, 형태, 운동성 및 면역 단백질, 각종 미생물들이 있으며 따라서 자궁강내 인공수정, 체외수정술, GIFT등의 불임 치료에서 양질의 정자 선택을 위한 중요한 과정으로 정자 준비를 빼놓을 수 없다(Stone et al., 1986).

이러한 semen preparation의 방법으로는 정자 세정법(DiMarzo & Rakoff, 1986), swim-up(Glass & Ericsson, 1979), glass wool filtration(Paulson & Polakoski, 1977, 1979), Albumin density gradient(Ericsson et al., 1973), Percoll density gradient(Kaneko et al., 1983), Ficoll(Kaneko et al., 1980), Wang's tube등 많은 방법들이 고안, 사용되고 있다.

Wang등(1988)이 개발한 Wang's tube는 변형된 swim-up 방법으로써 특별히 고안된 Column을 통과하는 거리가 표준 swim-up 방법보다 길기 때문에 많은 양의 운동성 정자 획득과 배양액에 항생제를 첨가하지 않았음에도 미생물 제거에 좋은 효과를 보고하였다.

Table 2. Bacteria found in raw semen

Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermis
Staphylococcus saprophyticus
Staphylococcus hominis
Streptococcus viridans
Enterococci
Bacillus spp.

Toth등(1982)은 정자가 미생물의 운송을 도와서 상부 생식 기관에 도달하는데 특히 자궁내 인공수정, IVF, GIFT등에서 자궁 경관 점액을 우회하기 때문에 골반 염증을 증가시키고 따라서 미생물 제거를 위하여 정자세정과 배양액에 항생제 첨가를 추천하고 있다.

Wong등(1986)은 배양액에 penicillin과 streptomycin등의 항생제 첨가로 swim-up 방법을 사용한 15예의 semen specimen에서 완전히 미생물을 제거하였다고 보고하였고, Punjabi등(1990)은 자궁내 인공수정을 위한 정자 처리 후 발생하는 세균제거 효과는 정자의 물리적 처리와 배양액내 항생제에 기인한다고 보고하였다.

그러나 항생제의 첨가는 환자에 대한 항생제 부작용 가능성, 정자와 난자에 대한 부정적 영향의 가능성, 또한 항생제에 대한 세균의 저항성과 그에 따른 살균 효과의 여부, 세균 잔유물이나 균체 내독소등이 수정과정에 끼치는 영향등의 여부, 세균 잔유물이나 균체 내독소등이 수정과정에 끼치는 영향등의 제 문제로 사용되는 항생제 종류와 양에 많은 제한을 두어 왔음은 주지의 사실이다.

Wang등(1989)에 의하면 30예의 인간의 신선 정액의 호기성 세균 배양결과 평균 9.0×10^3 CFU/ml 보였으며 균주는 Corynebacterium spp., Staphylococcus epidermis, Viridans streptococci와 여러종의 diplococci등이 배양되었으나 Wang's tube 방법 후 동일 배양검사 결과 어떤 균주도 배양되지 않았으므로 탁월한 세균 제거 효과를 보고하였다.

본 실험 결과, swim-up 방법과 Wang's tube 방법을 사용 후 정액의 호기성 배양 결과 양군에서 모두 세균 배양이 되지 않아서 세균 제거 효과는 좋았으나 swim-up 방법의 경우 배양액에 항생제를 첨가하였고 Wang's tube 방법에 사용된 배양액에는 항생제를 사용하지 않았으

므로 Wang's tube 방법은 배양액에 항생제 첨가로 인한 여러 부작용의 가능성을 무시할 수 있을 것으로 생각된다.

또한 정자의 수와 운동성, 정상 형태등은 수정 능력의 중요한 요소이며 특히 남성요인에 의한 불임 치료에서 운동성이 활발한 정자의 선택 분리는 임신 성공의 열쇠가 될 수 있다.

본 실험에서 신선 정액의 정자 농도가 $82.5 \times 10^6/ml$ 에서 swim-up 방법 후 $68.6 \times 10^6/ml$ 로, Wang's tube 방법 후 $36.0 \times 10^6/ml$ 로 감소되어 비정상 정액 소견을 보이는 경우 Wang's tube 방법을 사용할 경우 swim-up 방법 보다 더욱 정자 농도가 감소될 것으로 보이며 이에 관한 추사가 필요할 것으로 생각된다.

Wang등(1988)은 swim-up 방법, Percoll 방법, Wang's tube 방법을 사용하여 정자의 운동성, 정상 형태등을 측정하였는데 Wang's tube 사용군이 swim-up과 Percoll 사용군에 비하여 통계학적으로 유의있게 좋은 성적을 보고하였다.

본 실험 결과, 정자의 운동성은 Wang's tube 방법과 swim-up 방법 후 모두 유의있게 증가하였으나 양군간의 유의있는 차이는 없었으며, 정자의 정상 형태율도 Wang's tube 사용군이 높았지만 두 방법간의 의미있는 차이는 없었다. 이는 실험에 사용된 신선정액의 조건과 예수등이 상이하므로 Wang등(1988, 1989)과 같은 통계학적으로 유의한 좋은 성적을 얻을 수 없었다.

앞으로 Wang's tube의 효과를 보다 확실히 알기 위하여는 좀더 많은 예수와 균 배양검사 시 혐기성 균과 Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, 각종 virus등의 배양 검사가 필요할 것으로 특히 감정자증, OAT 증후군 같은 비정상 정액 소견을 보이는 경우에 추사가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

저자들은 20예의 신선 정액을 정자준비 방법인 swim-up 방법과 Wang's tube 방법을 사용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정자의 concentration은 swim-up군($68.6 \times 10^6/ml$)이 Wang's tube군($36.0 \times 10^6/ml$)보다 유의있게 증가되었다($p < 0.05$).

2. 정자의 운동성은 신선정액과 비교시 양군 모두 유의있게 증가했으며($p < 0.05$), Wang's tube군(98.1%)이 swim-up군(95.7%)보다 증가

되었지만 통계학적 의의는 없었다($p > 0.05$).

3. 정상형태 정자 획득율은 신선정액보다 양군에서 유의있게 증가했으며($p < 0.05$), Wang's tube군(92.1%)이 swim-up군(85.3%)보다 증가했으나 통계학적 의의는 없었다($p > 0.05$).

4. 호기성 배양검사 결과 양군에서 모두 세균이 관찰되지 않았다.

인 용 문 헌

- DiMarzo SJ, Rakoff JS: Intrauterine insemination with husband washed sperm. *Fertil Steril* 1986, 46, 470.
- Ericsson RJ, Langevin CN, Nishimo M: Isolation of fraction rich in human Y sperm. *Nature*, 1973, 246, 421.
- Glass RH, Ericsson RH: Intrauterine insemination of isolated motile sperm. *Fertil Steril*, 1979, 29, 535.
- Kaneko S, Moriwaki C, Sato H, Kobayashi T, Izuka R: Development multiple exposure photography method for analysis of sperm motility and preparation of washed sperm with Ficoll density gradients. *JPN J Fertil Steril*, 1980, 25, 491.
- Kaneko S, Yamaguchi J, Kobayashi T, Izuka R: Separation of human X and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. *Fertil Steril*, 1983, 40, 661.
- Levia JL, Peterson EM, Wetkowski M, De la Maza LM, Stone SC: Microorganisms in semen used for artificial insemination. *Obstet Gynecol*, 1985, 65, 669.
- Marrs RP, Saito H, Yee B, Sato F, Brown J: Effects of variation of in vitro culture techniques upon oocyte fertilization and embryo development in human in vitro fertilization procedure. *Fertil Steril*, 1984, 41, 519.
- Moghissi KS: The function of the cervix in human reproduction. *Curr Probl Obstet Gynecol*, 1984, 7, 1.
- Pardo M, Bancells N: Artificial insemination with husband sperm: Techniques for sperm selection. *Arch Androl*, 1989, 22, 15.
- Paulson JD, Polakoski KL: A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. *Fertil Steril*, 1977,

28, 178.

- Paulson JD, Polakoski KL: Further characterization of glass wool column filtration of human semen. *Fertil Steril*, 1979, 32, 125.
- Punjabi U, Gerris J, Bijlen JU, Delbeke L, Gielis M, Buytaert PH: Comparison between different pre-treatment techniques for sperm recovery prior to intrauterine insemination, GIFT or IVF. *Human Reproduction*, 1990, 5, 1-75.
- Stone SC, Maza LM, Peterson EM: Recovery of microorganisms from the pelvic cavity after intracervical or intrauterine artificial insemination. *Fertil Steril*, 1986, 46, 61.
- The American Fertility Society: New guidelines for the use of semen donor insemination. In: *Progress in infertility*, Behrman SJ, Kistner RW, Patton GW, 3rd eds., *Little, Brown and Company*, 1988, 827-833.
- Toth A, O'Leary WM, Ledger W: Evidence for microbial transfer by spermatozoa. *Obstet Gynecol*, 1982, 59, 556.
- Wang FN, Cheng CM: Sperm screening for STD/HIV using Wang's tube. *Arch AIDS Res* III, 1989, 307.
- Wang FN, Peterson EM, Maza LM, Stone SC: Preparation of motile sperm free contaminating bacteria. *Am J Gyn Health Vol II*, 1988, 2, 61.
- Wong PC, Balmaceda JP, Blance JD, Gibbs RS, Asch RH: Sperm washing and swim-up technique using antibiotics removes microbes from human semen. *Fertil Steril*, 1986, 45, 97.
-