

체외수정시술시 예후 인자로서 정자 첨체반응 유발검사의 유용성

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 산부인과학교실

김정훈 · 채희동 · 강은희 · 추형식 · 전용필 · 강병문
장윤석 · 목정은

A Stimulated Acrosome Reaction Test as a Prognostic Factor in In Vitro Fertilization

Chung-Hoon Kim, Hee-Dong Chae, Eun-Hee Kang, Hyung-Sik Chu, Yong-Pil Cheon,
Byung-Moon Kang, Yoon-Seok Chang and Jung-Eun Mok

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, University of Ulsan,
Asan Medical Center, Seoul, Korea*

= Abstract =

It is well known that the clinical test for responsibility of accurate fertilization capacity in male partners is very important to diagnose and treat the infertility. However, it has been reported that the traditional semen analysis cannot accurately predict fertilization and pregnancy potential.

The present study was performed to evaluate the acrosomal reaction to ionophore challenge (ARIC) test as a prognostic indicator for fertilization of sperm and oocyte in an in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) program. From March 1996 to February 1997, 30 couples undergoing IVF program were allocated to this study group. All female partners in the study group were 35 years old or less and their serum level of basal follicle stimulating hormone (FSH) and estradiol (E_2) were normal. All the male partners have normal parameters of semen analysis. The ARIC tests were performed on the day of ovum pick up and in vitro insemination in all the male partners. The controlled ovarian hyperstimulation (COH) using luteal long protocol of gonadotropin releasing hormone (GnRH) agonist was used in all couples for IVF-ET.

The acrosomal reaction with 10 μ l of 10% DMSO was induced spontaneously in $10.1 \pm 9.8\%$, and acrosomal reaction with calcium ionophore A 23187 was induced in $27.4 \pm 18.1\%$, and the ARIC value was $17.4 \pm 16.2\%$. There were no significant correlation between the ARIC value and the fertilization rate ($r^2=0.044$, $p=0.268$). There were also no significant correlation between the ARIC value and the percentage of the grade I, II embryos ($r^2=0.046$, $p=0.261$).

On the basis of above results, it was suggested that ARIC test might not be a useful prognostic indicator for fertilization in IVF-ET in male partners with normal parameters of conventional semen analysis. We guessed that IVF-ET could be performed to the patients primarily without universal application of ARIC test to all male partners, and if fertilization

* 본 연구는 1996년 아산생명과학연구소 연구비 지원에 의한 것임.

failure occurs, the microassisted fertilization (MAF) such as intracytoplasmic sperm injection (ICSI) might be used as an alternative mode of treatment with acceptable success rate.

Key Words: Acrosomal reaction to ionophore challenge (ARIC) test, Fertilization capacity, Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

서 론

불임증의 진단과 치료에 있어 인간 정자의 생식 능력을 충분히 반영하여 줄 수 있는 임상 검사법은 정확한 원인 진단과 향후 치료 방향의 설정, 그리고 예후의 예측에 있어 절대적으로 중요하지만 아직은 만족스럽지 못한 수준에 있다. 통상적인 정액검사 (semen analysis)가 기본적인 검사로 널리 사용되고 있지만 이는 정액의 양과 농도 등의 측정에 있어서는 비교적 객관적인 결과를 보여줄 수는 있는 반면, 운동성 (motility)이나 형태 (morphology)의 관찰에 있어서는 주관적인 요소가 많이 작용하게 되며, 더우기 검사 자체가 해당 남성 정자의 수정 능력 (fertilization capacity)을 정확히 반영하지 못하는 것으로 알려져 있다 (Cockett *et al.*, 1975).

이러한 문제점을 해결하기 위한 노력의 일환으로 컴퓨터를 이용한 정자 운동성의 분석 (computer-aided semen analysis, CASA), 햄스터 난자침투분석법 (hamster sperm penetration assay, SPA), 저장액내 정자팽창검사 (hypoosmotic swelling test, HOST), 정자의 시험관내 점액질 침투능력검사 (in vitro test of sperm penetration into mucus), 그리고 정자형태의 정밀분석 (sperm morphology evaluation using strict criteria, SMEUSC) 등이 연구 개발되어 왔다. 이들 중 SPA와 SMEUSC가 최근 가장 널리 사용되고 있으나 SPA의 경우 검사 자체의 민감도와 음성예측도가 낮고, 실험 기법, 조건 및 결과치의 해석이 연구자간에 서로 다를 수 있으며, 검사 기간이 길고, 비용이 많이 든다는 단점이 있다. SMEUSC는 검사가 간편하고, 결과를 단시간 내에 알 수 있는 반면, 검사자의 주관적 요소가 많이 작용하게 되어 기준치의 설정이 어려울 뿐만 아니라, 각 기관마다 고유의 기준치를 설정해야 한다는 단점이 있다. 즉 SPA나 SMEUSC는 모두 검사를 시행하는 기관 또는 검사자에 따라 결과의 해석이 다를 수 있어, 검사 기관에 따른 연구 결과의 비교 분석이 곤란하다는 결정적인 단점이 있다.

인간의 정자는 난자와 수정에 이르기까지 수정능획득 (capacitation)과 첨체반응 (acrosomal reaction) 등과 같은 과정을 거쳐야만 한다 (Bedford, 1983). 따라서 정상 수정의 필수 조건인 상기 과정을 객관적으로 평가할 수 있다면 정자의 수정 능력에 대한 지표로 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 이에 따라 1991년 Cummins 등은 정자의 첨체반응을 유도하여 이것이 정자의 수정 능력과 밀접한 관계가 있다고 보고하였고 이후 많은 연구자들이 정자의 첨체반응 정도와 정자의 수정 능력과의 상관 관계에 대하여 발표한 바 있다 (Fenichel *et al.*, 1991; Pampiglione *et al.*, 1993; Henkel *et al.*, 1993).

이에 따라 저자들은 남성의 통상적인 정액검사에서는 정상 소견을 보이면서 다른 원인 인자에 의하여 체외수정시술 (in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)을 받은 환자들을 대상으로 calcium ionophore로 인간 정자의 첨체반응을 유도한 후 FITC-PSA 염색을 시행하여 실제로 첨체반응이 유발된 정자의 비율을 구하여 이 결과가 인간 난자의 체외수정시술시 수정률을 예측할 수 있는지를 알아 봄으로써 정자의 첨체반응 유발검사 (acrosomal reaction to ionophore challenge test, ARIC test)의 임상적 유용성을 규명하고자 본 연구를 시작하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1996년 3월부터 1997년 2월까지 불임증을 주소로 울산대학교 의과대학 서울중앙병원 산부인과 불임클리닉을 방문하고 불임검사를 시행한 결과 치유될 수 없는 난관 인자 등에 의한 불임으로 체외수정시술 이외에는 다른 치료 방법이 없다고 판단된 불임 부부들중 통상적인 정액검사에서는 정상 소견을 보였던 환자들을 대상으로 하여 본 연구를 시행하였다.

불임 부부중 여성의 연령이 35세 이상이거나, 월경 주기 제 3일의 기저 혈중 난포자극호르몬 (follicle stimulating hormone, FSH)의 농도나 기저

에스트라디올 (estradiol, E₂)의 농도가 상승되어 있는 경우, 과거 수술이나 자궁내막증 등으로 임상적으로 심한 골반내 유착이 존재하는 경우, 그리고 한쪽 난소만이 존재하는 경우 등에서는 난소 반응의 저하가 예상되므로 (Wood *et al.*, 1985; Molloy *et al.*, 1987; Muasher *et al.*, 1988; Scott *et al.*, 1989; Licciardi *et al.*, 1991) 수정에 미치는 영향이 있을 것을 방지하기 위하여 제외하였고 이외에도 양측 모두 시술 결과에 영향을 끼칠만한 내외과적 병력이 있는 불임 부부는 제외되었다.

2. 연구 방법

대상 남성들은 모두 2~3일간의 금욕 기간 후 체외수정시술시 난자채취 당일 아침에 수음을 통하여 정액을 채취하였다. 살균 처리된 120 ml polypropylene 용기에 정액을 채취하여 실온에서 30~60분간 방치하여 액화시킨 후 통상적인 정액검사와 침체반응 유발검사를 시행하였고, 나머지 정자로는 채취된 난자와 체외수정을 시도하여 수정 유무 및 수정률을 측정하였다.

1) 통상적 정액검사

세계보건기구 (World Health Organization, WHO, 1992)의 규정에 따라 액화된 정액의 전체 부피를 측정하고 이중 약 10 μ l를 취하여 Makler counting chamber (Sefi Medical)를 이용하여 정자의 농도와 정자의 운동성 (%)을 측정하였다.

2) 침체반응 유발검사

① 정자의 처리

액화된 정액을 5 ml Ham's F-10 (+0.3% HSA)으로 희석한 후 600 g에서 5분간 원심분리한 뒤에 상층액을 제거하고 다시 3 ml Ham's F-10 (+0.3% HSA)으로 희석한 후 600 g에서 10분간 원심분리하여 세척하였다. 다시 상층액을 제거하고 남은 정자피에 정자피의 양을 고려한 적당량의 Ham's F-10 (+1.0% HSA)을 첨가하여 희석한 후 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 상태에 방치하여 운동성이 활발한 정자가 부유되도록 하였다. 운동성이 좋은 정자만 모인 상층액을 둘로 나누어 하나는 체외수정을 위하여 사용하고 다른 하나는 침체반응 유발검사를 위하여 사용하였다.

② 침체반응의 유도

준비된 정자를 양분하여 하나는 자발적인 침체반응률을 관찰하기 위하여 10 μ l의 10% DMSO (dimethyl sulfoxide)만으로 처리하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하였고 다른 하나는 인위적으로 침

체반응을 유발하기 위하여 100 mmol/l, 10 μ l의 calcium ionophore A 23187 (Sigma, U.S.A.)과 5 mM의 DMSO를 첨가한 후 동일 조건에서 배양하였다. Calcium ionophore의 농도는 10, 20, 그리고 30 mM이 되도록 F10용액을 첨가하여 냉장 보관하면서 사용하였다.

배양된 검체에 각각 300 μ l의 80% Percoll 용액을 첨가하고 600 g에서 15분간 원심분리하였다.

③ 정자 침체의 염색

원심분리된 검체의 상층액을 버리고 정자피를 30분간 4 $^{\circ}$ C에서 50 μ l, 95% ethanol로 고정시켰다. 이렇게 ethanol에 고정된 정자를 깨끗한 슬라이드에 옮긴 뒤 공기 중에서 건조시킨 후, 50 μ g/ml의 FITC (fluorescein isothiocyanate)-conjugated pisum sativum lectin (PSL, L 0770, Sigma, U.S.A.)으로 염색하였다. 4 $^{\circ}$ C의 습기있는 냉암소에 방치한 후 이 슬라이드를 충분한 양의 물로 적어도 15분 이상 세척하여 말린 후 형광현미경으로 관찰하였다.

④ 침체반응의 결과 판독

5가지의 형태로 나누어 분류하였다. A는 침체가 완전히 염색된 것으로 침체가 보존되어 있는 것을, B는 침체의 침단 부위가 부분적으로 염색이 된 것으로 부분적으로 침체반응이 일어난 것을, C는 정자의 적도 부위에만 염색이 된 것으로 완전한 침체반응이 일어난 것을, D는 정자의 두 부 전체가 염색이 안된 것으로 침체의 기질이 없음, 그리고 E는 다른 이상한 모양의 침체를 갖고 있는 형태로 모양에 이상이 있는 정자를 각각 의미한다.

각 검체에서 일어난 침체반응은 C 형태를 보이는 정자의 수/A, B, C 형태를 보이는 정자 수의 합x100(%)로 표시하였고 D와 E의 형태는 이 계산에서 제외하였다.

3) 과배란유도 및 체외수정시술

대상 환자들은 GnRH-a (Decapeptyl, D-Trp-6-LH, Ferring, Malmo, Sweden)를 사용한 황체기 장기투여법 (luteal phase long protocol)을 실시하여 과배란유도를 시행하였다 (Neveu *et al.*, 1987; Tan *et al.*, 1992 & 1994). 월경 주기가 일정한 환자에서는 월경 주기 제 14일에 난포의 크기 및 배란 유무를 확인하고 월경 주기 제 21일부터 GnRH-a를 하루 0.1 mg씩 매일 피하 주사하여 시상하부-뇌하수체 전엽축의 억제제를 유도하였다.

GnRH-a의 피하 주사 후 월경이 있으면 월경

주기 제 3~5일에 질식 초음파 (Leopard, B & K, Denmark)를 시행하여 관찰되는 난포의 직경이 10mm 미만인 경우에 성공적으로 기능 억제에 도달하였다고 생각하고 외인성 성선자극호르몬을 투여하여 과배란유도를 시작하였다. 이때, 질식 초음파상 GnRH-a에 의한 난소 낭종이 발생하였거나 난관 수종이 있는 경우가 확인되면 질식 초음파 유도하에 천자를 실시하여 흡인 제거하였다. 외인성 성선자극호르몬으로는 human menopausal gonadotropin (hMG; Humegon, Organon, Holland)과 human follicle stimulating hormone (hFSH; Metrodin, Serono, Switzerland)이 사용되었다. 외인성 성선자극호르몬 투여 방법은 기본적으로 단계적 용량감소법 (step-down fashion)을 채택하였으며, hMG나 hFSH 투여 시작 4일후부터 질식 초음파를 이용하여 난포의 성장을 감시하였고, 난포의 성장 정도에 따라 외인성 성선자극호르몬의 용량을 조절하였다. 최대 난포 (leading follicle)의 평균 직경이 18 mm에 도달하였거나 평균 직경이 16 mm 이상인 난포가 3개 이상 관찰되면 human chorionic gonadotropin (hCG; Pregnyl, Organon, Holland) 10,000 IU를 근육 주사하여 배란을 유도하였고 같은 날 혈중 E₂ 농도가 측정되었다. 이 측정에는 estradiol MAIA kit (CIBA-Corning Diagnostics, U.S.A.)를 사용한 방사면역측정법 (radioimmunoassay, RIA)이 이용되었으며 측정에서 intraassay variance와 interassay variance는 각각 7%와 10%를 넘지 않았다.

난자 채취 직후 수음에 의하여 정액을 채취하였으며 채취된 난자와 정자는 공동배양한 후 약 18~20시간 후에 수정 여부를 조사하였고 난자 채취 약 48시간 후에 배아의 난할 여부를 평가하여 난할이 확인된 배아는 Jones 등 (1983)이 고안한 배아이식관 (transfer catheter)을 이용하여 등급이 좋은 배아를 최고 5개까지 환자의 자궁내로 이식하며, 여분의 배아는 동결보존시켰다. 난자 채취 당일 저녁부터 progesterone in oil (Progest, Samil Phar., Korea)을 매일 50 mg씩 근육 주사하여 황체기 보강 (luteal support)을 실시하였다.

임신의 확인은 배아 이식후 제 11~12일째에 혈중 β-hCG 농도를 측정하고 이때 3 mIU/ml 이상이면 1주일 후부터 매주 질식 초음파를 시행하여 태낭 (gestational sac) 및 태아가 확인되고 태아의 심장 박동이 관찰되거나 임상적으로 유산이 의심되어 실시한 인공소파술에 의하여 병리

조직학적으로 태아 조직이 확인된 경우를 임상적 임신 (clinical pregnancy)으로 판정하였다. 임상적 임신으로 진단된 환자는 임신 및 분만의 결과를 추적 관찰하여 확인하였다.

혈중 β-hCG의 측정은 hCG MAIACLONE kit (Serono Diagnostics, MA)를 이용한 면역방사계측법 (immunoradiometric assay, IRMA)이 사용되었으며, 측정에서 interassay variance와 intraassay variance는 각각 10%와 5%를 넘지 않았다.

4) 통계 분석

ARIC value와 수정률 및 제 1, 2 등급 배아의 비율 사이의 상관 관계의 분석은 regression analysis를 각각 이용하였으며 p<0.05일 때 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1996년 3월부터 1997년 2월까지 총 30명의 환자들을 대상으로 연구하였다. 수정에 실패한 경우는 1례에서 있었으나 20% 이하의 극히 저조한 수정률을 보이는 환자는 나타나지 않았다.

대상 환자들의 평균 연령은 32.8±4.1세이었고 배우자들의 평균 연령은 35.9±4.7세이었다. 평균 불임 기간은 68.7±55.4개월이었고 체외수정 시술의 적응증은 각각 양측 난관 폐쇄에 의한 난관 인자가 19명, 만성 무배란을 보이는 배란 인자가 8명, 그리고 병기 I, II 자궁내막증이 3명이었다. 정액 검사 소견상 평균 정액의 양은 3.3±1.3 ml, 농도는 108.2±109.2x10⁶/ml, 운동성 정자의 비율은 73.9±20.3%, 그리고 정상 형태를 보이는 정자의 비율은 56.2±21.4%로 명백한 남성

Table 1. Clinical characteristics of patients

No. of patients	30
Age of patients (yrs)	32.8±4.1
Age of husbands (yrs)	35.9±4.7
Duration of infertility (mos)	68.7±55.4
Patients with primary infertility	12/30 (40.0%)
Indications of IVF-ET	
Tubal factor	19
Endometriosis (Stage I, II)	3
Chronic anovulation	8

Values are means±SD.

Table 2. Results of IVF-ET and ARIC test of the study populations

No. of patients	30
No. of gonadotropin ampules (75IU)	36.5±11.5
Duration of gonadotropin administration (days)	9.7±1.5
No. of oocytes retrieved	9.0±4.4
No. of oocytes fertilized	7.6±4.6
Fertilization rate (%)	81.7±20.2
No. of embryos transferred	4.9±1.3
Pregnancy rate per patient	5/30 (40.0%)
Spontaneous acrosomal reaction	10.1±9.8
Induced acrosomal reaction	27.4±18.1
ARIC value	17.4±16.2

Values are means±SD.

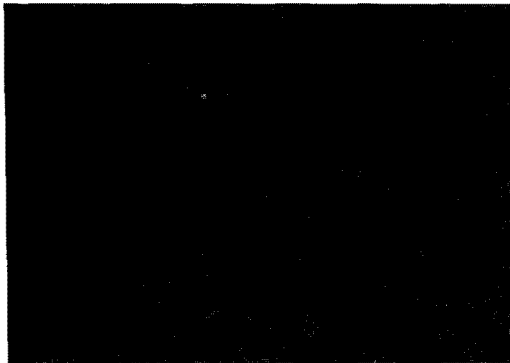


Fig. 1. Staining patterns of the sperm head with FITC-PSA.

인자로 진단될 수 있는 배우자는 발견되지 않았다 (Table 1).

체외수정기술의 결과를 보면, 과배란유도에 사용된 외인성 성선자극호르몬의 총 투여 용량은 1 앰플의 용량을 75IU를 기준으로 36.5±11.5 앰플이었고 총 투여 기간은 9.7±1.5일이었으며 채취된 난자의 평균 개수는 9.0±4.4개로 저반응군에 분류될만한 환자는 없었다. 수정에 이른 난자의 평균 개수는 7.6±4.6개로 그 평균 수정률은 81.7±20.2%이었으며 이식이 시행된 배아의 평균 개수는 4.9±1.3개이었다 (Table 2).

ARIC 검사를 시행한 결과 DMSO만으로 처리

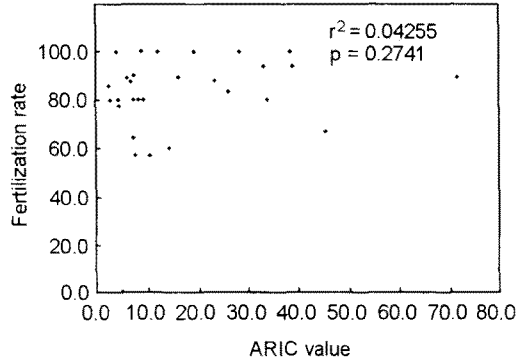


Fig. 2. Correlation between fertilization rate and ARIC values of the patients.

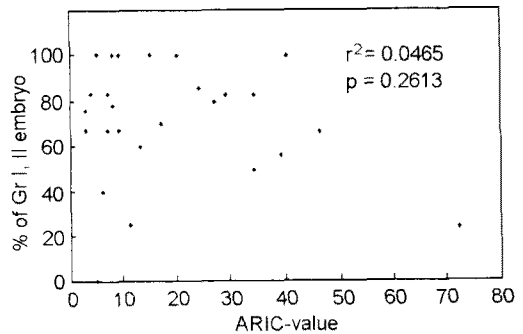


Fig. 3. Correlation between proportion of grade I, II embryos and ARIC values of the patients.

한 자발적인 침체반응률은 평균 10.1±9.8%이었으며, A23187 처리에 의하여 유발된 침체반응률은 평균 27.4±18.1%로 나타났다. 동일 검체에서 유발된 침체반응률과 자발적 침체반응률간의 차이를 나타내는 ARIC value는 평균 17.4±16.2%이었다 (Table 2). ARIC value와 수정률간의 상관 관계는 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 유의한 상관 관계를 보이지 않았다 ($r^2=0.044$, $p=0.268$). 뿐만 아니라 ARIC value와 전체 배아중 I, II 등급 (grade I, II)의 질 좋은 배아의 비율 사이에도 유의한 상관 관계는 나타나지 않았다 ($r^2=0.047$, $p=0.261$, Fig. 3). 또한, 수정에 실패한 1례의 경우도 ARIC value는 5.1%로 정상적으로 수정되었던 다른 환자들과 차이를 보이지 않았다.

고 찰

전체 불임증의 약 40% 정도는 전적으로 또는

부분적으로 남성측 원인, 즉 남성인자 불임이 그 원인이 된다. 따라서 불임증의 진단과 치료에 있어 인간 정자의 생식 능력을 충분히 반영하여 줄 수 있는 임상 검사법은 불임 원인인자의 규명과 향후 치료 방향의 설정 및 예후의 판정에 있어 절대적으로 중요하다 하겠다. 최근 미세보조수정술 (microassisted fertilization, MAF)의 발달에 힘입어 남성인자 불임에 관한 관심이 증가하면서 그 치료 분야도 확대되고 그 성공률도 지대한 발전을 거듭하고 있으나, 아직도 WHO (1992)의 기준에 의한 일반화된 정액검사가 남성인자 불임을 가려내는 방법으로 보편화되어 있다. 그러나, 이와 같은 일반적인 정액검사만으로는 정자의 수정 능력을 정확히 반영하지 못하는 것으로 알려져 있다 (Cockett *et al.*, 1975; Dunphy *et al.*, 1989). 즉, 비정상적인 정액검사 결과를 보이는 남성의 일부분에서 자연적인 임신이 보고되는 경우도 있고, 드물게는 정상적인 정액검사 결과를 가진 남성이 불임증을 나타내는 수도 있다. 정자의 운동성이 전혀 없거나 무정자증 (azoospermia) 등과 같은 절대적인 이상이 나타나는 경우에는 일반적인 정액검사만으로 수정 능력을 예측할 수 있겠지만 이러한 절대적인 이상이 발견되는 경우는 상당히 드물다. 뿐만 아니라 일반적인 정액검사의 중심 항목인 농도와 운동성은 정자의 수정 능력을 결정하는 주요 결정인자가 아니라고 알려져 있고 (Liu & Baker, 1992), 각 평가 항목에 있어서의 객관적인 신뢰도 또한 낮은 것으로 보고되고 있다 (Jequier & Ukome, 1983). 따라서 보다 정확하게 정자의 수정 능력 등을 예측하기 위하여 여러 가지 검사 방법이 개발, 제시되어 왔다.

최근 이같은 문제점들을 해결하기 위하여 CASA, SPA, SMEUSC 등이 널리 사용되고 있으나 이와 같은 방법들도 모두 결정적인 단점을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. CASA의 경우 정자의 곡선운동속도 (curvilinear velocity, VCL)와 외측두전위의 측정 (amplitude of lateral head displacement, ALH)은 체외수정률을 예측하는데 있어 통상적인 정액검사에 비하여 다소 높은 민감도를 보이지만, 아직 이의 임상적 유용성에 대하여는 많은 의문이 제기되고 있다 (Davis and Katz, 1993). Yanagimachi 등 (1976)에 의하여 최초로 개발된 SPA는 검사 자체의 민감도와 음성 예측도가 낮고 위음성도는 높아 SPA 결과가 0%인 군에서도 임신율이 16%나 되었다는 보고도

있고 (Margalioth *et al.*, 1989), 검사 기법, 조건 및 결과치의 해석이 각 시행 기관에 따라 다르게 나타나며, 또한 그 검사 기간과 비용이 많이 소요된다는 단점이 있다. SMEUSC는 체외수정시의 예후 인자로서 매우 유용하며, 검사가 간편하고 경제적이라는 장점이 있는 것으로 보고되고 있으나 (Kruger *et al.*, 1986; 김정훈 등, 1994), 이 검사 역시 검사자에 따른 주관적 요인이 많이 작용하게 되어 객관성이 떨어지고, 검사 기관 사이에 아직까지 광범위하게 인정되는 정상 범위의 설정이 되어 있지 않은 실정이다. 따라서 연구 자료를 비교 분석함에 어려운 점이 있고, 각 기관마다 각기의 정상 기준치를 설정하여 사용하여야 한다는 단점이 있다. 실제로 정자의 수정 능력의 차이를 나타내는 정상 정자의 형태비에 있어 Kruger 등 (1986)은 기준치로 4.0%를 제시한 바 있으나, 국내의 연구 (김정훈 등, 1994)에서는 2.5%를 그 기준치로 보고하기도 하였다.

최근 정자의 ARIC 검사가 개발되어 정자의 수정 능력을 비교적 객관적으로 정확히 반영할 수 있는 검사로 제시되고 있다 (Cummins *et al.*, 1991; Fenichel *et al.*, 1991; Pampiglione *et al.*, 1993; Calvo *et al.*, 1994; Yovich *et al.*, 1994). 정자의 첨체 (acrosome)는 정자막에 부착된 소기관으로 모세포 형성동안 나타나며 첨체막 (acrosomal membrane)은 첨체외막과 첨체내막으로 구성되어 있다. 첨체반응은 첨체외막이 정자의 형질막 (plasma membrane)과 융합하면서 소포 (vesicle)에서 첨체 내의 내용물인 acrosin, hyaluronidase, 그리고 기타 hydrolytic enzyme 등이 세포 외로 유출되는 과정으로, 이 과정을 통하여 정자는 난자의 투명대 (zona pellucida)를 뚫고 난자 내로 들어갈 수 있게 된다. 따라서 첨체반응은 수정에 있어 필수적인 단계이며, 이 과정은 생리적으로는 여성의 생식기 내에서 일어나지만 체외에서 인위적으로 유도될 수도 있다. 첨체반응을 유도할 수 있는 생리적인 물질들로는 난구세포 (cumulus cell) (Stock *et al.*, 1989), 투명대 (Cross *et al.*, 1988), 난포액 (follicular fluid) (Tesarik, 1985) 등이 있으며, 화학적 물질로는 calcium ionophore (Tesarik, 1985) 등이 있다. 이러한 첨체반응은 수정에 있어서 필수적인 단계이므로 첨체반응을 인위적으로 유발하였을 때, 반응이 일어나는 정자의 수가 많을수록 정액의 상태가 양호한 것으로 생각할 수 있으며 따라서 수정률 및 임신율이 높을 것으로 추측해

볼 수 있다.

Calvo 등 (1994)은 난포액을 이용하여 정자의 침체반응을 유도한 후 침체반응 유발율과 체외 수정시의 수정률을 비교하였는데, 정액 상태가 불량할수록 침체반응을 일으킬 수 있는 정자의 수가 적으며, 정자의 침체반응 유발율이 낮을수록 수정률이 낮았다고 보고한 바 있다. 또한 이 검사는 통상적인 정액검사나 SMEUSC에 비하여 정자의 수정 능력을 더 잘 반영한다고 보고하였다. 이들은 침체반응 유발율이 5% 이상인 경우를 양성으로 설정하여, 정상 정액검사 소견을 보이는 환자들에 있어서도 ARIC 검사가 양성인 경우, 음성인 경우에 비하여 난자의 수정률이 2.5배 높았다고 하였다. 그러나 반면, 이 ARIC 검사의 양성 예측도와 특이도는 높으나, 민감도와 음성 예측도는 비교적 낮은 것으로 보고하였다. 이들의 연구에서는 침체반응을 유도하기 위하여 난포액이 사용되었는데, 난포액의 그 정도 관리(quality control)가 용이하지 않을 수 있으므로 본 연구에서는 난포액 대신 침체반응을 유도하기 위하여 calcium ionophore를 사용하였다. 본 연구에서와 마찬가지로 calcium ionophore를 이용하여 침체반응을 유발한 전향적 연구에서 Yovich 등 (1994)은 침체반응 유발검사는 난자의 수정률을 예측할 수 있는 유용한 검사라고 발표하였다. 이들의 연구에 의하면 침체반응 유발율의 기준을 10%로 하였을 때, 그 이하의 유발율을 보인 경우는 수정률이 떨어졌던 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 Pampiglione 등 (1993)도 이와 유사한 결과를 보고하였으나 그 기준치는 31.3%로 설정되었고 이 이하의 침체반응 유발율을 보였던 모든 환자는 수정에 실패하였다고 보고한 바 있다. 이와 같이 ARIC 검사는 정자의 수정 능력을 반영하는 민감하고 객관적인 검사일 것으로 추정되고 있으며 상기의 여러 연구에서 나타낸 바와 같이 침체반응이 유발된 정자의 백분율보다는 침체반응 유발율, 즉 대조군(자연적으로 침체반응이 일어난 경우)과 실험군(인위적으로 침체반응이 유발된 경우)에서의 그 차이가 더 유의하게 수정률과 상관 관계가 있는 것으로 보고되고 있다(Cummins *et al.*, 1991; Fenichel *et al.*, 1991). 국내에서도 침체반응률과 SPA의 상관 관계 및 생식력 평가에 관한 예측 등에 대하여 보고되어 ARIC 검사의 유용성을 제시한 바 있다(문신용 등, 1995).

본 연구에서는 통상적인 정액검사에서는 정상

소견을 보이는 환자들에서 체외수정시술시의 실제 난자의 수정률을 예측함에 있어 ARIC 검사의 신뢰도를 알아보려고 하였으나 결과는 상기 여러 연구들과는 달리 ARIC value와 수정률에는 유의한 상관 관계가 없는 것으로 나타났으며 I, II 등급의 배아의 비율과도 유의한 상관 관계는 발견되지 않아, 수정된 이후의 난황이나 임신의 예측에 있어서도 판정에 유의한 영향을 주지 못하고 있는 것으로 나타났다. 즉 ARIC 검사는 통상적인 정액검사의 위양성과 민감도를 보완하기에는 다소 부족한 것으로 생각된다. 뿐만 아니라 ARIC 검사시 정자의 처리후 비교적 좋은 정자만이 검사에 선택될 수 있다는 객관성의 문제로 비롯되는 오류 때문에 해당 남성 정자에 대한 기능 평가가 정확하지 않을 수 있다는 점도 간과할 수 없다. 물론 대상군의 수가 적어 결론적으로 확정지어 이야기할 수 있는 단계는 아니며, 더 많은 수의 체계적인 전향적 연구가 뒷받침되어야 ARIC 검사의 유용성에 대한 결론에 도달할 수 있으리라 사료된다. 과거에는 이러한 ARIC 검사를 체외수정시술을 비롯한 보조생식술을 시행받을 모든 환자들에서, 특히 남성인자가 의심되는 경우 미리 이 검사를 시행함으로써 침체반응 유발율이 낮은 환자들에 있어서는 체외수정시술시 수정의 실패를 미리 예견하고 체외수정시술 이전에 내과적 치료를 해당 남성에게 시행해 보거나, 몇몇 연구에서처럼 정자의 처리 시에 pentoxifylline과 같은 정자 기능항진제를 첨가하여 치료해 보거나(Cummins *et al.*, 1991; Yovich *et al.*, 1994), 또는 체외수정시술시에 난자세포질내 정자 주입술(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)을 이용한 미세보조수정술 등을 시도해 봄으로써 수정률을 개선시키고 나아가 임신율의 향상을 도모할 수 있을 것으로 기대하였으나 최근 미세보조수정술, 특히 ICSI의 획기적인 발달에 힘입어 체외수정시술시 일반적인 방법으로 수정에 실패한 환자들을 다음 날 ICSI를 시행하여 괄목할만한 수정률과 임신의 성공을 보고하고 있으므로(Mashiach *et al.*, 1993; Tucker *et al.*, 1993; Morton *et al.*, 1997) 사전에 미리 수정 실패를 예측하는 유용성에 대한 중요성이 점차 감소하고 있다. 물론 난자의 질은 채취 후 24 시간이 경과하면 퇴행성 변화가 나타날 수 있으며, 따라서 수정에 성공한 수정란 역시 그 질이 불량하게 되어(Tsirigotis *et al.*, 1995) 염색체 이상의 빈도

가 증가하게 되고, 또한 이미 수정 과정이 진행되고 있는 난자에 손상을 줄 수 있는 가능성도 내포하게 된다 (Hobart & Roberto, 1995). 그러나 착상전 유전진단 (preimplantation genetic diagnosis, PGD)의 발전에 따라 배아 이식전에 염색체 이상이 있는 배아를 가려내어 건강한 배아로만 이식을 하고 이에 따라 임신에 성공하는 예도 보고되고 있으므로 이 분야에 대한 보완점의 발달 또한 있으리라고 기대한다.

결론적으로 ARIC 검사는 적어도 통상적인 정액검사에서 정상 소견을 보이는 환자들에 있어서는 체외수정시술시 난자의 수정률 및 향후 체외수정시술의 결과를 예측함에 있어 큰 도움이 되지 못하리라 생각된다. 따라서 통상적인 정액검사상 문제가 발견되지 않는다면, 체외수정시술을 시작하기에 앞서 미리 ARIC 검사를 시행하는 것은 의미가 없는 것으로 보이며, 체외수정시술을 일차적으로 시행하고 수정에 실패한 난자가 발생하였을 때 ICSI와 같은 미세보조수정술을 시도하는 것이 바람직하리라고 사료된다.

결 론

1996년 3월부터 1997년 2월까지 불임증을 주소로 울산대학교 의과대학 서울중앙병원 산부인과 불임클리닉을 방문하고 불임검사를 시행한 결과 치유될 수 없는 난관 인자 등에 의한 불임으로 체외수정시술을 받은 환자들중 통상적인 정액검사에서는 정상 소견을 보이는 환자들을 대상으로 ARIC 검사를 시행하여 이 결과가 인간 난자의 체외수정시술시 수정률을 예측할 수 있는 지를 알아 보기 위하여 본 연구를 시작하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 총 30명의 환자에서 체외수정시술 및 ARIC 검사가 시행되었으며 수정에 실패한 경우는 1례에서 있었으나 20% 이하의 극히 저조한 수정률을 보이는 환자는 없었다.
2. 대상 환자들의 평균 연령은 32.8 ± 4.1 세이었고 배우자들의 평균 연령은 35.9 ± 4.7 세이었다. 평균 불임 기간은 68.7 ± 55.4 개월이었고 체외수정시술의 적응증은 각각 양측 난관 폐쇄에 의한 난관 인자가 19명, 만성 무배란을 보이는 배란 인자가 8명, 그리고 병기 I, II 자궁내막증이 3명이었다.
3. 정액 검사 소견상 평균 정액의 양은 3.3 ± 1.3

ml, 농도는 $108.2 \pm 109.2 \times 10^6$ /ml, 운동성 정자의 비율은 $73.9 \pm 20.3\%$, 그리고 정상 형태를 보이는 정자의 비율은 $56.2 \pm 21.4\%$ 이었다.

4. 과배란유도에 사용된 외인성 성선자극호르몬의 총 투여 용량은 36.5 ± 11.5 앰플이었고 총 투여 기간은 9.7 ± 1.5 일이었으며 채취된 난자의 평균 개수는 9.0 ± 4.4 개로 저반응군에 분류될만한 환자는 없었다. 한편, 수정에 이른 난자의 평균 개수는 7.6 ± 4.6 개로 그 평균 수정률은 $81.7 \pm 20.2\%$ 이었으며 이식이 시행된 배아의 평균 개수는 4.9 ± 1.3 개이었다.

5. ARIC 검사 결과 DMSO만으로 처리한 자발적인 침체반응률은 평균 $10.1 \pm 9.8\%$ 이었으며, A 23187 처리에 의하여 유발된 침체반응률은 평균 $27.4 \pm 18.1\%$ 로 나타났다. 동일 검체에서 유발된 침체반응률과 자발적 침체반응률간의 차이를 나타내는 ARIC value는 평균 $17.4 \pm 16.2\%$ 이었다.

6. ARIC value와 수정률 및 I, II 등급의 배아 비율 간에는 유의한 상관 관계를 보이지 않았다.

이상의 결과로 볼 때, ARIC 검사는 통상적인 정액검사상 정상 소견을 보이는 환자들에서는 체외수정시술시 난자의 수정률을 예측하는데에 큰 도움이 되지 못하리라 생각된다. 더욱이 최근의 미세보조수정술과 착상전 유전진단의 발달에 동반하여 체외수정시술을 시작하기에 앞서 사전에 모든 환자에게 ARIC 검사를 시행하는 것보다는 통상적인 정액검사 소견이 정상이라면 체외수정시술을 일차적으로 시행하고 수정에 실패한 난자가 발생하였을 때 ICSI와 같은 미세보조수정술을 시도하는 것이 바람직하리라고 사료된다.

인 용 문 헌

- Bedford JM: Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol Reprod* 1983, 28, 108-120.
- Bell H, Garcia RB: ICSI of unfertilized oocytes after IVF insemination: are the traditional markers of fertilization adequate? *Hum Reprod* 1995, 10, 491-493.
- Calvo L, Dennison-Lagos LD, Banks SM, Sherins RJ: Characterization and frequency distribution of sperm acrosome reaction among normal and infertile men. *Hum Reprod* 1994, 9(10), 1875-1879.

- Cockett AT, Netto IC, Dougherty KA, Urry RL: Semen analysis: a review of samples from 225 men seen at an infertility clinic. *J Urol* 1975, 114, 560-563.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW: Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. *Biol Reprod* 1988, 38, 235-244.
- Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, Hartman PE: A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters. *J Androl* 1991, 12, 98-103.
- Davis RO, Katz DF: Computer-aided sperm analysis: technology at a crossroads. *Fertil Steril* 1993, 59, 953-955.
- Dunphy B, Neal LM, Cooke ID: The clinical value of conventional semen analysis. *Fertil Steril* 1989, 51, 324-329.
- Fenichel P, Donzeau M, Farahifar D, Basteris B, Ayraud N, Hsi BL: Dynamics of human sperm acrosome reaction. *Fertil Steril* 1991, 55, 994-999.
- Henkel R, Muller C, Miska W, Gips H, Schill WB: Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1993, 8, 2128-2132.
- Jequier AM, Ukome EB: Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. *Br J Urol* 1983, 55, 434-436.
- Jones HW Jr, Acosta AA, Garcia JE, Sandow BA, Veeck L: On the transfer of conceptus from oocytes fertilized in vitro. *Fertil Steril* 1983, 39, 241-243.
- 김정훈, 문신용, 장윤석: 체외수정시의 예후인자로서 정자형태의 정밀분석과 햄스티난자침투분석법의 비교연구. 대한산부회지 1994, 37(9), 1772-1791.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, Van Zyl JA, Smith K: Sperm morphological features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986, 46, 1118-1123.
- Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z: Day 3 estradiol serum concentration as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995, 64, 991-994.
- Liu DY, Baker HW: Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil Steril* 1992, 58, 465-483.
- Margalioth EJ, Feinmesser M, Navot D, Mordel N, Bronson RA: The long-term predictive value of the zona-free hamster ova sperm penetration assay. *Fertil Steril* 1989, 52, 490-494.
- Mashiach S, Bider D, Ben-Shlomo I, Dor J: Micro-assisted reproduction: is it the treatment of choice after fertilization failure. In: Fishel S, Symonds EM, eds. Gamete and embryo micromanipulation in human reproduction. London: Edward Arnold, 1993. p133-140.
- Molloy D, Martin M, Speirs A, Lopata A, Clarke G, McBain J, Ngu A, Johnston IH: Performance of patients with a "frozen pelvis" in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1987, 47, 450-455.
- 문신용, 류범용, 오선경, 서창석, 김석현, 최영민, 신창재, 김정구, 장윤석, 이진용: 인간 정자의 생식력 평가에 있어 첨체반응률과 햄스티난자 침투 분석법의 비교연구. 대한불임회지 1995, 22(2), 131-141.
- Morton PC, Wright G, Yoder CS, Brockman WDW, Tucker MJ, Kort HI: Reinsemination by intracytoplasmic sperm injection of 1-day-old oocytes after complete conventional fertilization failure. *Fertil Steril* 1997, 68, 488-491.
- Muasher SJ, Oehninger S, Simonetti S, Matta J, Ellis LM, Liu HC, Jones GS, Rosenwaks Z: The value of basal and/or stimulated serum gonadotropin levels in prediction of stimulation response and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1988, 50, 298-307.
- Neveu S, Hedon B, Bringer J, Chinchole JM, Arnal F, Humeau C, Cristol P, Viala JL: Ovarian stimulation by a combination of a gonadotropin-releasing hormone agonist and gonadotropins for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1987, 47, 639-643.
- Pampiglione JS, Tan SL, Campbell S: The use of the stimulated acrosome reaction test as a test of fertilizing ability in human spermatozoa. *Fer-*

- til Steril* 1993, 59(6), 1280-1284.
- Scott RT Jr, Toner JP, Muasher SJ, Oehninger S, Robinson S, Rosenwaks Z: Follicle stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1989, 51, 651-654.
- Stock CE, Bates R, Lindsay KS, Edmonds DK, Fraser LR: Human oocyte-cumulus complexes stimulate the human acrosome reaction. *J Reprod Fertil* 1989, 86, 723-730.
- Tan SL, Kingsland C, Campbell S, Mills C, Bradfield J, Alexander N, Yovich J, Jacobs HS: The long protocol of administration of gonadotropin-releasing hormone agonist is superior to the short protocol for ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1992, 57, 810-814.
- Tan SL, Maconochie N, Doyle P, Campbell S, Balen A, Bekir J, Brinsden P, Edwards RG, Jacobs HS: Cumulative conception and live birth rates after in vitro fertilization with and without the use of the long, short and ultrashort regimens of the gonadotropin-releasing hormone agonist buserelin. *Am J Obstet Gynecol* 1994, 171, 513-520.
- 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, 383-388.
- Tsirigotis M, Nicholson N, Taranissi M, Bennett V, Pelekanos M, Craft I: Late intracytoplasmic sperm injection in unexpected failed fertilization in vitro: diagnostic or therapeutic? *Fertil Steril* 1995, 63, 816-819.
- Tucker M, Wiker S, Massey J: Rational approach to assisted fertilization. *Hum Reprod* 1993, 8, 1778.
- 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, 471-476.
- Yovich JM, Edirisinghe WR, Yovich JL: Use of the acrosome reaction to ionophore challenge test in managing patients in an assisted reproduction program: a prospective, double-blind, randomized controlled study. *Fertil Steril* 1994, 61, 902-910.
- Wood C, McMaster R, Rennie G, Trounson A, Leeton J: Factors influencing pregnancy rates following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1985, 43, 245-250.
- World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.