

## 소 항정자항체가 소 정자의 수태능력에 미치는 영향

김계성 · 노상호\* · 이강남\* · 이병천\* · 황우석\*

미국 펜실베이니아대학교 메디칼센터 번식생물학부  
서울대학교 수의과대학\*  
(1997년 11월 20일 접수)

### Effects of bovine antisperm antibodies on fertilizing capacity of bovine spermatozoa

Kye-seong Kim, Sang-ho Roh\* , Kang-nam Lee\* , Byeong-chun Lee\* , Woo-suk Hwang\*

University of Pennsylvania Medical Center, Division of Reproductive Biology, PA 19104-6080, USA  
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea\*

(Received Nov 20, 1997)

**Abstract** : This study was directed at inducing the production of antibodies by immunizing heifers with bovine sperm antigen and on measuring the serum antibodies using indirect immunofluorescence assay(IFA) and agglutination test. The effect of antisperm antibodies on fertilizing capacity of bovine spermatozoa was evaluated.

1. Three heifers between 12- and 15- month old were immunized with bovine spermatozoa or phosphate-buffered saline. In heifers immunized with bovine spermatozoa serum IgG level was highest between 3 weeks and 5 weeks postimmunization detected by IFA. The antibody levels persisted through week 7 and slowly declined until week 20 and then antisperm antibodies were localized on spermatozoa. The fluorescent antisperm antibodies were detected at 2~20 weeks and at 6~9 weeks postinoculation on acrosome and tail, respectively. Among 21 sera from repeat breeder cows, only one cow has shown positive antisperm antibody response detected by IFA.

2. In spite of vital rate of bovine sperm after swim-up was not significantly affected by different concentration of antisperm antibodies in sera, the numbers of bovine sperm after swim-up were significantly reduced in proportion to the increased concentration of antibodies. Above 1/512 dilution of antibody neither influence on vital rate and numbers of bovine sperm nor sperm agglutination after swim-up. The study has also shown that the vital rate and number of sperm after swim-up and capacitation were also significantly reduced by the addition of antisperm antibodies. Although antisperm antibodies did not influence on the acrosome reaction rate of sperm during swim-up, did significantly reduce the sperm acrosome reaction rate after capacitation.

The studies have resulted that the bovine antisperm antibodies can prevent the sperm motility by agglutination and block the capacitation and acrosome reaction of bovine sperm.

**Key words** : antisperm antibody, bovine spermatozoa, vitality, motility, acrosome reaction.

## 서 론

불임의 원인이 될 수 있는 항정자항체(antisperm antibody)에 관한 최초보고는 Isojima<sup>1</sup>에 의하면 Landsteiner가 1899년에 소 정자를 기니피에 주사한 후 정자의 운동능력을 저하시키는 독소를 확인한 것이었다. 사람과 동물에서 자성생식도관은 사정된 정자에 대해서 면역반응을 일으킬 수 있으며<sup>2</sup> 이때 생성된 항정자항체는 불임을 유발한다는 주장이 제기되어 왔다<sup>3</sup>.

사람에서 항정자항체에 관한 연구로 Franklin과 Dukess<sup>4</sup>는 정자응집항체(sperm agglutinating antibody)의 존재로 인한 여성의 불임을 보고하였으며, Isojima *et al*<sup>5</sup>은 정자응집항체보다는 정자부동화항체(sperm immobilizing antibody)가 불임의 원인이라고 하였다. 또한 여성은 일생동안 정자에 노출될 기회가 많기 때문에 항정자항체의 생성가능성이 높다고 하였다<sup>6</sup>. 실제로 부부의 10~20% 정도가 불임으로 밝혀졌으며, 그중 상당수가 면역학적 원인에 의한 것이라고 하였고<sup>7</sup>, 이를 응용하여 면역학적 피임과 관련된 연구도 수행된 바 있다<sup>8</sup>.

동물에서 항정자항체에 관한 연구로서 말에 있어 번식과 항정자항체의 관련성에 관한 보고가 있었으며<sup>9</sup>, Fayemi *et al*<sup>10</sup>은 돼지에서 실험적으로 정자를 접종하여 항정자항체의 생성과 경시적 추이를 관찰하였다. Kiddy *et al*<sup>11</sup>은 소에서 정맥 내로 정액을 반복투여하였을 때 번식기능에는 영향을 미치지 않았으나 면역반응은 발생하였다고 하였다. 항정자항체가 포함된 혈청에서 배양한 정자로 인공수정을 시켰을 때 수정실패와 조기태아사가 일어났으며<sup>12</sup>, 정자응집항체가 높을 때 수태율의 저하<sup>13</sup> 및 조기태아사가 다발하였다고 하였다<sup>14</sup>. 수소에서 자가면역에 의해 암소에서는 정자에 노출됨에 의해 항정자항체가 생성되어 불임이 유발될 수 있다고 하였다<sup>2</sup>. 항정자항체와 저수태우의 관련성도 제시된 바 있

다<sup>15</sup>. 항정자항체의 생성기전에 관해 Marshburn과 Kutteh<sup>3</sup>는 자성생식도관에 주입된 정액이 흡수되어 면역원으로 작용함으로써 생성되는 것이라고 하였다. 즉, 미혼 여성에서는 검출되지 않던 정자응집항체가 기혼여성에서 검출된다는 사실은 정액과의 접촉이 응집항체 생성에 직접적인 원인을 시사하는 것이다<sup>5</sup>. 또한 Isojima<sup>1</sup>는 Bratanov의 보고를 인용하여 토끼와 암소에서 생식도관에 상처가 있거나 자궁내막염 또는 자궁의 출혈 등 비정상상태일 때 항정자항체의 생성이 용이하다고 하였다. 사람에서도 생식도관 내에 감염이 있을 때 항정자항체 발생률이 높아진다는 보고가 있으며<sup>16</sup>, 생식도관, 복강 및 소화기관 내의 상피세포에 손상이 있을 때 정자에 노출되면 항정자항체가 생성된다고 하였다<sup>3</sup>. 항정자항체의 실험적 생성방법으로는 정자를 자궁내 주입하는 것보다 adjuvant와 혼합하여 피하로 주사하는 것이 더 효과적이었다고 하였으며<sup>17</sup>, 이는 정상적인 질과 자궁내에서 정자가 흡수되지 못하고 탐식되기 때문이라고 하였다<sup>18</sup>.

항정자항체의 불임에 대한 작용기전은 운동성 저하, 보체의존적인 정자의 사멸, 자궁경관 통과 방해, 수정능 획득과 침체반응 억제, 정자침체에서의 효소분비 억제, 정자의 투명대부착 방해 및 투명대침입 억제 등이라고 하였다<sup>3</sup>. 한편 사람의 체외수정시에 항정자항체혈청을 첨가하면 수정을 방해하고<sup>19</sup>, 수정란의 분할율을 저하시키며<sup>20</sup>, 수정과 조기태아발육에 악영향을 미친다는 보고도 있다<sup>21</sup>.

항정자항체의 검사방법으로는 sperm agglutination test<sup>4</sup>, sperm immobilization test<sup>5</sup>, enzyme linked immunosorbent assay(이하 ELISA로 약함)<sup>22</sup>, radiolabeled antiglobulin assay<sup>23</sup>, immunobead test<sup>24</sup> 및 indirect immunofluorescence assay(이하 IFA로 약함)<sup>8</sup> 등이 있는데 각 검사법마다 장단점이 있기 때문에 한가지 검사만으로 항체의 존재와 불임의 관계를 판정하기는 어렵다고 하였다<sup>25</sup>. Mandelbaum *et al*<sup>7</sup>은 agglutination test는 특이성이 떨어지기는

하지만 적용범위가 넓은 유용한 방법이라고 하였으며, IFA는 감도가 우수하고 항정자항체의 정자부착부위를 알 수 있는 좋은 방법이라고 하였다.

사람에서는 불임의 원인으로 면역학적 요인에 대한 관심이 높아져 있는데 반하여 동물에서는 발생가능성과 중요성이 간과되어 왔기 때문에 항정자항체에 관한 연구가 미미한 실정이다. 본 실험에서는 소에서 항정자항체와 불임의 관련성을 규명하고자, 소 정자를 피하접종한 후 말초혈액을 채취하여 혈청을 분리하고 IFA로 항정자항체의 생성, 항체가 가의 경시적 추이 및 항체의 정자부착부위 등을 조사하였으며, 항정자항체가 소 정자의 생존성, 운동성 및 침체반응 등에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 항정자항체의 생산 :

1) 실험동물 : 임상적으로 건강하다고 판정된 생후 13~15개월령, 체중 150~200kg의 홀스타인 처녀우 3두를 실험동물로 공여하였다. 실험동물의 사육은 조사료, 농후사료 및 물을 자유급식시켰으며 일반적인 사양관리에 준하여 사육하였다.

2) 정자항원 : 정자항원은 5두의 종모우 유래 동결정액(0.5ml/straw)으로 제조하였다. 동결정액은 37℃ 수조에 30초간 침지하여 용해한 후 15ml 원심분리관(Becton Dickinson Labware, USA)에서 혼합하고 원심분리(800g, 10분)하여 상층액을 제거하고 phosphate buffered saline(Life Technologies, Inc., USA, 이하 PBS로 약함. 0.01M, pH 7.2)으로 3회 원심세정하였다. 정자는 세정후  $1 \times 10^8$  sperm cells/ml 농도로 재부유시켰다. 정자의 항원성을 증가시키기 위하여 LN<sub>2</sub>에 침지하여 동결한 후 용해하는 과정을 20회 반복하여 정자를 깨뜨렸으며, 현미경하에서( $\times 400$ ) 깨진 상태를 확인하였다. 준비된 정자항원은 접종전까지 -20℃에서 동결보존하였다.

3) 정자항원의 접종 : 접종군의 1차접종은 4ml의 정자항원과 동량의 Freund's complete adjuvant(Life Technologies, Inc., USA)를, 2차접종은 1차접종 2주 후에 동일한 방법으로 Freund's incomplete adjuvants(Life Technologies, Inc., USA)를 혼합하여 주사하였다. 접종은 소의 경부를 소독한 후 총량 8ml를 0.5ml씩 16개 부위에 나누어 피하 주사하였다. 대조군은 접종군과 동일한 방법으로 처치

하되, 정자항원 대신 PBS를 혼합하여 주사하였다.

4) 혈청시료 : 혈액은 접종 1주 전부터 10주까지는 매주 1회씩 그리고 13주, 16주 및 20주에 각각 채취하였고, 혈청을 분리하여, 56℃ 수조에서 30분간 비동화시킨 후 -20℃에서 동결보존하였다.

### 항정자항체의 검출 :

1) 정자의 처리 : 정액은 5두의 종모우 유래 동결정액을 37℃ 수조에 30초간 침지하여 용해한 후 PBS로 3회 원심세정하고  $1 \times 10^7$  sperm cells/ml로 재부유시켰다.

2) Indirect immunofluorescence assay(IFA) : IFA는 Coonrod *et al*<sup>8</sup>의 방법에 준하여 정자부유액을 slide glass에 도말하고 공기 중에서 건조시킨 후 methanol에서 30분간 고정시켰다. 도말 slide glass에 5% bovine serum albumin(Sigma Chemical Co., USA, 이하 BSA로 약함)이 첨가된 PBS를 도포하고 실온에서 45분간 배양하였으며, 실험에 따라 필요배율로 희석한 혈청을 slide glass 위에 도포한 후 습도가 유지되는 5℃의 배양기 내에서 하룻밤 배양하였고, 1:50으로 희석한 FITC-conjugated bovine IgG(Sigma Chemical Co., USA)를 도포하여 실온에서 2시간 배양하였다. Slide glass는 PBS로 세정하고 건조시킨 후 10% glycerol(Sigma Chemical Co., USA)을 함유한 PBS를 도포하고 cover slip하여 형광현미경하에서 검경하였다( $\times 100$ ,  $\times 400$ ). 항정자항체판정의 기준은 정자두부나 두부 및 미부 모두에 형광반응을 보이는 정자가 전체의 50% 이상인 것을 양성으로 하였다.

### 정자의 운동성 검사 및 수정능획득 :

1) 배양액 : 정자의 원심세정, swim-up 및 수정능획득에는 modified Tyrode's 배양액을 사용하였으며, Fukui<sup>26</sup>의 방법에 준하여 제조하였다. 이 배양액을 기본으로 하여 실험군에 따라 BSA 대신 처녀우혈청이나 항정자항체혈청을 10% 농도로 첨가하여 준비하였으며, 사용 전날 공기 및 습도가 포화상태인 39℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 하룻밤 가스평형 후 사용하였다.

2) 정자의 swim-up과 수정능획득 : 정자는 Parrish *et al*<sup>27</sup>의 방법에 준하여 다음과 같이 처리하였다. 정액은 5두의 종모우로부터 채취한 동결정액을 37℃ 수조에 30초간 침지하여 용해한 후 15ml 원심관에 모아 혼합하였다. 용해한 정자의 운동성을 확인한 후 Pasteur pipette를 이용하여 1ml의 수정능획득용 Tyrode's 배양액(pH 7.4)이 들어있는 9~11개의 round bottom tube(Becton Dickinson Labware, USA) 저부에 0.2ml의 정액을 천천히 분주하고,

공기 및 습도가 포화상태인 39℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에 1시간동안 정지시켜 swim-up 처리하였다. 시험관으로부터 0.8ml의 상층액을 흡입하여 15ml의 원심관에 모아 2회 원심제정하였으며(500g, 5분), 혈구계산판으로 정자수를 산정하여 농도가 5×10<sup>7</sup> sperm cells/ml가 되도록 재부유시켰다. 정자의 수정능 획득과 침체반응은 동량의 200µg/ml heparin(Sigma Chemical Co., USA) 용액을 첨가(최종 heparin 농도는 100µg/ml)한 후 공기 및 습도가 포화상태인 39℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 5시간 배양하여 유도하였다.

실험 1: 대조군과 정자항원접종군의 접종 1주 전부터 제20주까지의 혈청을 대상으로 2-fold serial dilution을 실시(1/2부터 1/2048까지)한 후 IFA로 항체를 측정하였다.

실험 2: 대조군과 정자항원접종군의 접종 1주 전부터 제20주까지의 혈청을 1/50으로 희석한 후 각각에 대해 IFA로 항체부착부위를 조사하였다.

실험 3: 공태기간이 6개월 이상이거나 5회 이상 인공수정을 실시하여도 수태되지 않는 암소들의 혈청을 채취하여 IFA로 항정자항체 생성여부를 검사하였다.

실험 4: 희석농도별 항정자항체혈청이 정자에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대조군(치너우혈청 첨가)과 항정자항체혈청(접종후 4주 혈청)을 2-fold serial dilution으로 희석한 군(1/2부터 1/2048까지)에서 각각 정자의 swim-up을 실시하였다. 각각의 상층액을 회수하여 정자수 및 생존율을 조사하였으며, 남은 정자부유액의 응집정도를 현미경하에서 조사하였다.

실험 5: 항정자항체가 정자의 생존성, 운동성 및 침체반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대조군(BSA 첨가군; 6µg/ml, 치너우혈청첨가군; 10%)과 항정자항체혈

청첨가군(접종후 4주 혈청; 10%)으로 나누어 실험하였다. 각 군별로 swim-up 후의 정자수, 생존율 및 침체반응률을 조사하고, 수정능 획득 5시간 후의 생존율 및 침체반응률을 조사하였다.

통계학적 분석: 실험결과치는 Chi-square test로 각 군간의 유의성을 검정하였다.

## 결 과

항체가 경시적 추이: 정자항원을 치너우 2두에 접종한 전후의 항체를 알아보기 위하여 IFA로 검사한 결과, 대조군에서는 실험 전기간을 통하여 항체를 관찰할 수 없었으며 접종군 2두(Heifer 1과 Heifer 2)는 실험 전기간을 통하여 유사한 양상을 보였다. 즉, 정자항원접종전(Week 0)의 혈청에서는 항체를 관찰할 수 없었으나, 항체가 접종후 1~2주에 증가하였으며(1/32-1/256), 이후 급격히 증가하여 4주에는 정점을 이루었다(1/2048). 이후 항체는 점차 감소하는 양상을 보였으며, 20주의 항체는 1/64였다.

항정자항체의 정자부착부위: 항정자항체의 정자부착여부와 부위의 변화를 알아보기 위하여 각 주차별 혈청의 희석농도를 1/50으로 하고 IFA로 검사한 결과는 Table 1과 같았다. 접종군 2두 모두에서 유사한 결과를 나타내었고, 접종전과 1주후에서는 부착항체를 발견할 수 없었으며, 5주까지의 혈청에서는 두부의 침체부위에서만, 6~9주 사이의 혈청에서는 두부와 미부 모두에서 부착항체를 관찰할 수 있었다. 제10주 이후에는 접종군 2두 모두에서 두부에 부착하는 항체가 관찰되었으며, 시간이 경과할수록 약해지는 경향을 보였다. 접종군의 1두에서는 (Heifer 1) 16주에 미부 부착항체를 관찰할 수 있었다.

Table 1. The binding sites of antisperm antibodies on bovine spermatozoa postinoculation

Heifer number	Trials	Postinoculation(week)													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	16	20
1	1	-	-	-	H*	H	H	HT**	HT	HT	HT	H	H	HT	H
	2	-	-	H	H	H	H	HT	HT	HT	H	H	H	HT	-
	3	-	-	H	H	H	H	HT	HT	HT	HT	H	H	H	H
2	1	-	-	-	H	H	H	HT	HT	H	H	H	H	H	H
	2	-	-	-	H	H	H	H	HT	HT	H	H	H	H	H
	3	-	-	-	H	H	H	HT	HT	H	H	H	H	H	H

\*H: Antisperm antibodies bind to head of spermatozoa.

\*\*T: Antisperm antibodies bind to tail of spermatozoa.

저수태우에서 항정자항체의 검출 : 공태기간이 6개월 이상이거나 5회 이상 인공수정을 실시하여도 수태되지 않는 저수태우 21두(홀스타인)를 대상으로 혈액을 채취하고 혈청을 분리한 후 IFA로 검사한 결과, 1두에서 항정자항체를 발견하였으며(항체가 1/512), 부착부위는 침체부위였다. 항체가 검출된 암소의 병력은 4산차, 공태기간 12개월, 공태기간중 인공수정 실시 11회, 자궁축농증의 재발 및 난소낭종 등이었으며, 나머지 20두의 저수태우보다 공태기간이 길고 인공수정횟수 및 생식기 질병 재발이 많았다.

항정자항체혈청의 회석농도에 따른 정자수, 생존성 및 응집반응 : 회석농도별 항정자항체혈청이 정자 생존성, 운동성 및 응집반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대조군(처녀우혈청첨가)과 항정자항체혈청회석군 1/2부터 1/2048)으로 나누어 실험한 결과는 Table 2와 같았다. 혈청의 회석농도에 따른 swim-up 후의 정자수는 1/2~1/16군, 1/32~1/256군 및 1/512~1/2048, 대조군 간에 유의차가 각각 인정되었으나( $p < 0.05$ ) 정자의 생존율은 대조군을 포함하는 전군에서 유의차가 인정되지 않았다. 대조군에 비하여 1/2~1/16군은 10% 전후, 1/32~1/256군은

50% 전후의 정자가 회수되었으며, 대조군과 1/512~1/2048군 간에는 유의차가 인정되지 않았다. 혈청의 회석농도에 따라 1/64까지는 50% 이상, 1/128과 1/256군에서는 10~50%의 정자가 응집하였으며, 1/512 이상 회석시킨 실험군에서는 응집반응이 관찰되지 않았다. 응집반응의 양상은 head-to-head였으며 응집된 상태에서도 미부의 약한 운동을 관찰할 수 있었다.

항정자항체가 정자의 운동성, 생존성 및 침체반응에 미치는 영향 : 항정자항체가 swim-up, 수능획득 및 침체반응과정에서 정자에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대조군(BSA첨가군, 처녀우혈청첨가군)과 항정자항체혈청첨가군(접종후 4주)으로 나누어 실험을 실시한 결과는 Table 3과 같았다. BSA 첨가군, 처녀우혈청첨가군 및 항정자항체혈청첨가군의 swim-up 후의 정자수는 각각  $7.7 \times 10^6 \pm 0.6 \times 10^6$ ,  $7.7 \times 10^6 \pm 0.9 \times 10^6$  및  $1.8 \times 10^6 \pm 0.2 \times 10^6$  sperm cells/ml였으며, 항정자항체혈청첨가군에서 대조군에 비하여 유의적으로 적은 수의 정자가 회수되었다( $p < 0.05$ ). BSA 첨가군, 처녀우혈청첨가군 및 항정자항체혈청첨가군의 swim-up 후의 생존율은 각각 87.2, 84.0 및 72.5%였으며, 항정자항체혈청첨가군에서 대조군에

Table 2. Post swim-up bovine sperin numbers, vitality an agglutination activities at different concentrations of antisperm antibodies

	Dilution of antisperm antibodies											
	Control	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
No. of sperm	203.6 $\pm 7.1^a$	17.3 $\pm 11.7^b$	23.3 $\pm 4.7^b$	27.3 $\pm 4.5^b$	36.3 $\pm 4.7^b$	70.3 $\pm 4.7^c$	85.3 $\pm 6.5^c$	98.0 $\pm 3.0^c$	101.0 $\pm 2.6^c$	134.0 $\pm 25.1^a$	164.0 $\pm 8.5^a$	190.0 $\pm 5.6^a$
Vital rate(%)	89.0 $\pm 3.6$	74.7 $\pm 2.5$	73.0 $\pm 2.7$	75.0 $\pm 1.0$	71.0 $\pm 6.6$	72.3 $\pm 5.1$	75.3 $\pm 4.2$	77.7 $\pm 5.1$	81.3 $\pm 6.4$	84.3 $\pm 3.1$	81.7 $\pm 1.5$	87.7 $\pm 2.5$
Agglutination activity	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-

<sup>abc</sup>Mean  $\pm$  SD in same row with different superscripts differ significantly( $p < 0.05$ ).

Table 3. Effects of addition of antisperm antibodies on bovine sperm numbers, vitality and acrosome reaction after swim-up and capacitation

	Bovine serum albumin(6 $\mu$ g/ml)	Heifer serum(10%)	Antisperm antibodies(10%)
No. of sperm( $\times 10^6$ ) after swim-up	7.7 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	7.7 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	1.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
Sperm vital rate(%)	after swim-up	87.2 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	84.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
	after 5h capacitation	75.3 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	76.2 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
Acrosome reaction	after swim-up	7.5 $\pm$ 1.5	9.3 $\pm$ 2.0
	after 5h capacitation	92.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	87.8 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>

<sup>ab</sup>Means  $\pm$  SD in same row with different superscripts differ significantly( $p < 0.05$ ).

비하여 유의적으로 낮았다( $p < 0.05$ ). 각 군의 수정능 획득 5시간 후의 생존율은 각각 75.3, 76.2 및 32.2%였으며, 항정자항체혈청첨가군에서 대조군에 비하여 유의적으로 낮았다( $p < 0.05$ ). 한편 대조군과 접종군에서 각각 수정능 획득 5시간 후의 생존율은 swim-up 후보다 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). BSA 첨가군, 처녀우혈청첨가군 및 항정자항체혈청첨가군의 swim-up 후의 침체반응률은 각각 7.5, 9.3 및 11.0%였으며, 각 군 간의 유의차는 인정되지 않았다. 각 군의 수정능 획득 5시간 후의 침체반응율은 각각 92.8, 87.8 및 62.8%였으며, 항정자항체혈청첨가군에서 대조군에 비하여 유의적으로 낮았다( $p < 0.05$ ).

## 고 찰

항체가 경시적 추이 : Menge<sup>14</sup> 및 Lander *et al*<sup>18</sup>은 소에서 정자항원접종 21일째에 항정자항체의 생성을 확인하였다고 하였으며, 본 실험에서도 같은 기간에 높은 항체생성을 보였다. 소에서 정자항원을 접종한 후 항체가의 경시적 추이를 조사한 문헌은 접하지 못했으나 Lee *et al*<sup>9</sup>은 말에서 정자항원 접종후 항정자항체생성의 경시적 추이를 검사해본 결과, 접종 1주후부터 항체생성이 급증하여 6주까지 지속되다 점차 감소하였다고 하였다. Fayemi *et al*<sup>10</sup>은 돼지에서 정자항원을 0, 2와 15주에 접종한 후 항체가는 2주부터 증가하여 7-8주까지 유지하다 감소하였으며, 16주에 다시 급증하여 22주까지 정점을 유지하다 감소하였다고 하였다. 본 실험의 결과에서도 항정자항체생성은 접종 1-2주 후부터 급증하여 4주에 정점을 이루고 7주까지 높은 수준을 유지하다 20주까지 점차 감소하는 경향을 보였으며, 동물종이 달라 직접적인 비교는 어려우나 위 연구자들의 결과와 비슷한 추이를 보였다. 또한 최고항체가는 Rosenthal *et al*<sup>28</sup>은 개에서 1/4096, Fayemi *et al*<sup>10</sup>은 돼지에서 1/1600까지라고 하였는데, 본 실험에서는 1/2048이었으며 접종법, 검출법 및 종에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다.

항정자항체의 정자부착부위 : 정자표면에 존재하는 항원으로부터 유래하는 항정자항체가 정자의 수태능력을 저하시키는 직접적인 원인이며<sup>29</sup>, 이러한 항정자항체를 검출할 수 있는 방법으로는 IFA와 immunobead test가 있다<sup>7</sup>. Hjort와 Hansen<sup>30</sup>은 원인불명의 불임여성에서 IFA로 높은 항체가를 검출하였으며, 부착위치는 다양하게 나타났다<sup>30</sup>고 하였다. Rosenthal *et al*<sup>28</sup>은 개에서, Lee *et al*<sup>9</sup>은

말에서 각각 IFA로 정자의 두부와 미부에 부착하는 항체를 확인하였으며, Zouari *et al*<sup>31</sup>은 사람에서 수정을 억제하는 항체는 정자두부에 부착하는 것이라고 하였다. 본 실험에서는 접종 전후의 각 주차별 혈청내 항정자항체의 정자 부착부위를 IFA로 조사해본 결과, 2~20주 사이에는 두부부착항체를 관찰할 수 있었으며 시간이 경과할수록 약해지는 경향을 보였고, 특히 6~9주 사이에는 미부부착항체도 확인할 수 있었다. 접종군의 1두에서는 16주째에도 미부부착항체를 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 보아 실험대상동물은 다르지만 항원접종후 두부와 미부에 부착하는 항체를 발견하였다는 다른 연구자들의 결과<sup>9, 28</sup>와 비슷한 양상을 보였다. 본 실험에서 미부부착항체(6-9주)는 두부부착항체(3-20주)보다 늦게 나타났다가 빨리 소실되는 경향을 보였으며 출현시기가 다른 것으로 보아 각각의 항체생성을 유도하는 항원이 다른 것으로 생각된다. Haas *et al*<sup>32</sup>은 IFA는 정자를 고정시키는 과정에서 정자내부항원이 노출될 수 있고 정자표면항원에 대한 항체외에 정자내부항원에 대응하는 항체가 부착할 수도 있으며 그에 따른 특이성의 저하가 초래될 수도 있다고 하였다. 본 실험에 사용한 정자항원은 소 정자를 깨뜨려 부유액을 접종한 것이므로 정자표면항원과 정자내부항원에 대한 항체가 모두 생성, 검출되었을 가능성이 있다. 따라서 소 정자의 두부 및 미부에 존재하는 항원에 대한 단클론성 항체를 생산하여 분자생물학적 기법을 이용한다면 소 정자항원별 성장과 기능을 알아낼 수 있을 것으로 생각된다.

저수태우에서 항정자항체 검출 : Menge<sup>13</sup>은 소에서 항정자항체로 인해 인공수정횟수의 증가와 조기태아사 등 수태능력의 저하가 나타났다고 하였으며, Wang과 Xie<sup>33</sup>는 항정자항체발생률이 가임우에서 4%인데 반하여 불임우에서는 36%였다고 하였다. 본 실험에서는 Roberts<sup>34</sup>의 기준에 따라 분류한 저수태우 21두를 대상으로 IFA로 항정자항체를 검사한 결과, 1두에서 항체발현을 확인하였다. 항체가 검출된 암소는 공태기간 12개월동안 인공수정을 11회 실시하였으며, 자궁축농증이 빈발하였다. 반복적인 정자주입이 항정자항체를 유발할 수 있다는 사람에서의 결과<sup>1</sup>와 생식도관 내에 질병이 있을 경우 항정자항체를 생성할 가능성이 높아진다는 보고<sup>3</sup>로 미루어 보아, 본 실험에서 항정자항체를 검출한 저수태우는 반복적 정자의 주입과 자궁내 질병의 존재가 항체형성의 원인이 된 것으로 추측된다. 나머지 20두의 저수태우에

서 항정자항체가 발견되지 않은 것은 정자에 대한 다양한 감수성 때문인 것으로 생각되며, 이유는 완전히 밝혀져 있지는 않지만 아마도 정액 내의 면역억제인자의 존재 또는 작용의 결핍과 관련이 있을 것이라고 하였다<sup>35</sup>. 부실로 인한 저수태우군에서 다양한 실험을 통해 항정자항체와 수태저하의 관련성을 분석하는 연구가 이루어진다면 보다 구체적인 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

**항정자항체혈청의 회석농도에 따른 정자수, 생존성 및 응집반응** : 사람<sup>36</sup>, 소<sup>37</sup> 및 돼지<sup>10</sup>에서 항정자항체는 정자의 생존성과 운동성을 저하시켜 수정을 방해한다고 알려져 있다. 본 실험에서 BSA 첨가군과 처너우혈청첨가군간에는 생존율과 회수된 정자수 등에서 유의차가 인정되지 않았고, 항정자항체혈청첨가군에서 혈청회석농도 1/256 이하에서는 대조군에 비하여 50% 이하의 정자가 회수되어 운동성 저하를 확인할 수 있었으며 이는 운동성에 관여하는 표면항원(forward motility protein)에 대한 항체가 정자에 결합하여 운동성을 저하시킨다는 보고<sup>36</sup>에 의해 원인을 추측할 수 있었다. 회석농도 1/512 이상에서는 대조군과 유의적인 차이가 인정되지 않았으며, 항체가 회석되어 정자의 운동성에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 항정자항체에 의한 정자의 응집반응이 수태능력을 억제한다는 보고<sup>4</sup> 이래로 여러 연구자에 의해 정자의 운동성과 응집반응에 관한 연구들이 수행되어 왔다<sup>23</sup>. 불임남성의 혈청<sup>38</sup>에서 높은 빈도의 응집항체를 발견할 수 있었으며, 재발성 유산을 보이는 여성들의 혈청에서도 정자응집항체를 검출할 수 있었다<sup>39</sup>. 본 실험에서는 정자의 swim-up 후 시험관의 저부를 검사해본 결과, 혈청회석농도 1/64까지는 50% 이상이 응집되었으며 형태는 head to head 였고 작게는 2~3개에서 많게는 수십개까지의 정자가 응집하였으며 1/512 이상에서는 관찰되지 않았다. 위 결과로 미루어 보아 항정자항체는 운동과 관련된 항원에 부착하거나 응집에 의해 정상적인 운동능력을 방해하고 생존성을 저하시키는 것으로 생각된다.

**항정자항체가 정자의 운동성, 생존성 및 침체반응에 미치는 영향** : 수정능획득은 포유류의 정자가 난자와 수정되기 위해 필요한 생리학적인 변화이다<sup>40</sup>. 즉, 정자침체막의 glycoprotein 항원이 탈락되면서 정자막 내부성분들의 재배치가 일어나고<sup>41</sup>, 정자운동의 hyperactivation<sup>42</sup>이 일어나는 것이다. 침체반응은 수정능획득의 결과로

서 일어나며, 이로 인해 정자가 난자 투명대에 부착 및 침입하게 된다<sup>43</sup>. 한편 항정자항체를 첨가한 배양액 내에서 수정능획득을 유도해본 결과 배양시간의 경과에 따라 정자에 부착하는 항정자항체는 다르며<sup>44</sup>, 수정능획득에 의해 정자막항원의 양적, 질적인 변화가 생기면 결과적으로 이들 항원에 결합하는 항체들의 변화가 나타난다고 하였다<sup>45</sup>. 사람에서 항정자항체는 정자두부의 팽대와 침체에 이상을 일으켜 체외수정을 방해하였고<sup>46</sup>, Ca<sup>2+</sup> ion의 유입을 저하시키고 침체반응을 억제하였으며<sup>47</sup>, 투명대 부착을 방해하였다고 하였다<sup>48</sup>. Wang *et al*<sup>37</sup>은 불임유우의 항정자항체혈청이 정상적인 침체구조를 파괴한다고 하였으며, Lenzi *et al*<sup>49</sup>은 사람에서 정자두부의 침체에 부착한 항정자항체가 수정을 방해한다고 하였다. 이와같이 항정자항체는 다양한 기전에 의해서 수정능획득과 침체반응을 억제하는 것으로 밝혀졌으며 이런 연구결과와 본 실험의 항체가 두부의 침체에 부착한다는 결과를 바탕으로 항정자항체가 정자막항원에 결합하여 소 정자의 수정능획득과 침체반응을 억제할 것이라는 가설하에 실험을 하였다. 대조군과 항정자항체혈청첨가군간의 swim-up 후의 정자수는 항정자항체혈청첨가군에서 유의적으로 낮았으며, 이는 정자의 운동성 저하와 응집반응에 의해 회수된 정자수의 감소 때문인 것으로 판단된다<sup>3</sup>. 정자 swim-up 후의 생존율은 항정자항체혈청첨가군이 대조군에 비하여 유의적으로 낮았으며, 수정능획득 5시간 후의 생존율은 항정자항체혈청첨가군이 대조군의 50% 수준으로 유의적인 차이를 보였다. 항정자항체는 정자의 용해와 소실에 의해 생존율을 저하시킨다고 하였으며<sup>50</sup>, 배양시간이 길어져 정자가 항정자항체에 노출되는 시간이 길어질수록 생존성에 악영향을 미치는 것으로 생각된다. 한편 대조군과 항정자항체혈청첨가군간의 swim-up 후의 침체반응율은 유의적인 차이가 인정되지 않았으며, 이는 침체반응을 유도할 만큼 배양시간(1시간)이 충분하지 못했기 때문인 것으로 추정된다. 수정능획득 5시간 후의 침체반응율은 항정자항체혈청첨가군에서 유의적으로 낮았으며, 이는 항정자항체가 정자의 표면항원에 부착하여 침체반응을 억제한다는 보고<sup>49</sup>로부터 원인을 찾을 수 있을 것으로 생각된다. 즉, 항정자항체는 정자의 생존성과 운동성을 저하시키고 수정능획득과 침체반응을 억제하여 수태능력을 저하시키는 것으로 판단된다.

## 결 론

소에서 항정자항체의 생성과 불임의 관련성을 규명하기 위하여 처녀우에 정자항원을 접종한 후 항정자항체의 생성, 경시적 추이 및 항체부착부위 등을 조사하였으며, 항정자항체가 정자의 생존성, 운동성 및 침체반응 등에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 항정자항체의 생성은 정자항원을 접종한 2주에서 유사한 결과를 보였으며, 접종 1~2주에 급격히 증가하여 4~5주에는 정점에 달하였고 7주까지 높은 항체가 유지되다가 이후 20주까지 점차 감소되는 양상을 보였다. 최고항체는 접종 4주째 혈청의 1/2048이었다.

2. 정자항원접종전 및 1주 후에는 정자부착항체를 발견할 수 없었으나 2~5주에는 두부에 부착하는 항체를, 6~9주에는 두부와 미부에 부착하는 항체를 관찰할 수 있었다. 제10주 후부터는 두부부착항체가 점차 약해지는 경향을 관찰할 수 있었다.

3. 저수태우 21두중 1두에서 두부부착항체를 관찰하였다.

4. 항정자항체혈청의 희석배율이 높아질수록 swim-up 후의 정자수는 유의적으로 증가하였으며( $p < 0.05$ ), 희석농도 1/512 이상에서는 대조군과 유사한 결과를 보였다. 항정자항체혈청의 각각의 희석농도는 swim-up 후의 정자의 생존성에는 영향을 미치지 않았다. 응집반응은 희석농도 1/64까지 관찰할 수 있었으나 1/512 이상의 희석농도에서는 관찰되지 않았다.

5. 항정자항체혈청첨가군은 대조군에 비해 swim-up 후의 정자수와 생존율이 유의적으로 낮았으며( $p < 0.05$ ), 수정능획득 5시간 후의 생존율은 항정자항체혈청첨가군이 대조군보다 유의적으로 낮았다( $p < 0.05$ ). 대조군과 항정자항체혈청첨가군의 swim-up 후의 침체반응률은 군간의 유의차가 인정되지 않았으며, 수정능획득 5시간 후의 침체반응율은 항정자항체혈청첨가군이 유의적으로 낮았다( $p < 0.05$ ).

## 참 고 문 헌

1. Isojima S. Antisperm antibodies. In Mohri H ed *Spermatology*, University of Tokyo Press, Tokyo:247-262, 1992.

2. Hunter AG. Immunology and fertility in the bovine. *J Dairy Sci*, 72:3353-3362, 1989.

3. Marshburn PB, Kutteh WH. The role of antisperm antibodies in infertility. *Fert Steril*, 61:799-811, 1994.

4. Franklin RR, Dukes CD. Antispermatozoal antibody and unexplained infertility. *Am J Obstet Gynecol*, 89: 6-9, 1964.

5. Isojima S, Li TS, Ashitaka Y. Immunologic analysis of sperm-immobilizing factor found in sera of women with unexplained sterility. *Am J Obstet Gynecol*, 101: 677-683, 1968.

6. Alexander NJ, Anderson DJ. Immunology of semen. *Fert Steril*, 47:192-205, 1987.

7. Mandelbaum SL, Diamond MP, DeCherney AH. The impact of antisperm antibodies on human infertility. *J Urol*, 138:1-8, 1987a.

8. Coonrod SA, Westhusin ME, Naz RK. Monoclonal antibody to human fertilization antigen-1 (FA-1) inhibits bovine fertilization *in vitro*: application in immuncontraception. *Biol Reprod*, 51:14-23, 1994.

9. Lee C, Nie GJ, Joo HS, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for detection of antisperm antibodies in horse serum. *Theriogenology*, 40:1117-1126, 1993.

10. Fayemi OE, Joo HS, Crabo BG. Effect of immunization with sperm or seminal plasma on spermatozoal quality in boars. *Ani Reprod Sci*, 23:245-251, 1990.

11. Kiddy CA, Stone WH, Tyler WJ, et al. Immunologic studies on fertility and sterility. III. Effect of isoimmunization with blood and semen on fertility in cattle. *J Dairy Sci*, 42:100-109, 1959.

12. Menge AC, Stone WH, Tyler WJ, et al. Immunological studies on fertility and sterility IV. Fertility of cattle and rabbits inseminated with antibodies produced against semen, spermatozoa and erythrocytes. *J Reprod Fert*, 3:331-341, 1962.

13. Menge AC. Induced infertility in cattle by isoimmunization with semen and testis. *J Reprod Fert*, 13: 445-456, 1967.

14. Menge AC. Early embryo mortality in heifers isoim-



- munized with semen and conceptus. *J Reprod Fert*, 18:67-74, 1969.
15. Farahani JK, Tompkins W, Wagner WC. Reproductive status of cows and incidence of antisperm antibodies. *Theriogenology*, 15:605-612, 1981.
  16. Cunningham DS, Fulgham DL, Rayl DL, *et al.* Antisperm antibodies to sperm surface antigens in women with genital tract infection. *Am J Obstet Gynecol*, 164:791-796, 1991.
  17. Tizard I. General principles of vaccination and vaccines. In *Veterinary Immunology : An Introduction*, WB Saunders company, Philadelphia:261-288, 1992.
  18. Lander MF, Hansen PJ, Drost M. Antisperm antibodies in cows after subcutaneous and intrauterine immunisation. *Vet Rec*, 126:461-462, 1990.
  19. Clarke GN. Sperm antibodies and human fertilization. *AJRIM*, 17:65-71, 1988.
  20. Mandelbaum SL, Diamond MP, DeCherney AH. Relationship of antisperm antibodies to oocyte fertilization in *in vitro* fertilization-embryo transfer. *Fert Steril*, 47:644-651, 1987b.
  21. Vasquez-Levin M, Grunfeld L, Kaplan P, *et al.* The effect of female antisperm antibodies on *in vitro* fertilization, early embryonic development, and pregnancy outcome. *Fert Steril*, 56:84-88, 1991.
  22. Alexander NJ, Bearwood D. An immunosorption assay for antibodies to spermatozoa: comparison with agglutination and immunization tests. *Fert Steril*, 41: 270-276, 1984.
  23. Haas GG, D'Cruz OJ. A radiolabeled antiglobulin assay to identify human cervical mucus immunoglobulin (Ig) A and IgG antisperm antibodies. *Fert Steril*, 52: 474-485, 1989.
  24. Clarke GN. Detection of antisperm antibodies using immunobeads. In Keel BA, Webster BW ed *Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility*, CRC press, Boca Raton:177-192, 1990.
  25. Stern JE, Dixon PM, Manganiello PD, *et al.* Antisperm antibodies in women: variability in antibody levels in serum, mucus, and peritoneal fluid. *Fert Steril*, 58:950-958, 1992.
  26. Fukui Y. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 26:40-46, 1990.
  27. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, *et al.* Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25:591-600, 1986.
  28. Rosenthal RC, Meyers WL, Burke TJ. Detection of canine antisperm antibodies by indirect immunofluorescence and gelatin agglutination. *Am J Vet Res*, 45: 370-374, 1984.
  29. Kay DJ, Boettcher B. Common specificities of auto- and iso-antibodies to human spermatozoa. *AJRIM*, 8: 10-14, 1985.
  30. Hjort T, Hansen B. Immunofluorescent studies on human spermatozoa I. The detection of different spermatozoal antibodies and their occurrence in normal and infertile women. *Clin Exp Immunol*, 8:9-23, 1971.
  31. Zouari R, Almeida MD, Rodrigues D, *et al.* Localization of antibodies on spermatozoa and sperm movement characteristics are good predictors of *in vitro* fertilization success in cases of male autoimmune infertility. *Fert Steril*, 59:606-612, 1993.
  32. Haas GG, D'Cruz OJ, DeBault LE. Comparison of the indirect immunobead, radiolabeled, and immunofluorescence assays for immunoglobulin G serum antibodies to human sperm. *Fert Steril*, 55:377-388, 1991.
  33. Wang GL, Xie CX. The relationship between antisperm antibodies and progesterone in the serum of infertile dairy cows. *Acta Vet Zootech Sinica*, 21: 26(abst.), 1990.
  34. Roberts SJ. Infertility in the cow. In *Veterinary obstetrics and genital disease*. Theriogenology, Author Woodstock, Vermont:434-580, 1986.
  35. Mukherjee DC, Agrawal AK, Manjunath R, *et al.* Suppression of epididymal sperm antigenicity in the rabbit by uteroglobin and transglutaminase *in vitro*. *Science*, 219:989-991, 1983.
  36. Mathur S, Barber M, Carlton M, *et al.* Motion characteristics of spermatozoa from men with cytotoxic sperm antibodies. *AJRIM*, 12:87-90, 1986.

37. Wang GL, Wang HA, Jiu HH, *et al.* Influence of homogeneous and heterogeneous antisperm antiserum on the motility and acrosome integrity of cattle spermatozoa. *Chinese J Anim Sci*, 27:10(abst.), 1991.
38. Hendry WF, Stedronska J, Lake RA. Mixed erythrocyte-spermatozoa antiglobulin reaction (MAR test) for IgA antisperm antibodies in subfertile males. *Fert Steril*, 37:108-112, 1982.
39. Haas GG, Kubota K, Quebbeman JF, *et al.* Circulating antisperm antibodies in recurrently aborting women. *Fert Steril*, 45:209-215, 1986.
40. Yanagimachi R. Mechanisms of fertilization in mammals. In Mastroianni Jr, Biggers JD ed *Fertilization and embryonic development in vitro*, Plenum press, New York and London:81-182, 1981.
41. Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod*, 12:260-274, 1975.
42. Mack SO, Tash JS, Wolf DP. Effect of measurement conditions on quantification of hyperactivated human sperm subpopulations by digital image analysis. *Biol Reprod*, 40:1162-1169, 1989.
43. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In Knobil E, Neill JD ed *The physiology of reproduction*, Raven press, New York:189-318, 1994.
44. Fusi F, Bronson RA. Effects of incubation time in serum and capacitation on spermatozoal reactivity with antisperm antibodies. *Fert Steril*, 54:887-893, 1990.
45. Monroe JR, Altenbern DC, Mathur S. Changes in sperm antibody test results when spermatozoa are subjected to capacitating conditions. *Fert Steril*, 54:1114-1120, 1990.
46. Jeulin C, Feneux D, Serres C, *et al.* Sperm factors related to failure of human *in vitro* fertilization. *J Reprod Fert*, 76:735-744, 1986.
47. Mahony MC, Blackmore PF, Bronson RA, *et al.* Inhibition of human sperm-zona pellucida tight binding in the presence of antisperm antibody positive polyclonal patient sera. *J Reprod Immunol*, 19:287(abst.), 1991a.
48. Mahony MC, Alexander NJ. Sites of antisperm antibody action. *Hum Reprod*, 6:1426(abst), 1991b.
49. Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, *et al.* *In vitro* sperm capacitation to treat antisperm antibodies bound to the sperm surface. *AJRM*, 28:51(abst.), 1992.
50. Mathur S, Rosenlund C, Carlton M, *et al.* Studies on sperm survival and motility in the presence of cytotoxic sperm antibodies. *AJRM*, 17:41-47, 1988.