

## Bromelin 을 利用한 子宮頸管 粘液의 精虫抗體検査\*

啓明大學校 醫科大學 產婦人科學教室

尹 聖 道

### =Abstract=

Dissolving of cervical mucus by use of Bromelin with retention  
of sperm antibody activity

Sung Do Yoon, MD

Department of Obstetrics and Gynecology, Keimyung University,  
School of Medicine, Taegu, Korea

The complete dissolving of human cervical mucus was achieved with bromelin preparation was used for sperm antibody test by Franklin-Duke's tube slide method.

There showed that addition of bromelin did not disturb the positive rate of antibody testing.

We concluded that addition of bromelin 1/2—1/3 volume of cervical mucus, gives a quick, thorough, and undamaged solution of cervical mucus, on which sperm antibody tests can be done with ease and reliability.

Key words: Bromelin, Cervical mucus, local immunity, agglutination.

### 서 언

면역학적 불임의 진단은 실험실에 의존할 수 밖에 없다.

자궁경관은 여성 생식기에서 국소면역 현상을 찾았는데 가장 손쉽고 중요한 곳으로 알려져 있다. 정충에 대한 isoimmunity는 그외에도 자궁강, 난관, 난소 등에도 존재하는 것으로 실제 항체도 증명되고 있다. 그러나 자궁경관내의 점액은 채취가 어려워 판침 밖에 있으나 국소면역이 전신면역보다 더 불임형성에 관여할지 모른다는 생각 때문에 또 전신면역계 즉 혈청 level에서는 조사되지 않는 항체도 자궁경관 내에서 발견되고 있다는 점에서 최근 각광을 받게 되었다<sup>1)</sup>. 자궁경관 점액은 배란기 때 가장 양이 많아서 채취하기가 용이하나 양이 많아 질수록 항체의 농도가 역으로 감소하는 경향이 있다<sup>1)</sup>.

정충형체 검사를 시행하기 전 자궁경관 점액을 처리 및 전처리 하는 방법에는 여러가지가 있는데 즉 1, ultracentrifuge 2, bromelin을 이용하여 점액을 liquafaction시키는 법 3, 원심분리에 의해 extraction buffer를 만드는 법 등이다.

### 재료 및 방법

저자들은 계명대학교 동산 의료원 산부인과에 내원한 불임여성 및 건강여성을 대상으로 채취한 자궁경관 점액을 Bromelin 용액에 용해시키는 방법을 이용하여 자궁경관내의 정충형체를 조사하였다. Bromelin은 日本製國際試藥회사의 제품을 이용하였으며 vial 속의 lyophilized powder의 백색분말 상태로 된것을 1ml의 증류수에 혼합하여 용액을 만드 다음 점액량에 따라 회석배울을 조절 하였다. 즉 미리 채취한 자궁경관 점액용기에다 Bromelin을 첨가하기 전 점액의 무게를 측정한 다음 점액무게가 0.1gm 이하 일때는 pH7.5의 Bromelin 0.1ml

\*본연구는 1985년도 문교부 학술연구 조성비로 연구되었음.

을 쓰고 0.1gm 이상 일때는 점액량의 1/3을 뿌어 넣는다.

내가 30분간 shaking하면 점액이 완전히 용해되는데 소수에서 2시간 이상 소요되는 것도 있다. 점액과 Bromelin이 충분히 용해되도록 하기 위하여 20분마다 3회 shaker에 올려 진탕한 다음 Franklin-Duke's test에 이용하였다. mucus gel이 완전히 용해되었는지를 확인하는 criteria는 시험관을 기울여 보았을 때 완전히 잘 흐르는가, pipetting을 할 때 막히지 않는가 등을 보았다. 자궁경관 점액을 두껍있는 plastic tube에 넣어 20°C에 보관하였다. 경관점액의 pH는 color scale을 이용하였다. 최종혼합 후 pH가 6.0이하에서는 모두 버림으로서 산성에 의한 sperm immobilization을 배제하였다. 내개의 경우 pH가 7.0 전후이었다.

이렇게 용해된 점액을 가지고 tube-slide method (Franklin-Duke)에 의한 정총항체 검사에 들어가게 된다.

먼저 환자의 남편 혹은 Donor의 정총을 semen analysis하여 정총수효률을 파악한 다음 Baker's buffer로 회석하여 정총 수효가  $50 \times 10^6$ 되게 조정한 다음, 자궁경관 점액과 Bromelin 혼합용액 0.1ml과  $50 \times 10^6$ 으로 buffer 회석된 정액 0.01ml을 한 시험관에 옮긴 다음 37°C에서 2시간 incubation시킨다. 판정 방법은 2시간 incubation된 용액을 slide에 한방을 떨어뜨려 현미경으로 보게 되는데 HPF로 12시야 해아려 시야당 total sperm count (moving+dead)와 moving sperm agglutination이 몇개 존재하는가 비율을 내어 그 비율이 10% 이상이면 양성이라 하였다.

## 성 적

1. 조사대상의 연령분포는 경상여성은 30~39세가 44예(73.3%)로 가장 많았고 불임여성군 20~29세가 38예(63.3%)로 가장 많았다(표 1).

Table 1. Age distribution

age	normal women	infertile women
under 20	0	0
20~29	16	38
30~39	44	22
40~49	0	0
total	60	60

2. 자궁경관 점액 체취량은 0.1mg~0.3gm 사이가 가장 많았고 배란시기 전후하여 peak를 이루었

다(표 2).

Table 2. The amount of cervical mucus

amount(gm)	normal women	infertile women
under 0.1	1	2
0.11~0.3	31	35
0.31~0.5	26	22
over 0.5	2	1
total	60	60

3. 자궁경관에서 채취된 점액의 pH는 대부분에서 7.0~7.30사이에 있었다. Bromelin 칡가로 pH의 유의적 변동은 일어나지 않았다(Fig. 1).

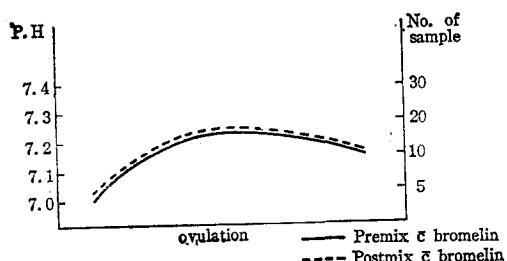


Fig. 1. The range of P.H. of cervical mucus

4. Bromelin을 이용하여 경관점액을 완전히 용해시키는데 소요된 시간은 30분이내가 96예(80%)로 대다수를 차지 하였다(표 3).

Table 3. Time for complete dissolving of cervical mucus

Time(min)	normal mucus	infertile mucus
under 30	53	43
31	6	13
61	1	3
over 90	0	1
total	60	60

5. 항체검출율은 경상여성 60예에서 2예(0.3%), 불임여성 60예중 8예(13.3%)이었으며 통계적으로 유의한 차이가 있었다(표 4).

Table 4. Positive rate of sperm antibody by F-D method

No. of samples	No. of positive	%
fertile women	2	0.3
infertile women	8	13.3*

\*p<0.001

## 고 칠

정액을 여성 생식기 내로 반복 주입시키면 여성 체내에서 iso-immune response가 일어난다.

이 반응은 국소적(local) 혹은 전신적(systemic)으로 나타나는데 국소반응은 주로 자궁경관을 위시하여 자궁강, 난관 등이나 전신적 반응은 주로 혈청내에서 출현하게 된다.

인간 정액 속에는 적어도 11종 이상의 항원성을 가진 물질이 있는데 이는 주로 prostate, seminal vesicle의 분비물에 기인한다고 한다<sup>3)</sup>.

자궁 경관점액 속에서 정충항체가 발견될 수 있다는 사실은 오래전부터이다<sup>2), 5)</sup>. 불임여성의 자궁경관 점액속에 존재하는 정충항체 보유율은 Shulman 등<sup>6), 7)</sup>의 보고에 의하면 약 15%가량 된다고 하며 정상여성 대조군에서 2.7%정도 된다고 하고 있다.

인체의 다른 점막과 마찬가지로 여성 생식기의 조직이나 분비물 속에도 각종 항체, 항체형성세포, 임파구, 탄식세포 및 T-임파구 등이 존재한다.

이러한 常住의 임파계 세포들이 항상 외부로 열려 있는 여성생식기를 보호하고 있는데 이것은 혈류에서의 그것과 다른 점이다<sup>8)</sup>.

과거 10여년간 혈류속의 항체조사 결과 국소항체의 의의가 재평가 받게 되었다. 과거에는 ultracentrifuge, buffer extraction 등의 방법으로 자궁경관 점액을 분석하여 항체검사를 시도하였으나 조작이 복잡하고 항체발현율이 저조한 단점이 있었다<sup>9)</sup>.

저자들이 이용한 bromelin 용해법은 자궁경부 점액을 완전히 용해시키는 것인데 bromelin은 백색 분말로 된 강력한 효소제이다. bromelin을 이용하여 자궁경관의 gel 상태를 용액화 시켜 정충항체를 검사한 보고들<sup>9), 10)</sup>은 여터편 나와있다.

Bromelin이 강력한 소화효소인고로 자궁경관 점액을 용해시키는 작용외에도 면역항체들에 대한 손상, 및 파괴가 우려되기도 하였으나 Shulman<sup>9)</sup> 등의 실험결과 아무런 장애가 없는 것으로 알려지게 되었다.

여성 생식기 점막표면에서 발견되는 임파구의 기원에 대해서는 GALT나 BALT처럼 명확하게 규정지어지지 않고 있다. 생식기 점막 표면에는 Ig A series의 plasma cell 전구세포를 뿐 아니라 plasma cell들이 군집하여 있으며 이러한 면역항체 생성세포 외에도 면역기능 T-임파구들이 점막표면으로 이

동하여 존재하고 있다.

이들 T-임파구는 항체형성에는 관여하지 않고 virus, fungi 및 spermatozoa에 대하여 세포독성면역반응을 이르킨다. 그외에 macrophage도 세포면역에 관계하고 있다. 자궁내의 cell mediated immunity는 인간에서나 하등동물에서나 마찬가지로 어떤 virus나 bacteria에 작용한다<sup>11)</sup>.

정액이 질속으로 사정되면 이는 신속하게 생식로에로 들어간다. 자궁경관 점액은 정충을 저장 시켜 주기도 하고 일종의 barrier 역할을 하므로써 정충이 서서히 자궁속으로 유입하도록 조절한다. 자궁내로 들어간 정충은 macrophage나 PMNL에 의해 탐식된다. 이러한 임파계열 세포들은 배란 후기에 자궁내막이나 stroma에 常存하고 있다. 이들 macrophage와 PMNL은 다시 주위의 임파절로 유입되어 면역반응 중 afferent limb을 형성하게 된다. 정상적으로는 性交자체가 기능적으로 불리한 면역반응을 유발시키지는 않지만 아주 희귀하게 sperm anaphylaxis가 보고되고 있다.

자궁경관, 자궁, 난관등의 분비물속에 존재하는 면역 globulin 가운데 Ig A가 가장많고, Ig G도 존재하나 아주 희귀하게 Ig M도 발견된다.

Ig A와 Ig G의 비율은 자궁점액이 혈청의 그것보다 높다. 자궁경관내에서 Ig A, Ig G를 생산하는 임파구들이 발견된다<sup>12)</sup>. 여성의 생식기 내에서 국소항체 반응을 유발시키는 인자들. 즉 virus 및 bacteria(poiovirus, herpesvirus, cytomegalovirus, candida) 등과 spermatozoa는 여러학자들에<sup>14), 15)</sup> 의해 증명되었다. 또한 불임여성의 자궁경관 조직에서 정상여성에서 보다 더많은 IgA 함유 plasma cell들이 발견되었으나 IgG, IgM에서는 별차이가 없다고 보고하였다.

Shulman<sup>17)</sup>에 의하면 불임환자의 serum에서 정충항체가 발견되면 자궁경부 점액에서도 역시 유사한 정충항체가 발견된다고 하였으나, 역으로 자궁경관 점액속에 정충항체가 있는 경우 일부 소수의 혈청속에서는 항체가 보이지 않는 경우도 발견되었다<sup>18)</sup>. Parish<sup>5)</sup>등도 Shulman과 마찬가지로 자궁경관점액 속에서 정충에 대한 세포독성 IgG를 발견하였으나 혈청속에서는 항체활동을 관찰하지 못하였다. 점액내의 Ig G 농도는 혈청내 그것의 약 0.1%를 차지하며 IgA 농도는 오히려 혈청수준보다 높다.

결론적으로 자궁경관을 위시하여 난관, 자궁 및 부수내에 존재하는 국소항체는 macrophage를 강

화 증강시켜 정총을 탐식, 청소하게 하므로 생식파정을 방해하기도 하고 세포독성, 정총응집반응, capacitation 방해 및 수정방해등으로 불임효과를 나타낸다<sup>11)</sup>고 보기 때문에 국소면역항체의 발견은 불임여성 치료및 예후판정에 기여하리라 본다.

최근에는 정총항체의 존재유무 뿐아니라 보다더 심층의 문제 즉 예를들면 IgG class중의 F(ab)<sub>2</sub> fragment가 정총이 자궁경관 점액을 통과하지 못하는데 원인이 된다든가의 specific한 검사가 선진국에서 진행되고 있다<sup>12)</sup>.

저자들은 시약의 구입, 기본적인 standard의 확립등 여러가지 애로사항이 있었으나 부분적이나마 bromelin을 이용하여 정총항체의 검사를 시도하여 임상적용에도 유의하다는 결과를 얻었다.

### 결 론

저자들은 비교적 용이하게 채취할 수 있는 여성의 자궁경관 점액을 이용, bromelin용해법을 사용하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

조사대상의 연령분포는 정상여성에서 30대가 가장 많았고(73.3%) 불임여성군에서는 20대가 가장 많았다(63.3%).

자궁경관 점액 채취량은 0.1~0.3gm 사이가 가장 많았으며 배란시기 전후하여 그 양이 증가하였다. 자궁경관 점액의 pH는 대부분 7.0~7.30 사이 이었으며 Bromelin 첨가로 별다른 변동을 보이지 않았다. Bromelin을 이용하여 점액을 완전 용해시키는데 소요된 시간은 대부분에서 30분이내 였다. (80%).

점액내 항체 보유율은 정상여성에서 60예중 2예(0.3%), 불임여성 60예중 8예(13.3%)로서 통계적으로 유의한 차이가 있었다( $p < 0.001$ ).

### 참 고 문 헌

1. Jones WR: Immunologic infertility-Fact or Fiction? Modern trends in infertility and conception control. New York, 1982, p 394.
2. HeKman A, Rümke P: The antigens of human seminal plasma: with special reference to lactoferrin as a spermatozoa-coating antigens. *Fertil Steril* 1969; 20: 312.
3. Kremer J, Jager S: The sperm cervical mucus contact test: A preliminary report. *Fertil Steril* 1976; 27: 335.
4. Coelingh Bennink HJJ, Menge AC: Spermatozoal antibodies in cervical mucus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1974; 4: 147.
5. Parish WE, Carron-Brown JA, Richards CB: The detection of antibodies to spermatozoa and blood group antigens in cervical mucus. *J Reprod Fertil* 1967; 13: 469.
6. Shulman S: Immunologic barriers to infertility, in proceedings of the First International Congress on Human Reproduction, Rio de Janeiro, 1974. Amsterdam 1975, Excerpta Medica Foundation, p 3.
7. Shulman S, Jackson H, Stone ML: Antibodies to spermatozoa. IV. comparative studies of sperm agglutination activity in groups of infertile and fertile woman. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 123: 139.
8. Beer EA, Neaves BW: Antigenic status from the view points of the female and male. Modern trends in infertility and conception control. New York, 1979, p 247.
9. Shulman S, Gray AB, Stevens L: Methods and Devices. Studies on Local immunity to sperm-dissolving of cervical mucus by use of bromelin with retention of antibody activity. *Am J Fertil Steril* 1980; 1: 49.
10. Ingerslev HJ, Poulsen F: Bromelin for liquefaction of cervical mucus in sperm antibody testing: Its effect on sperm agglutinating immunoglobulin G. *Fertil Steril* 1980; 33: 61.
11. Waldman RH, Cruz JM, Rowe DS: Immunoglobulin level and antibody to Candida Albicans in human cervicovaginal secretions. *Clin Exp Immunol* 1972; 10: 427.
12. Levine BB, Siranian RP, Schenkein I: Allergy to human seminal plasma. *N Engl J Med* 1973; 288: 894.
13. Tomasi TB, Biennenstock J: Secretory

- Immunoglobulins. *Adv Immunol* 1971; 9:2.
14. Behrman SJ, Lieberman M, Uchiyama N, Ansbacher R: Immunoglobulin biosynthesis of the rabbit reproductive tract in vitro. In Pathways to conception. Springfield, 1971, p 29.
15. Kerr WR, Robertson M: Active and passive sensitization of the uterus of the cow in vivo against trichomonas tetus antigen and the evidence for the local production of antibody in that site. *J Hyg* 1953; 51: 405.
16. Cinader B, Weck A: The immunological response of the female reproductive tract. Geneva, WHO, in Press, 1978.
17. Friedman R, Shulman S: Human cervical mucus antibodies to spermatozoa. *Fed Proc* 1974; 33: 814.
18. Sudo N, Shulman S, Stone ML: Antibodies to spermatozoa. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 360: 15.
19. Hjort T, Husted S: Autoimmunity to sperm. *Proc R Soc Mod* 1975; 68: 253.