

Hamster test를 이용한 家畜精자의 受精能力 檢定

I. 돼지정자의 保存溫度 비교 및 돼지와 개정자의 hamster test결과

김 용 준
전북대학교 수의과대학
(1992년 3월 4일 접수)

Assessment of the fertilizing capacity of domestic animal spermatozoa by hamster test

I. Comparison of storage temperatures for boar sperm and results of hamster test between boar and dog sperm

Yong-jun Kim
College of Veterinary Medicine Chonbuk National University
(Received Mar 4, 1992)

Abstracts : To evaluate the fertilizing capacity of domestic animal spermatozoa by hamster test, semen were collected from 15 boars(Duroc, Landrace, and Yorkshire) and 2 mixed dogs which had been proved to be fertile in the past then, the semen were preserved in BWW medium at 4°C or 18°C for about 20 hours and coincubated with zona-free hamster ova for 5 hours.

The ova were stained by lacmoid and examined under phase contrast microscope to investigate the rates of sperm binding to the ova, penetration and formation of a male pronucleus, and the numbers of both bound and penetrated sperm per ovum.

Both the semen preserved at 18°C for about 20 hours and that treated by swim up procedure showed considerably higher rates of sperm binding and penetration as well as higher number of penetrated sperm than that preserved at 4°C for about 20 hours, respectively($p < 0.01$).

Motility of boar sperm at insemination was from 40 to 90% and no difference in hamster test was obtained according to different degree of sperm motility.

Abnormality in morphology of boar sperm at insemination was from 6 to 45% and no difference in hamster test was obtained according to different degree of sperm abnormality.

The sperm concentrations of 7×10^7 and 7×10^6 showed considerably higher rates of sperm binding and penetration as well as higher number of bound sperm than that of 7×10^4 ($p < 0.01$) along with the same higher results than that of 7×10^5 ($0 < 0.05$), respectively.

Boar sperm showed considerably higher rates of sperm binding and penetration as well as higher numbers of both bound and penetrated sperm than dog sperm, when both semen were treated by BWW + heparin medium and swim up procedure, respectively.

* 이 논문은 1989년도 문교부지원 학술진흥재단의 신진교수 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

These results indicated that fertile boar sperm showed considerably lower rates in the results of hamster test, when preserved at 4°C for about 20 hours and in lower concentration of sperm than when preserved at 18°C for about 20 hours and in higher concentration of sperm, respectively, and at the same time considerably higher results than fertile dog sperm, consequently, to prove that hamster test would be of great value in assaying the fertilizing capacity of boar sperm.

緒 論

家畜에서 人工授精은 繁殖效率을 높인데 지대한 공헌을하여 왔으며 최근의 受精卵移植術은 繁殖效率을 더욱 고도로 향상시키는 기술로 간주되고 있다.

人工授精과 受精卵移植術 그리고 사람 및 家畜의 體外受精에서 精子的 受精能力은 가장 중요한 요인의 하나이므로 精子的 受精能力을 보다 정확히 판정하는 것은 성공적인 受精 및 繁殖을 위하여 무엇보다도 중요하다고 하겠다.

현재까지 인체 및 가축정자의 수정능력 검사는 精液에 대한 일반검사라 할 수 있는 精子的 活力, 精子數, 畸形率 검사에 의해 대부분 이루어지고 있다. 그러나 최근 이러한 검사들은 정자의 실제 수정능력을 판정하기에 미흡하고 특이적이지 못하며¹⁻⁷, 특히 이 검사들만으로는 人體에서 남성의 不妊症을 판정하기가 어렵다는 보고들⁸⁻¹³이 많다. 돼지에서도 Larsson¹⁴은 이러한 일반검사는 돼지정자의 수정능력을 판정하기에 신빙성이 없다고 보고한 바 있다.

透明帶가 除去된 햄스터의 卵은 투명대가 제거된 다른 포유류 특히 설치류의 卵과 달리 種에 대한 特異性이 존재하지 않아 다른 種의 精기도 받아들인다고 밝혀진 바 있다.¹⁵⁻²⁰ 이를 이용하여 Yanagimachi 등²⁰은 사람의 정자를 투명대가 제거된 햄스터 난자에 반응시켜 사람의 정자가 햄스터의 난자내 침입되어 活性化된 것을 보고 최초로 사람정자의 수정능력을 판정하는데 이 방법을 사용하였고 이 검사를 햄스터 검사(hamster test)로 命名하였다.

이를 계기로 많은 연구자들²¹⁻²⁶이 인체의 體外受精에서 정자의 수정능력을 판정 하기위한 특이적 검사로서 햄스터 검사를 제시해 오고 있다.

家畜에서도 햄스터 검사는 아직까지 소수이기는 하나 최근 여러 연구자들에 의해 소²⁷⁻³⁰, 돼지^{31, 32}, 산양³³, 고양이³⁴ 정자의 수정능력 검사에 시도된 바 있다. 이에 저자는 산업동물인 돼지를 실험대상으로 하여 돼지液狀 精液의 保存溫度가 햄스터 검사결과에 미치는 영향과 아울러 정액 일반검사와 햄스터 검사와의 상관관계를 알아보고 또한 돼지와 개정자에 대해 햄스터 검사를 실

시하여 햄스터 검사가 가축정자의 수정능력 판정을 위한 검사로서의 가치가 있는지를 알기 위하여 그리고 가치가 있다면 인공수정 및 수정란이식술에서 정자의 수정능력 검사방법으로 제시할 수 있기 위하여 본 실험을 시도하였다.

材料 및 方法

供試動物 : 供試豚은 축협중앙회 양돈사업장에서 사육되는 여러 품종의 種牡豚으로서 과거에 번식력을 나타낸 바 있는 15두를 대상으로 하였으며 그 연령은 1년 6개월 내지 4년령이었다. 돼지와 비교실험하기 위한 供試犬은 역시 과거에 번식력을 나타낸 바 있는 2~3년령의 雜種牡犬 2두를 대상으로 하였다.

精液處理培地 : 정액의 처리를 위하여 washing 배지와 培養배지로 나누어 사용하였으며 modified BWW 배지³⁵(Wolf, 1988)에 bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 0.3% 첨가한 것을 washing 배지로, 3.5% 첨가한 것을 배양배지로 하여 사용하였다. 배지의 pH는 7.4~7.6이었다.

精液의 採取 : 정액은 돼지에서는 手壓法으로 개에서는 手指法으로 정자의 농축부분을 중심으로 채취하였다. 채취된 原精液중 돼지는 약 10ml를 취했고, 개는 전량을 사용하였으며 원정액중 일부는 정자수, 활력 및 기형을 검사에 사용하고 나머지는 washing 배지로 200g에서 5분간씩 2회 원심분리후 배양배지를 각각 원정액량의 1.5~2.0배로 하여 혼합하였다. 그리고나서 실험을 위한 처리전까지 돼지정액은 4°C와 18°C에서 보관하였으며 개정액은 4°C에서 보관하였다.

實驗前 處理 : 실험전 정자에 대해 다음과 같이 조건을 부여하였다. 각 실험에서 공히 난자와 반응시키기 전 정자의 활력 및 기형율을 조사하였다.

實驗 I : 돼지 액상정액의 보존온도에 따른 햄스터 검사결과를 비교하기 위하여 11두의 돼지정액이 이용되었다. 4°C와 18°C에서 18~22시간 보존된 정액을 1회 원심분리시킨 후 배양배지를 이용하여 ml당 5×10^6 으로 정자수를 일정하게 조정하였다.

햄스터 卵子와 반응전, 정자수가 조정된 정액으로부터 150 μ l를 취하여 35×10mm petri dish내에 droplet을

만들고, paraffin oil로 덮어 1시간 30분동안 37°C, 5% CO₂ incubator에 두었다. Swim up群은 18°C에서 18~22시간 보존된 정액중 일부를 취하여 설정하였고, Swim up 처리는 Wolf³⁵의 방법에 참고하여 1시간 30분동안에 걸쳐 실시하였다.

이 실험에서는 또한 18°C에서 18~22시간 보존된 정액을 이용하여 정자의 活力과 畸形率이 햄스터 검사에 미치는 영향을 알아 보았다. 정자의 活力은 난자와 반응시킬 때 活力을 보아 40~55%, 60~75%, 80~90%의 세등급으로 구별하여 비교하였으며 畸形率도 역시 卵子和 반응시킬때의 기형율에 따라 10%이하 11~29%, 30~45%의 세등급으로 구별하였다.

實驗 II : *In-vitro*에서 돼지정자 濃度가 햄스터 검사결과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 2두의 돼지 정액을 이용하였으며 精子群의 농도는 7×10^7 군, 7×10^6 군, 7×10^5 군, 7×10^4 군의 4군으로 구별하였다. 이 실험에서는 18°C에서 18~22시간 보존된 정액을 사용하였으며 햄스터 난자와 반응전 처리는 실험 I 과 같다.

實驗 III : 같은 실험조건에서 개와 돼지정자의 햄스터 검사결과를 비교하기 위하여 각각 2두의 개와 돼지정액이 이용되었다. 정액채취후 각 정액은 BWW 배양배지에서 18~22시간 보관되었으며 개정액은 4°C에서, 돼지정액은 18°C에서 보관되었다.

각 동물의 정액은 다시 BWW 배양배지에 heparin(Sigma)을 첨가시킨군($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)과 Swim up군으로 각각 구별하여 비교되었다. swim up군의 처리는 실험 I 과 같다. 햄스터 난자와 반응하기전 실험 I 과 동일한 정 n군은 2시간동안, swim up군은 1시간 30분동안 각각 37°C, 5% CO₂ Incubator에서 보존되었다.

자수 및 정자처리 방법에 의해 BWW+heparin군은 2시간동안, swim up군은 1시간 30분동안 각각 37°C, 5% CO₂ Incubator에서 보존되었다.

供試動物 : 공시 햄스터는 생후 5~7주령의 golden hamster로서 사육실은 오전 7시에 점등하고 오후 8시에 소등하여 明暗을 조절하였다. 사료는 마우스·랫트 研究檢定用 固形飼料(삼양사료)로서 자유급식시켰으며 물도 자유급수시켰다.

使用培地 : 난자의 washing 및 배양에 사용한 배지는 정액의 washing 및 보존에 사용한 동일한 BWW 배지로서 BSA도 각각 0.3%, 3.5%로 동일하게 첨가되었다.

過排卵處理 : 햄스터의 陰 분비물 존재여부를 검사하여 배란후 분비물을 보이는 햄스터를 선택하였으며 당일 오전 10시에 pregnant mare serum gonadotrophin(PMSG, Intervet) 30IU를 복강내 주사하였고 약 56시간후 human chorionic gonadotrophin(HCG, Intervet) 30IU를

주사하였다.

卵子の採取 : HCG주사후 평균 16시간에 頸椎脫兎法으로 햄스터를 죽인후 子宮, 卵管 및 卵巢를 외과적으로 적출하였고 실제현미경하에서 난관을 washing배지로 관류하여 난자가 포함된 난구세포들을 회수하였다. 난구세포는 다시 0.1% hyaluronidase(Sigma)에 10분간 정치시켜 제거시킨후 卵子を 회수하였다. 실험에 사용할 난자는 50배의 크기로 鏡檢하여 그 형태가 양호하고 第1極體가 존재하는 난자만을 선정하였다. 난자는 washing 배지에서 3회 washing 하였다.

透明帶除去 : washing 한 난자들을 0.1% bovine pancreatic trypsin(Sigma)에 수분간 정치하여 실제현미경하에서 관찰하였으며 투명대가 제거된 난자들을 washing 배지에서 평균 5회 washing하였다. washing후 난자를 배양배지에 넣어 37°C, 5% CO₂ Incubator내에 보관하였다.

卵子和 精子의 反應 : 실험전처리가 끝난 정자의 각 droplet내에 20~25개의 투명대가 제거된 난자를 넣은후 37°C, 5% CO₂ Incubator 내에서 5시간동안 반응시켰다.

卵子の固定 : 반응이 종료된 난자들은 난자에 附着된 정자들을 제거하고자 washing배지로 평균 10회 washing하였다. washing은 실험군 별로 실시하였고 washing후 난자들을 실험군별로 슬라이드상에 올려 놓아 커버글라스로 덮고나서 1% glutaraldehyde 방울을 點滴하였으며 그후 슬라이드를 formalin을 10% 함유한 Dulbecco's PBS에 넣어 약 24시간동안 고정시켰다.

卵子の染色 : 염색을 위하여 슬라이드를 꺼내 증류수로 간단히 씻고 95% ethanal로 탈수시켰다. 그후 0.25% lacmoid로 수분에 걸쳐 염색하였다.

檢査의 判定 : 染色을 마친 슬라이드는 位相差顯微鏡하에서 400배로 경검하였다.

精子가 附着된 卵比率(이하 精子附着卵比率)을 알아보기 위하여 실험군별 전체 난자중 정자가 부착된 난자수로 구하였다. 또한 각 난자별 부착된 정자수를 산정하였다. 이때 정자수가 100이 넘는 것은 100으로 간주하였고, 실험군별 정자가 부착된 난자당 평균 부착정자수를 구하였다.

精子의 卵子內 侵入은 난자내 정자꼬리가 확인된 정자로서 그 頭部가 膨大되어 있거나 頭部核의 弛緩상태를 보이는 정자만으로 판정하였다. 이에 따라 精子가 侵入된 卵比率(이하 精子侵入卵比率)은 실험군별 전체 난자중 정자가 침입된 난자수로 구하였다. 또한 각 난자내 침입된 정자수를 산정하였고 실험군별로 정자가 침입된 난자당 평균 침입정자수를 구하였다.

男性 前核의 판정은 역시 난자내 정자꼬리가 확인되는 정자로서 그 頭部가 상당히 膨大되어 圓形을 형성하고 있으며 핵소체들이 존재하는 것을 前核으로 인정하였다. 이때 前核의 形成率은 실험군별 전체 난자중 전체이 형성된 난자의 수로 구하였다.

結果分析 : 精子附着卵子率, 난자당 附着精子數, 精子侵入卵子率, 난자당 侵入精子數, 前核 形成率에 대하여 실험군에 따라 T검정 또는 ANOVA로 통계처리되었다. 또한 정자부착난자율, 부착정자수, 정자침입난자율, 침입정자수, 전핵형성을 상호에 대하여 상관관계를 알아 보았다.

結 果

돼지液狀精液의 保存溫度 비교 : BWW배지로 희석한 돼지정액을 4℃ 또는 18℃에서 18~22시간을 보존한후 투명대가 제거된 햄스터 난자와 반응전 1시간 30분동안 37℃, 5% CO₂ Incubator에서 활성화시킨 4℃군과 18℃군 그리고 18℃군의 일부정액을 이용하여 햄스터 난자와 반응전 1시간 30분동안 swim up시킨 군의 반응결과를 Table1과 같다.

정자부착난자율은 4℃군, 18℃군, swim up군 서로간에 유의성있는 차이가 인정되지 않았다.

난자당 부착정자수는 4℃, 18℃, swim up군이 각각

16.6±7.4, 59.2±30.8, 73.7±28.5로서 18℃군과 swim up군은 각각 4℃군보다 현저히 높은 부착수를 나타냈으며(p<0.01), 이들 서로간에 유의성있는 차이는 인정되지 않았다.

정자침입난자율은 4℃군, 18℃군, swim up군이 각각 60.9±15.0%, 85.0±13.3%, 87.8±13.6%로서 18℃군과 swim up군은 각각 4℃군보다 현저히 높은 정자침입난자율을 나타내었다(p<0.01). 한편 18℃군과 swim up군간에는 유의성있는 차이가 인정되지 않았다.

난자당 침입정자수는 4℃군, 18℃군, swim up군이 각각 1.9±0.4, 3.5±1.4, 4.1±1.3으로서 18℃군과 swim up군과는 서로 차이가 없이 4℃군보다 각각 현저히 높은 침입정자수를 나타내었다(p<0.01).

전핵형성율은 4℃군, 18℃군, swim up군 서로간에 유의성있는 차이가 인정되지 않았다.

돼지精자의 活力과 햄스터검사 결과 : 18℃에서 18~22시간 보존된 돼지정자의 햄스터난자와 반응시 활력에 따라 비교된 햄스터검사 결과는 Table2와 같다.

정자부착난자율은 40~55%군, 60~75%군, 80~90%군이 각각 94.3±7.7%, 93.8±10.8%, 91.9±8.3%로서 서로간에 유의성있는 차이가 인정되지 않았다.

정자침입난자율은 40~55%군, 60~75%군, 80~90%

Table 1. Effects of preincubation temperatures and swim up procedure of boar sperm on sperm binding, penetration, and formation of a male pronucleus

Preincubation temperature & swim up	No. of experiments	No. of eggs examined	Binding		Penetration		Mean ± SD
			B%*	No. of sperm bound	P%**	No. of sperm penetrated	Pronucleus formation PN%***
4℃	9	186	89.2±10.5	16.6±7.4	60.9±15.0	1.9±0.4	16.3±7.9
18℃	11	247	90.5±9.5	59.2±30.8 ^a	85.0±13.3 ^a	3.5±1.4 ^a	18.2±8.4
Swim up	9	176	97.3±3.8	73.7±28.5 ^a	87.8±13.6 ^a	4.1±1.3 ^a	24.0±12.1

a : p<0.01 * B%=No. of eggs bound with sperm/Total No. of eggs examined.

** P%=No. of eggs penetrated by sperm/Total No. of eggs examined.

*** PN%=No. of eggs formed with pronucleus/Total No. of eggs examined.

Table 2. Effect of motility of boar sperm* on sperm binding, penetration, and formation of a male pronucleus Mean±SD(%)

Motility at insemination (%)	No. of experiments	No. of eggs examined	Binding**	Penetration***	Pronucleus**** formation
40~55	7	142	94.3±7.7	83.1±14.7	18.7±10.5
60~75	5	102	93.8±10.8	88.7±16.3	25.1±13.8
80~90	8	179	91.9±8.3	87.1±10.7	19.2±7.6

* All the semen were preincubated at 18℃ for 18-22 hours and incubated at 37℃, 5% CO₂ incubator for 1.5 hour before interaction with hamster eggs.

** B%=No. of eggs bound with sperm/Total No. of eggs examined.

*** P%=No. of eggs penetrated by sperm/Total No. of eggs examined.

**** PN%=No. eggs formed with pronucleus/Total No. of eggs examined.

군이 각각 83.1±14.7%, 88.7±16.3%, 87.1±10.7%로
서 군간 상호간에 유의성있는 차이가 없었다.

전핵형성율에서도 40~55%군, 60~75%군, 80~90%
군이 각각 18.7±10.5%, 25.1±13.8%, 19.2±7.6%로
서 군간 상호간에 유의성있는 차이가 인정되지 않았다.

돼지精자의 畸形率과 햄스터검사 결과 : 18°C에서 18
~22시간 보존된 돼지정자의 햄스터난자와 반응시 기형
율에 따라 비교된 햄스터검사 결과는 Table 3과 같다.
정자부착난자율은 精子畸形率 10%이하군, 11~29%

군, 30~45%군이 각각 91.6±10.5%, 91.0±9.0%, 97.
8±3.4%로서 군간 서로간에 유의성있는 차이가 인정되
지 않았다.

정자침입난자율은 10%이하군, 11~29%군, 30~45%
군이 각각 83.1±15.0%, 86.6±11.1%, 87.8±16.2%로
서 군간 유의성있는 차이가 없었다.

전핵형성율에서도 10%이하군, 11~29%군, 30~45%
군이 각각 21.0±15.9%, 20.4±8.9%, 20.2±8.0%로서

Table 3. Effect of morphological abnormality of boar sperm * on sperm binding, penetration and formation of a male pronucleus

Morphology at insemination (%)	No. of experi-ments	No. of eggs examined	Binding **	Penetration ***	Mean ± SD (%)
					Pronucleus **** formation
below 10	5	102	91.6 ± 10.5	83.1 ± 15.0	21.0 ± 15.9
11~29	9	183	91.0 ± 9.0	86.6 ± 11.1	20.4 ± 8.9
30~45	6	138	97.8 ± 3.4	87.8 ± 16.2	20.2 ± 8.0

* All the semen were preincubated at 18°C for 18-22 hours and incubated at 37°C, 5% CO₂ incubator for 1 hour 30 before interaction with hamster eggs.

** B% = No. of eggs bound with sperm / Total No. of eggs examined.

*** P% = No. of eggs penetrated by sperm / Total No. of eggs examined.

**** PN% = No. eggs formed with pronucleus / Total No. of eggs examined.

Table 4. Effect of concentration of boar sperm on sperm binding, penetration and formation of a male pronucleus

Concentration of sperm	No. of eggs examined	Binding		Penetration		Mean ± SD
		B% *	No. of sperm bound	P% **	No. of sperm penetrated	Pn% ***
7×10 ⁷	44	100.0 ± 0.0 ^{a,b}	100.0 ± 0.0 ^{a,b}	100.0 ± 0.0 ^{a,b}	4.2 ± 1.2	23.5 ± 6.0
7×10 ⁶	40	100.0 ± 0.0 ^{a,b}	100.0 ± 0.0 ^{a,b}	100.0 ± 0.0 ^{a,b}	3.3 ± 0.7	21.4 ± 13.9
7×10 ⁵	44	93.2 ± 3.2	76.6 ± 10.8	93.2 ± 3.2	3.4 ± 0.4	24.3 ± 6.1
7×10 ⁴	42	88.1 ± 3.4	48.6 ± 8.3	88.1 ± 3.4	2.3 ± 0.6	13.5 ± 3.3

a : p < 0.01 * B% = No. of eggs bound with sperm / Total No. of eggs examined.

b : p < 0.05 ** P% = No. of eggs penetrated by sperm / Total No. of eggs examined.

*** PN% = No. of eggs formed with pronucleus / Total No. of eggs examined.

Table 5. Comparison between fertile canine and swine sperm on sperm binding and penetration.

Experimental Group	Species	No. of eggs examined	Binding		Penetration		Mean ± SD
			B% *	No. of sperm bound	P% **	No. of sperm penetrated	
BWW + heparin	canine	40	17.5 ± 10.6	1.8 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	swine	39	100.0 ± 0.0 ^a	43.3 ± 6.1 ^a	74.3 ± 0.9 ^a	2.9 ± 0.2 ^a	
Swim up	canine	39	40.7 ± 20.3	2.1 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	swine	42	95.8 ± 5.9 ^a	61.2 ± 5.6 ^{a,b}	83.0 ± 0.0 ^a	3.0 ± 0.4 ^a	

a : p < 0.01 * B% = No. of eggs bound with sperm / Total No. of eggs examined.

b : p < 0.05 ** P% = No. of eggs penetrated by sperm / Total No. of eggs examined.

서로간에 유의성있는 차이가 인정되지 않았다.

돼지精子濃度비교 : 18°C에서 18~22시간 보존된 돼지정액을, 정자농도를 구분하여 비교된 햄스터검사 결과는 Table 4와 같다.

정자부착난자율은 정자수 7×10^7 군, 7×10^6 군, 7×10^4 군이 각각 $100.0 \pm 0.0\%$, $100.0 \pm 0.0\%$, $93.2 \pm 3.2\%$, $88.1 \pm 3.4\%$ 로서 7×10^7 군과 7×10^6 군은 각각 7×10^4 군보다 각각 현저히 높은 율을 나타내었고($p < 0.01$), 또한 7×10^5 군보다도 각각 유의성있게 높은 율을 나타내었다($p < 0.05$). 7×10^5 군과 7×10^4 군간에는 차이가 인정되지 않았다.

난자당 부착정자수는 7×10^7 군, 7×10^6 군, 7×10^5 군, 7×10^4 군이 각각 100.0 ± 0.0 , 100.0 ± 0.0 , 76.6 ± 10.8 , 43.6 ± 8.3 으로서 7×10^7 군과 7×10^6 군은 각각 7×10^4 군보다 각각 현저히 높은 부착정자수를 나타내었고($p < 0.01$) 또한 7×10^5 군보다도 각각 유의성있게 높은 수를 나타내었다($p < 0.05$). 7×10^5 군과 7×10^4 군 간에는 차이가 인정되지 않았다.

정자침입난자율은 모든 군이 정자부착난자율과 각각 같은 수치를 보여 정자부착난자율에서와 같은 군간 차이가 인정되었다.

난자당 침입정자수는 군간 서로간에 유의성있는 차이가 인정되지 않았다.

전핵형성율에서도 군간 서로간에 유의성있는 차이는 없었다.

돼지와 개精자의 햄스터검사 결과 : 돼지와 개정액을 각각 18°C와 4°C에서 보존하여 각각 동일한 실험처리를 한 후 햄스터난자에 반응시킨 결과는 Table 5와 같다.

정자부착난자율은 BWW+heparin군 및 swim up군에서 돼지정자군이 각각 $100.0 \pm 0.0\%$, $95.8 \pm 5.9\%$ 로서 양군의 개정자군보다 모두 현저히 높은 율을 나타내었다($p < 0.01$).

난자당 부착정자수는 BWW+heparin군 및 swim up군에서 돼지정자군이 각각 43.3 ± 6.1 , 61.2 ± 5.6 으로서 양군의 개정자군보다 모두 현저히 높은 정자수를 나타냈으며($p < 0.01$), swim up군의 돼지정자군은 BWW+heparin군의 돼지정자군보다 유의성있게 높은 수를 나타내었다($p < 0.05$).

정자침입난자율은 BWW+heparin군 및 swim up군에서 돼지정자군이 각각 $74.3 \pm 0.9\%$, $83.0 \pm 0.0\%$ 로서 양군의 개정자군보다 모두 현저히 높은 율을 나타내었다($p < 0.01$).

난자당 침입정자수에서도 BWW+heparin군 및 swim up군의 돼지정자군이 각각 2.9 ± 0.2 , 3.0 ± 0.4 로서 양

군의 개정자군보다 모두 현저히 높은 수를 나타내었다($p < 0.01$).

考 察

돼지液狀精液의 保存溫度에 따른 비교에서 精子附着卵子率은 4°C군, 18°C군, swim up군간에 서로 차이가 나타나지 않았는데 정자부착난자율을 비교한 연구보고를 접하지 못해 이 실험의 결과와 비교하기는 어려우나 각군이 각각 89%, 91%, 97%의 정자부착난자율을 나타낸 것은 시험관내 18~22시간동안의 精子保存期間中 각군의 정자가 난자에 부착할 수 있는 능력을 대부분 획득하는 것으로 보여진다. 그러나 난자당 부착정자수에서 18°C군과 swim up군이 4°C군보다 현저히 높은 附着數를 나타낸 것은 精子의 附着能力이 4°C에서보다 18°C에서 보존되었을 때 더 높게 나타날 수 있음을 시사하며 이것은 돼지액상정액을 보존할 때 15~20°C가 가장 생존성을 높게한다고 한 여러 연구자들^{36~38}의 보고와 일치하는 결과로 사료된다.

이 실험에서 난자당 정자의 수가 18°C군에서 59, swim up군에서 74로 나타난 것은 Clarke와 Johnson³⁹이 돼지회석정액을 이용한 실험에서 정자부착수를 약 10 정도로 보고한 것에 비해 매우 높은 수였다.

Gould 등⁴⁰과 Koehler 등⁴¹은 精子尖體의 변화가 없는 정자의 일부도 卵子表面에 달라 붙을 수 있다고 하였으나 여러 연구자들^{20, 42~44}은 난자표면에 부착된 정자를 電子顯微鏡으로 관찰한 결과 전부 또는 대부분이 尖體反應되었음을 증명하였고 Yanagimachi⁴⁵는 다시 그 후의 보고에서 卵子和 融合할 수 있는 정자는 침체반응된 정자임이 확실하다고 하였는데 이 실험에서 精子和 反應된 卵자를 부착정자를 제거하기 위해 평균 10회 washing한 사실로 볼 때 이 실험에서의 높은 附着精子數는 18°C에서 18~22시간의 精子保存期間中 돼지정자는 *In-vitro*에서 높은 受精能을 獲得한다는 것을 反證하는 사실로 보여진다.

또한 이 실험에서 附着精子數는 각 군을 통털어 精子侵入卵子率, 侵入精子數, 前核形成率과의 상관관계에서 相關係數가 각각 0.8713, 0.8558, 0.6773으로 현저히 높게 나타났는데 이것은 Pavlok 등⁴⁶이 돼지정자를 이용한 연구에서 附着精子數가 侵入精子數와 상관관계가 있다고 한 것과, Cohen 등³이 사람정자에서 附着精子數와 精子侵入卵子率과 높은 상관관계($r=0.79$)가 있다고 한 보고와 일치되는 것으로 사료된다.

한편 Tyler 등¹²이 不妊症을 보이는 사람에서 附着精子數가 난자당 0~5로 낮았다고 하였고, Singer 등⁴⁷이 역시 사람에서 卵자에 많은 정자가 부착되는 것이 受精

이 이루어지기에 중요한 선행단계라고 보고한 것에 비추어 볼 때 이 실험에서 높은 정자부착수가 나타난 결과는 이 실험에 사용된 돼지들이 과거에 모두 수태력을 나타낸 사실과 관련성이 매우 깊다고 볼 수 있을 것 같다.

精子侵入卵子率에서는 18°C 군과 swim up 군이 4°C 군보다 현저히 높은 율을 나타냈는데 이와같은 실험에 대한 연구보고를 접하지 못하였으나 이 결과는 돼지정액을 4°C에서보다 18°C에서 보관하는 것이 더 높은 수정능력을 유지시킬 수 있음을 시사하는 것으로 보여진다.

이 실험의 精子侵入卵子率에서 18°C 군과 swim up 군이 각각 평균 85%, 88%를 나타낸 것은 Pavlok 등⁴⁶이 수태력을 보인 돼지정자에 대한 실험에서 거의 100%의 侵入卵子率을 보고한 것보다는 낮은 율이나 역시 수태력을 보인 돼지정자에 대한 Berger와 Parker³²의 실험결과인 86~100%의 침입난자율에 유사한 결과로 생각되며 Imai 등⁴⁸이 돼지정자를 이용한 실험에서 10~36%의 침입난자율을 보고한 것에 비하여는 훨씬 상회하는 결과인데 Imai 등⁴⁸은 精子의 受精能獲得을 體內에서 이루어지도록 한 방법이 體外受精能獲得을 이루도록 한 이 실험의 결과와 차이가 있는 것 같다.

이 실험에서 精子侵入卵子率의 범위는 4°C 군, 18°C 군, swim up 군이 각각 42~80%, 61~100%, 57~100%를 나타내었다.

상기의 精子侵入卵子率과 관련하여 수정능력이 있는 동물과 없는 동물을 구별할 수 있는 정자침입난자율의 기준치를 구하고자 할 때 이 실험에서 受胎能力이 없거나 低受胎力을 나타낸 돼지정액을 실험에 이용하지 못해 수태능력의 범위를 한정할 수 있는 기준치를 구하지 못하였으나 이 실험에 사용된 돼지가 과거에 모두 수태력을 나타낸 것을 감안할 때 전체 돼지개체중 侵入卵子率의 最低率은 4°C 군의 한 개체가 42%를 나타냈음을 참고로 할 수 있을 것으로 보인다.

이러한 결과는 돼지정자를 이용한 실험에서 Berger와 Parker³²가 受胎牡豚은 평균 84%, 不妊牡豚은 24%, 低受胎牡豚은 36%의 精子侵入卵子率을 나타냈다고 한 보고와 Berger와 Horton³¹이 受胎牡豚은 93%, 低受胎牡豚은 11%의 侵入卵子率을 나타냈다고 한 보고와 매우 관련성이 높은 것으로 생각된다.

한편 Berger³³는 수태력을 보인 산양의 정자에서 32~100%의 정자침입난자율을 보고하였고 수태력을 가진 소에 대하여는 Brackett 등²⁸이 두마리의 수소에서 각각 92.6%, 92.3%의 침입난자율을 보고하였으며 Lorton과 First⁴⁹는 90%를 Graham과 Foote³⁰는 80% 이상을 각각 보고하였다. 사람정자에 대한 연구에서는 많은 연구자들이 수태력을 가진 男性의 精子는 11% 이상^{4, 11, 50~52} 또

는 14~25% 이상^{2, 6, 7, 22~24, 53}의 侵入卵子率을 보인다고 하였고, 不妊男性의 경우는 0~11%^{12, 13, 26, 54} 또는 35% 이하^{6, 55}의 평균 정자침입난자율을 나타낸다고 하여 돼지에서의 성적과 비교되고 있으며 특히 사람의 경우 體外受精을 위하여 많은 햄스터검사가 실시되고 있다는 점에서 그 실험실의 조건에 따라 기준치가 다소 달라질 수 있을 것으로 보인다.

卵子당 侵入精子數에서도 18°C 군과 swim up 군은 4°C 군보다 각각 현저히 높은 정자수를 나타내어 精子侵入卵子率에서의 결과와 같은 결과를 보였으며, 또한 이 실험에서 침입정자수는 정자침입난자율과 현저히 높은 상관관계($r=0.7965$)를 나타내었는데 이것은 Cohen 등³이 사람에서 侵入精子數와 精子侵入卵子率間에 현저히 높은 상관관계($r=0.99$)를 보고한 것과 일치되는 경향으로 보여진다.

이 실험에서 侵入精子數는 個體間 1.2~5.9의 범위를 나타냈으며 이 수는 Berger와 Horton³¹이 돼지정자를 이용한 실험에서 1.1~4.1의 침입정자수를 보고한 것에 비하여 다소 상회하는 결과로 보여진다. 또한 사람에서 한 난자당 2 이상의 侵入精子가 있을 때 受精能力이 있는 것으로 판단한다고 한 Hirsh 등¹⁰의 보고와 비교해 볼 때 4°C 군, 18°C 군 swim up 군이 각각 평균 1.9, 3.5, 4.1의 침입정자수를 나타낸 것은 이 실험에 이용된 돼지가 과거에 모두 수태력을 나타낸 사실과 관련이 있는 것으로 사료된다.

前核形成率에서는 각 군간의 차이가 인정되지 않았고 4°C 군, 18°C 군, swim up 군이 각각 평균 16%, 18%, 24%를 나타내었다.

이 결과를 돼지정자를 이용한 연구보고들과 비교해 볼 때 Imai 등⁴⁸이 수태력이 있는 돼지에서 29%의 전핵형성율을 보고한 것과 Clarke와 Johnson³⁸이 45%의 精子侵入卵子率에서 5.5%의 전핵형성율을 보고한 성적의 중간성적이 되는 것으로 생각된다. 한편 Brackett 등²⁸은 수태력이 있는 소 2두에서 각각 38.5%, 56.6%의 前核形成率을 보고하였다. 사람정자를 이용한 연구보고에서 대부분의 연구자들이 전핵형성율을 별도로 보고하지 않은 것은 精子侵入卵子率으로써 햄스터검사의 목적이 이루어지기 때문인 것으로 추측된다. 한편 이 실험에서 前核形成率은 精子侵入卵子率과 높은 상관관계($r=0.4695$)를 나타냄으로써 정자침입난자율이 증가시 전핵형성율도 증가되는 경향을 나타내는 것으로 보여진다.

이 실험에서 swim up 군과 18°C 군간에 유의성있는 차이는 인정이 안되었으나 각 항목에서 swim up 군이 18°C 군보다 모두 높은 수치를 나타낸 것은 여러 연구자들의^{26, 32, 35} 보고에서와 같이 swim up 처리시 정자가 더욱 활

성화되는 경향을 반영하는 것으로 생각된다.

이 실험에서 18°C에서 18~22시간 보존된 돼지정자는 난자와 반응시 평균 71% (40~90%)의 활력을 나타내었다. 이것은採取時的 평균 89.8% (75~100)보다 감소된 활력이었다.

Berger와 Parker³²는 돼지정자를 이용한 연구에서 수태돈은 정액채취시 88%의精子活力과 햄스터검사에서 84%의 정자침입난자율을 나타낸 반면, 低受胎豚은 71%의活力과 24%의精子侵入卵者率을 나타냈다고 보고하였는데 Berger와 Parker³²의 보고에서는 卵子와의反應時的 정자活力이 비교가 안되었으나 이 실험에서 수태력이 있는 돼지를 이용하여 채취시 평균 89.8%의精子活力과 평균 86.1%의精子侵入卵者率이 나타난 것과 비교해 볼 때 수태돈에서는 거의 일치하는 결과로 생각된다.

이 실험에서 卵子와反應時 정자의活力이 40~90%의 個體間 차이를 나타냈으나 햄스터검사에서 정자활력에 따른 차이가 인정되지 않았다. 이 결과를 다른 연구자들의 보고와 비교해 볼 때 Berger와 Parker³²는 돼지정자를 이용한 실험에서 정자의活力과 정자침입난자율과는 상관관계가 있다고 하였고, Aitken 등¹, Albertsen 등⁸ 그리고 Berger 등⁵⁶도 사람정자에서 이와같은 상관관계가 있음을 보고하였으나 역시 사람에서 Cohen 등³, Hall⁶, Rogers 등¹¹ 그리고 그밖에 여러 연구자들^{12,13}이 정자의 활력과精子侵入卵者率과의 상관관계가 없음을 보고하였다. 한편 Aitken 등⁵⁷, Hall⁶ 그리고 Hirsh 등¹⁰이 수태력이 있는 사람의精子에서는 정자의 활력과 침입난자율간에 상관관계가 없다고 하였으나 수태력이 없는 사람에서는 상관관계가 있다고 한 보고들을 비추어 볼 때 이 실험에서精子의活力에 따른 차이가 인정되지 않은 것은 실험에 이용된 동물들이 모두 수태력을 나타낸 바 있는 동물들이었기 때문인 것으로 사료된다.

이 실험에서 18°C에서 18~22시간 보존된 돼지정액은 난자와 반응시 평균 19.9% (6~45%)의精子畸形率을 나타내었다. 이것은 정액채취시의 8.7% (0.8~22.5%)에 비해畸形率이 시간이 경과할수록 상승된 것을 뜻한다.

Rogers 등⁵⁸과 Wickings 등⁵⁴이精子畸形率과精子侵入卵者率間에 상관관계가 있음을 보고한 반면 대부분의 연구자들^{1,2,4,6-10,12,13}이 상관관계가 없다고 보고하였다. 한편 Aitken 등²과 Hall⁶은 不妊 또는 低受胎의 남자에서는精子畸形率과 정자침입난자율이 서로 상관관계를 갖는다고 보고하였는데 이 실험에서 정자기형율에 따른 차이가 인정되지 않은 것은 정자의活力에서의 결과와 마찬가지로 실험동물이 모두 수태력을 나타낸 동

물들이었기 때문인 것으로 생각된다.

돼지精子濃度の 비교에서 7×10^7 군, 7×10^6 군이精子附着卵者率, 附着精子數, 精子侵入卵者率에서 7×10^4 군보다는 현저히 높은 차이를, 7×10^5 군보다는 유의성있게 높은 차이를 나타내었다. 이 결과를 다른 연구자들의 연구와 비교해 볼 때 Cohen 등³과 Rogers 등¹¹은 사람에서, Berger와 Horton³¹은 돼지에서 각각精子數와 햄스터검사간에 상관관계가 없거나 낮은 상관관계를 보고하였는데 Rogers 등¹¹은 0.5×10^7 군과 1×10^7 군간을 비교하였고, Berger와 Horton³¹은 1×10^6 군과 8×10^6 군간을 비교하여 모두 정자수의 비교범위가 크지 않았음을 지적할 수 있다. 한편 Berger³³는 산양에서 1×10^7 까지 정자수를 증가할수록 햄스터검사 결과도 높게 나타냈고 1×10^7 군과 4×10^7 군간에는 차이가 없었다고 하였으며 Martin과 Taylor⁵⁹는 사람에서 5×10^4 과 10×10^7 사이의 정자수에서 1×10^7 군이 가장 높은精子侵入卵者率을 나타냈다고 하였으며 많은 연구자들^{6,12,60-62}이精子濃度和 햄스터검사 결과간에 상관관계가 있음을 보고한 바 이 실험의 결과와 비추어 볼 때 수정능력이 있는 정자는體外에서 卵子와 반응시精子濃度가 영향을 주는 것을 시사하는 것으로 보여진다.

햄스터검사에 이용되는 適正線의精子數에 대한 관점에서 볼 때 이 실험에서 사용된 정자수는 일반적으로 5×10^6 이었는데 많은 연구자들이 사람정자에 대한 햄스터검사에서 5×10^6 ^{59,60,63,64} 또는 $1 \times 10^6 \sim 10^7$ ^{12,65}의 범위가 가장 좋은 결과를 나타낸다고 하였고, Pavlok 등⁴⁶은 돼지정자를 이용한 실험에서 $4 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 의 정자수 범위중 5×10^5 군이 가장 좋은 결과를 나타냈다고 하였는데 이것은 18~22시간 보존된 정액을 이용한 이 실험에서 5×10^6 의 정자수로 난자가 반응시켰을 때 여러번 난자에 대한 과도한附着이 관찰되었으므로 장시간 보존된 돼지정자에 대한 검사결과를 판정하기에 적정한 수는 5×10^5 로 추정되며 짧은 보존기간에서는 정자농도가 증가되어야 할 것으로 사료된다.

돼지精子와 개精子를 비교한 실험에서 BWW+heparin 배지 처리 및 swim up처리를 양군에게 동일하게 실시하였을 때 돼지정자군은 개정자군보다 햄스터검사 항목에서 모두 현저히 높은 결과를 나타내었다.

Yanagimachi⁴⁵는 개정자를 이용한 실험에서 개정자는透明帶를 除去한 햄스터卵子內 전혀侵入이 되지 않는다고 보고한 바 있다. 이 실험에서도 개정자의 난자 내 침입은 전혀 관찰되지 않았으나 개정자가 BWW+heparin군에서 평균 1.8, swim up군에서 평균 2.1의附着精子數를 나타내고 동시에精子附着卵者率에서는 각각 17.5%, 40.7%를 나타낸 것은精子의 卵子附着이受精

能獲得을 의미한다고 한 여러 연구자들^{20,42-45}의 보고와 비교해 볼 때 햄스터검사가 개정자에 대한 검사로 전혀 무의미한 것은 아닌 것으로 판단된다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때 돼지정액의 保存溫度 비교, 돼지정자의 濃度비교, 돼지정자와 개정자의 비교에서 실험군간의 차이가 햄스터검사에 의해 확실히 인정되는 결과를 볼 수 있었다. Yanagimachi는⁴⁵ 햄스터검사의 利用性은 透明帶가 除去된 햄스터卵자의 反應을 통해 精子의 受精能獲得 및 尖體反應能力, 정자가 卵黃膜에 附着하는 能力, 정자가 卵子內 侵入하는 能力, 정자가 난자내에서 男性前核을 形成하는 能力을 判定할 수 있다는 점에 있다고 하였다.

또한 사람에서 햄스터검사와 정자의 受精能力間에 상관관계가 있음을 밝힌 많은 보고들^{1,6,11,12,21-26,57,66-69}과, 가축에서도 돼지^{31,32}, 소정자²⁸⁻³⁰의 受精能力과 햄스터검사간에 상관관계가 존재함을 밝힌 보고들과 이 실험의 결과들을 함께 관찰할 때 햄스터검사는 돼지정자의 수정능력을 判定하는데 적지않은 가치가 있는 검사가 될 수 있을 것으로 사료된다.

結 論

햄스터검사를 이용하여 家畜精子의 受精能力을 判定할 수 있는 가능성을 알아보기 위하여 과거에 번식력을 나타낸 바 있는 15두의 돼지 및 2두의 잡종개로부터 정액을 採取하여 BWW培地에서 18~22시간동안 보존시켰다.

精子에 대한 실험적 처리를 한 후 透明帶가 除去된 햄스터卵자에 5시간동안 反應시켜 lacmoid로 染色하였고

位相差顯微鏡下에서 判定하여 精子附着卵子率, 卵子當附着精子數, 精子侵入卵子率, 卵子當 侵入精子數, 男性前核形成率을 조사한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 18°C군과 swim up군은 附着精子數, 精子侵入卵子率, 侵入精子數에서 4°C군보다 각각 현저히 높은 차이를 나타내었다($p < 0.01$).

2. 18°C에서 18~22시간 보존된 돼지정자는 卵子와 反應時 40~90%의 活力을 보였고, 精子附着卵子率, 精子侵入卵子率, 前核形成率에서 정자活力에 따른 차이는 각각 인정되지 않았다.

3. 18°C에서 18~22시간 보존된 돼지정자는 난자와 반응시 6~45%의 畸形率을 보였고, 精子附着卵子率, 精子侵入卵子率, 前核形成率에서 精子畸形率에 따른 차이는 인정되지 않았다.

4. 돼지精子 濃度에서 7×10^7 군, 7×10^6 군은 精子附着卵子率, 附着精子數, 精子侵入卵子率에서 각각 7×10^4 군보다 현저히 높은 차이를 나타내었고($p < 0.01$), 7×10^5 군보다는 유의성있게 높은 차이를 나타내었다($p < 0.05$).

5. BWW+heparin培地처리와 swim up처리에서 돼지精子군은 개精子군보다 精子附着卵子率, 附着精子數, 精子侵入卵子率, 侵入精子數에서 각각 모두 현저히 높은 차이를 나타내었다($p < 0.01$).

이상의 결과 수태력이 있는 돼지精子는 장기간 18°C에서보다 4°C에서 保存되었을 때 精子濃度가 높을 때 보다 낮을 때 햄스터검사에서 현저히 낮은 결과를 나타내었고 개精子와 비교하여 현저히 높은 결과를 나타냄으로써 햄스터검사가 돼지精子의 受精能力을 判定하는데 가치가 있는 검사가 될 수 있음을 확인할 수 있었다.

Legends for figures

Fig 1. Zona intact hamster oocyte exposed to boar spermatozoa which have been preincubated for about 20 hours : many spermatozoa with intact head can be seen on the surface of the zona pellucida and also the first polar body is seen to the right of the ovum.

Lacmoid stain.

Phase contrast microscope×400

Fig 2. Zona free hamster oocyte exposed to boar spermatozoa for 5 hours : neither binding nor penetration of a spermatozoon can be seen.

Lacmoid stain.

Phase contrast microscope×400

Fig 3. Zona free hamster ovum bound with several boar spermatozoa, however, no penetration of a spermatozoon is seen.

Lacmoid stain.

Phase contrast microscope×400

Fig 4. Zona free hamster ovum bound with numerous boar spermatozoa which have been preincubated for about 20 hours at 18°C. Some spermatozoa are stuck in the ovum and are recognized as under penetration.

Also some spermatozoa are penetrated with their swollen head : see arrow.
Lacmoid stain.

Phase contrast microscope×400

Fig 5. Zona free hamster ovum penetrated by a boar spermatozoon after coincubation for 5 hours.

A : a penetrated sperm with its swollen head and accompanied tail.

B : a sperm not penetrated with its intact head.

Lacmoid stain.

Phase contrast microscope×400

Fig 6. Zona free hamster ovum and a penetrated boar sperm with its head developed to a male pronucleus : see arrow.

Lacmoid stain.

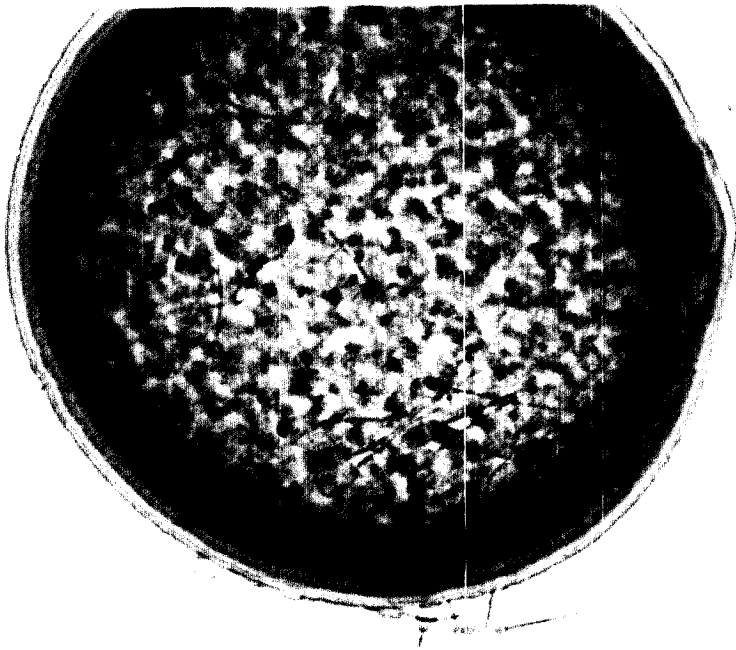
Phase contrast microscope×400

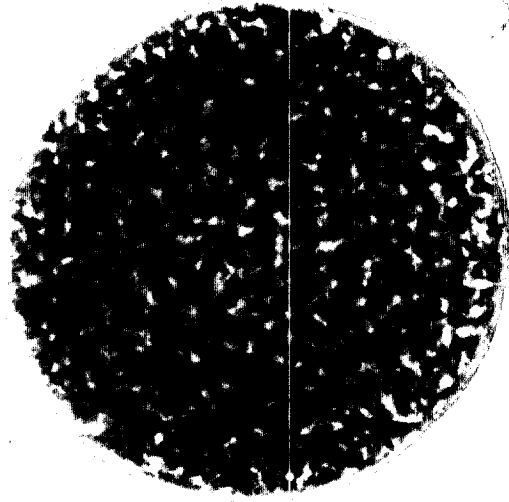
Fig 7. Zona free hamster ovum exposed to dog spermatozoa for 5 hours.

Very few sperm are attached to the ovum with no penetration.

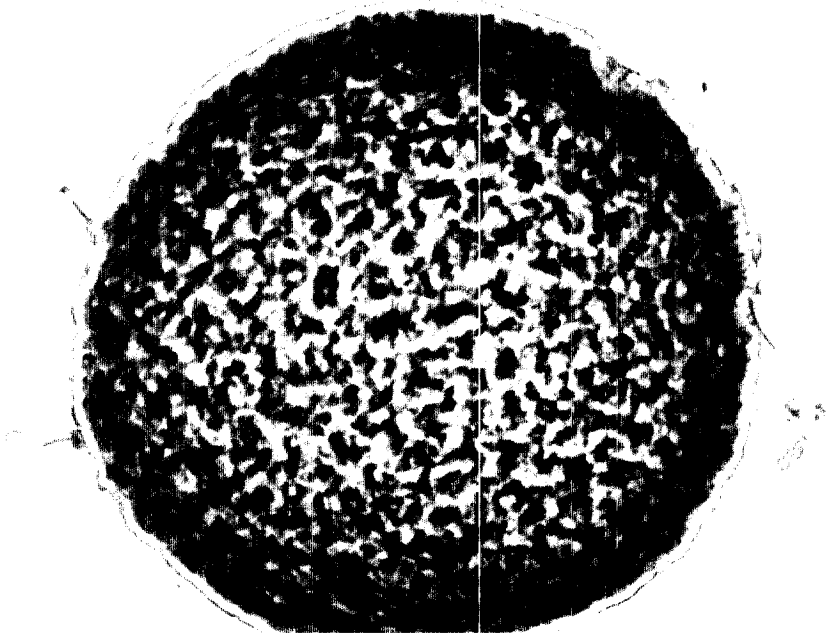
Lacmoid stain.

Phase contrast microscope×400

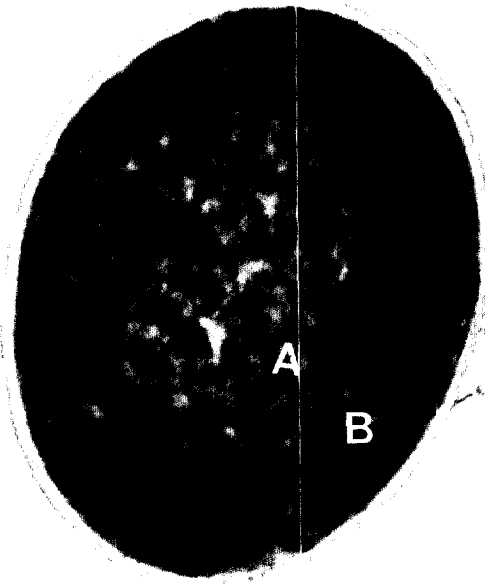
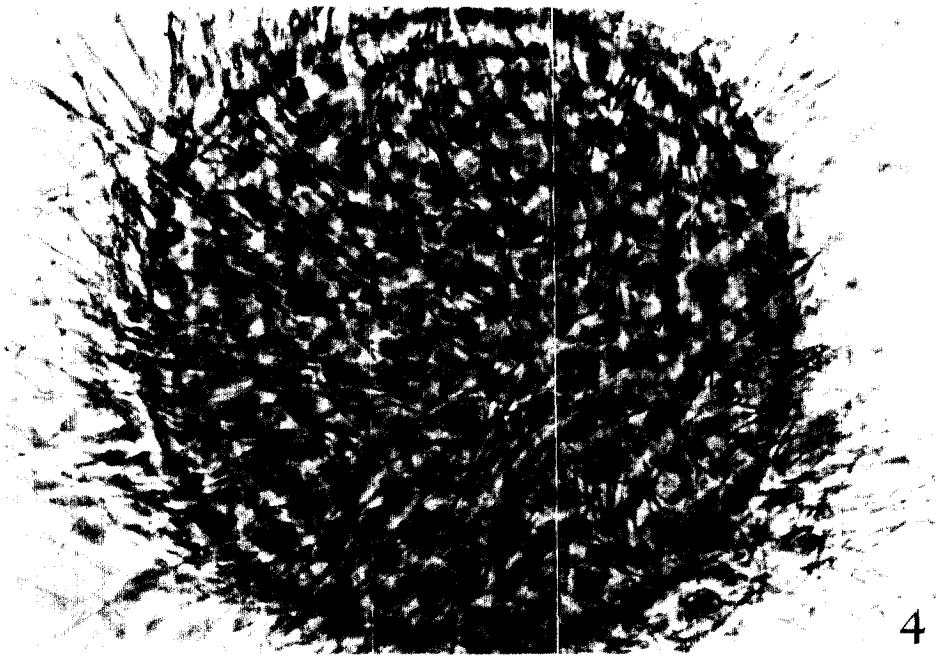


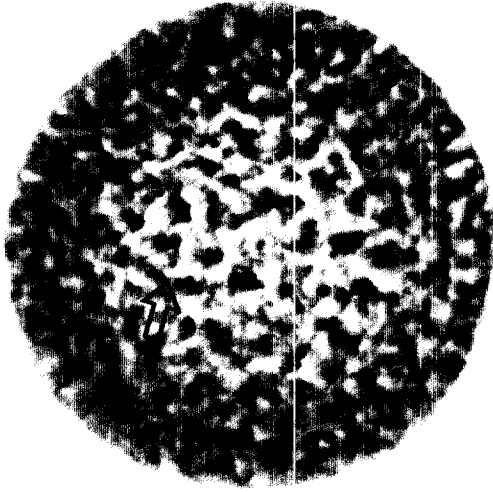


2

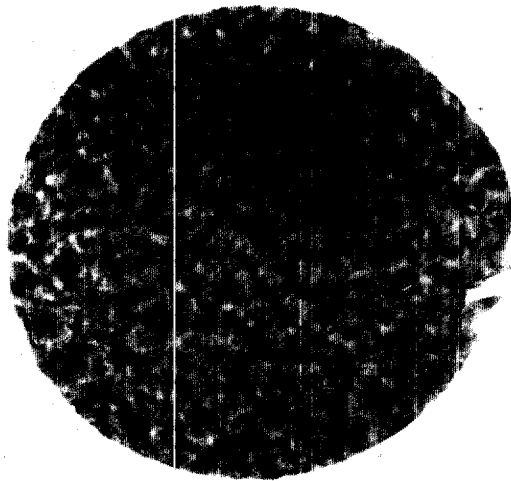


3





6



7

참 고 문 헌

1. Aitken RJ, Best FSM, Richardson DW, et al. An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility : conventional criteria, movement characteristics, and fertilizing capacity. *Fertil Steril* 1982 : 38 : 212~221.
2. Aitken RJ, Best FSM, Richardson DW, et al. The correlates of fertilizing capacity in normal fertile men. *Fertil Steril* 1982 : 38 : 68~76.
3. Cohen J, Mooyart M, Vreeburg JTM, et al. Fertilization of hamster ova by human spermatozoa in relation to other semen parameters. *Int J Andrology* 1982 : 5 : 210~224.
4. Cohen J, Webber RFA, Van der Vijvor JCM, et al. *In vitro* fertilizing capacity of human spermatozoa with the use of zona-free hamster ova : Interassay variation and prognostic value. *Fertil Steril* 1982 : 37 : 565~572.
5. Hafez ESE. Semen evaluation. In : Hafez ESE ed. *Reproduction in farm animals*. Lea & Febiger 1987 : 455~480.
6. Hall JL. Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Fertil Steril* 1981 : 35 : 457~463.
7. Martin RH, Taylor PJ. Reliability and accuracy of the zona-free hamster ova assay in the assessment of male fertility. *Br J Obs Gyn* 1982 : 89 : 951~956.
8. Albertsen PC, Chang TSK, Vindivich D, et al. A critical method of evaluating tests for male infertility. *The Journal of Urology* 1983 : 130 : 467~475.
9. Hall JL, Sessions JP, Fried FA. Sperm fertilizing deficiency in patients treated with sulfasalazine. *Fertil Steril* 1981 : 35 : 245a.
10. Hirsh I, Gibbons WE, Lipshultz LI. *In vitro* fertilization in couples with male factor infertility. *Fertil Steril* 1986 : 45 : 659~669.
11. Rogers BJ, Campen HV, Ueno M, et al. Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil Steril* 1979 : 32 : 664~670.
12. Tyler JPP, Pryor JP, Collins WP. Heterologous ovum penetration by human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1981 : 63 : 499~508.
13. Zausner-Guelman B, Blasco L, Wolf DP. Zona-free hamster eggs and human sperm penetration capacity : A comparative study of proven fertile donors and infertility patients. *Fertil Steril* 1981 : 36 : 771~777.
14. Larsson K. Boar sperm viability after freezing and thawing. In : Johnson LA, Larsson K eds. Deep freezing of boar semen. *Sweden Uppsala* 1985 : 177~187.
15. Hanada A, Chang MC. Penetration of zona-free eggs by spermatozoa of different species. *Biol Reprod* 1972 : 6 : 300~309.
16. Barros C, Leal J. : *In vitro* fertilization and its use to study gamete interactions. In : Hafez ESE ed. *In vitro* fertilization and embryo transfer. *MTP press Limited* 1982 : 37~49.
17. Hanada A, Chang MC. Penetration of hamster and rabbit zona-free eggs by rat and mouse spermatozoa with special reference to sperm capacitation. *J Reprod Fert* 1976 : 46 : 239~241.
18. Tesarik J. From the cellular to the molecular dimension : The actual challenge for human fertilization research. *Gamete Res* 1986 : 13 : 47~89.
19. Yanagimachi R. Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster eggs *in vitro*. *J Reprod Fert* 1972 : 28 : 477~480.
20. 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.
21. Ausmanas M, Tureck RW, Blasco L, et al. The zona-free hamster egg penetration assay as a prognostic indicator in a human *in vitro* fertilization program. *Fertil Steril* 1985 : 43 : 433~437.
22. Corson SL, Batzer FR, Marmar J, et al. The human sperm-hamster egg penetration assay : Prognostic value. *Fertil Steril* 1988 : 49 : 328~334.
23. Karp LE, Williamson RA, Moore DE, et al. Sperm penetration assay : Useful test in evaluation of male fertility. *Obstetrics and Gynecology* 1981 : 5 : 620~623.
24. Margalioth EJ, Feinmesser M, Navot D, et al. The long term predictive value of the zona-free hamster ova sperm penetration assay. *Fertil Steril* 1989 : 52 : 490~494.
25. Margalioth EJ, Navot D, Laufer N, et al. Correlation between the zona-free hamster egg sperm penetration assay and human *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*

- 1986 : 45 : 665~670.
26. Overstreet JW, Yanagimachi R, Katz DF, et al. Penetration of human spermatozoa into the human zona pellucida and the zona-free hamster egg : A study of fertile donors and infertile patients. *Fertil Steril* 1980 : 33 : 534~542.
 27. Bousquet B, Brackett BG. Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage. *Theriogenology* 1982 : 17 : 199~213.
 28. Brackett BG, Cofone MA, Boice ML, et al. Use of zona-free hamster ova to assess sperm fertilizing ability of bull and stallion. *Gamete Res* 1982 : 5 : 217~227.
 29. Davis AP, Graham JK, Foote RH. Homospermic versus heterospermic insemination of zona-free hamster eggs to assess fertility of fluorescently labeled acrosome-reacted bull spermatozoa. *Gamete Res* 1987 : 17 : 343~354.
 30. Graham JK, Foote RH. Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and *in vitro* penetration of zona-free hamster eggs by bull semen : I.A. fertility assay for fresh semen. *Gamete Research* 1987 : 16 : 133~145.
 31. Berger T, Horton MB. Evaluation of assay conditions for the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility. *Gamete Res* 1988 : 19 : 101~111.
 32. Berger T, Parker K. Modification of the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with *in vivo* fertility. *Gamete Res* 1989 : 22 : 385~397.
 33. Berger T. Development of a zona-free hamster ova bioassay for goat sperm. *Theriogenology* 1989 : 32 : 69~77.
 34. Howard JG, Post GS, Bush M, et al. Heterologous penetration of zona-free hamster ova by ejaculated domestic cat spermatozoa. *Theriogenology* 1988 : 29 : 263.
 35. Wolf DP. Assessment of human sperm fertility potential. In : Wolf DP ed. *In vitro* fertilization and embryo transfer. *Plenum Press* 1988 103~136.
 36. Evans LE, McKenna DJ. Artificial insemination of swine. In : Morrow DA ed. *Current Therapy in Theriogenology* 1986 : 946~948.
 37. Roberts SJ. Veterinary obstetrics and genital diseases (Theriogenology). *Cornell University* 1986 : 916~919.
 38. 이용빈. 家畜人工受精要論. 先進文化社, 1987 : 229~296.
 39. Clarke RN, Johnson LA. Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and the penetration of zona-free hamster ova *in vitro*. *Gametes Res* 1987 : 16 : 193~204.
 40. Gould JE, Overstreet JW, Yanagimachi H, et al. What functions of the sperm cells are measured by *in vitro* fertilization of zona-free hamster eggs. *Fertil Steril* 1983 : 40 : 344~352.
 41. Koehler JK, Berger RE, Karp LE, et al. Phagocytosis of spermatozoa in human semen : Morphology and some clinical laboratory correlations. *Biol Reprod* 1981 : 24 : 131.
 42. Barros C, Gonzalez J, Herrera E, et al. Human sperm penetration into zona-free hamster oocytes as a test to evaluate the sperm fertilizing ability. *Andrologia* 1979 : 11 : 197~210.
 43. Barros C, Herrera E. Ultrastructural observations of the incorporation of guinea-pig spermatozoa into zona-free hamster oocytes. *J Reprod Fert* 1977 : 49 : 47~50.
 44. Talbot P, Chacon RS. Ultrastructural observations on binding and membrane fusion between human sperm and zona-free hamster oocytes. *Fertil Steril* 1982 : 37 : 240~248.
 45. Yanagimachi R. Zona-free hamster eggs : their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res* 1984 : 10 : 187~232.
 46. Pavlok A, Travnik P, Kopečný V, et al. Fusion of hamster and pig zona-free eggs stimulated by boar and guinea pig sperm at fertilization *in vitro*. *Gamete Res* 1982 : 6 : 189~197.
 47. Singer SL, Lambert H, Overstreet JW, et al. The kinetics of human sperm binding to the human zona pellucida and zona-free hamster oocyte *in vitro*. *Gamete Res* 1985 : 12 : 29~39.
 48. Imai H, Niwa K, Iritani A. Penetration *in vitro* of zona-free hamster eggs by ejaculated boar spermatozoa. *J Reprod Fert* 1977 : 51 : 495~497.
 49. Lorton SP, First NL. Hyaluronidase does not disperse the cumulus oophorus surrounding bovine ova.

- Biol Reprod* 1979 : 21 : 301.
50. Johnson JP, Alexander NJ, Hamster egg penetration : Comparison of preincubation periods. *Fertil Steril* 1984 : 41 : 599~602.
 51. Stenchever MA, Spadoni LR, Smith WD, et al. Benefits of the sperm (hamster ova) penetration assay in the evaluation of the infertile couple. *Am J Obstet Gynecol* 1982 : 143 : 91~96.
 52. Wolf DP, Sokoloski JE, Quigley MM. Correlation of human *in vitro* fertilization with the hamster egg bioassay. *Fertil Steril* 1983 : 40 : 53~59.
 53. Comhaire F, Vezmeulen L. Effect of high does oral kallikreine treatment in men with idiopathic subfertility : evaluation by means of *in vitro* penetration test of zona-free hamster ova. *Int J Androl* 1983 : 6 : 168~172.
 54. Wickings EJ, Frieschem CW, Langer K, et al. Heterologous ovum penetration test and seminal parameters in fertile and infertile men. *J Androl* 1983 : 4 : 261~271.
 55. Barros C, Gonzalez J, Herrera E, et al. Fertilizing capacity of human spermatozoa evaluated by actual penetration of foreign eggs. *Contraception* 1978 : 17 : 87~92.
 56. Berger RE, Karp LE, Williamson RA, et al'. The relationship of pyospermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as reflected in the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 1982 : 37 : 557~564.
 57. Aitken RJ, Best FSM, Richardson DW, et al. An analysis of semen quality and sperm function in cases of oligozoospermia. *Fertil Steril* 1982 : 38 : 705~711.
 58. Rogers BJ, Bentwood BJ, Van Campen H, et al. Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity. *J Androl* 1983 : 4 : 119~125.
 59. Martin RH, Taylor PJ, Effect of sperm of concentration in the zona-free hamster ova penetration assay. *Fertil Steril* 1983 : 39 : 379~381.
 60. Berger T, Marrs RP, Saito H, et al. Factors affecting human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Am J Obst Gynecol* 1983 : 145 : 395~401.
 61. Binor Z, Sokoloski JE, Wolf DP. Sperm interaction with the zona-free hamster egg. *J Exp Zoology* 1982 : 222 : 187~193.
 62. Johnson AR, Syms AT, Lipshultz LI, et al. Conditions influencing human sperm capacitation and penetration of zona-free hamster ova. *Fertil Steril* 1984 : 41 : 603~608.
 63. Binor Z, Sokoloski JE, Wolf DP. Penetration of the zona-free hamster egg by human sperm. *Fertil Steril* 1980 : 33 : 321~327.
 64. Wolf DP, Sokoloski JE, Characterization of the sperm penetration bioassay. *J Androl* 1982 : 3 : 445~451.
 65. Rogers BJ, Perresault SD, Bentwood BJ. Variability in the human hamster *in vitro* assay for fertility evaluation. *Fertil Steril* 1983 : 39 : 204~211.
 66. George GM, Douglas WS, Rogers BJ. *In vitro* fertilization rates after varicocele repair. *J Urology* 1982 : 127 : 1103~1104.
 67. Margalioth EJ, Navot D, Laufer N, et al. Zona-free hamster ovum penetration assay as a screening procedure for *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1983 : 40 : 386~388.
 68. Overstreet JW, Hembree W. Penetration of zona pellicula of nonliving human oocytes by human spermatozoa *in vitro*. *Fertil Steril* 1976 : 27 : 815~831.
 69. Rogers BJ. The sperm penetration assay : its usefulness reevaluated. *Fertil Steril* 1985 : 43 : 821~840.
-