韓國家畜繁殖研究會報 7(1) : 1~8 (1983)
Korean J. Anim. Reprod.

家畜의 體外受精

入谷 明·金 正 翊*
京都大學 農學部·江原大學校 農科大學

In Vitro Fertilization in Farm Animals

A. Iritani and C.I. Kim
College of Agriculture, Kyoto University
*College of Agriculture, Kangweon National University

Ⅰ. 緖 言

體外受精(In Vitro Fertiiization)이란 體內에서 일어나는 受精의 過程을 體外에서 人爲的으로 再現시키는 것을 말하며, 初期發生의 經時的 觀察과 수정을 지배하는 要因分析에 중요한 수단이 된다.

1954년 Thibault等에 의한 토끼실험에서 체외수정의 정확한 細胞學的 觀察이 확인된 이래, 포유동물의 체외수정에 대한 報告例는 15種에 이르고 있으며, 實驗小動物(rabbit, rat, mouse)과 사람의 경우는 體外受精卵을 移植하여 新生仔을 얻는데 성공하고 있다(Table 1).

실험소동물과는 달리 家畜의 경우는 多數의 成熟卵子를 손쉽게 구할 수 없을 뿐만 아니라 막대한 실험비를 요하는 제약으로 체외수정에 관한 연구가 지연되어

Table 1. First reported in vitro fertilizations of mammals

Species	Reference
Rabbit*	Thibault et al., 1954 (Chang, 1959)
Hamster	Yanagimachi & Chang, 1963
Mouse*	Iwamatsu & Chang, 1969 (Hoppe & Pitts, 1973)
Chinese hamster	Pickworth & Chang, 1969
Human*	Edward et al, 1969 (Steptoe & Edward, 1978)
Cat	Hamner et al, 1970
Guinea pig	Yanagimachi, 1972
Mongolian gerbil	Noske, 1972
Monkey	Gould et al, 1973
Rat*	Toyoda & Chang, 1968 (Toyoda & Chang, 1974)
Dog	Mahi & Yanagimachi, 1976
Cattle	Iritani & Niwa, 1977
Swine	Iritani et al, 1978
Sheep	Dahlhausen et al, 1980
Goat	Kim, 1981

* ( ) : Young born after transfering embryo fertilized in vitro.

* College of Agriculture, Kangweon Nationa University

實用的 段階에는 이르지 못하고 있는 실정이다.

本稿에서는 체외수정에 대한 一般的 技術過程과 家畜에 있어서 體外受精의 硏究現況을 紹介하고, 問題點을 檢討하기로 한다.

Ⅱ. 實驗方法의 槪要

體外受精의 實驗操作은 일반적으로, 1) 精子 및 卵子의 준비, 2) 受精 및, 3) 受精의 判定의 과정으로 구분된다.

1. 精子의 준비

精子는 受精에 앞서 受精能獲得(capacitation)의 과정을 거쳐야 하므로, 體外受精에서 第一의 技術過程은 수정능을 획득한 정자의 준비가 된다.

體外受精에 使用되는 精子는 射精된 射出精子와 精巢上體內에 貯留된 精子를 外科的으로 採取하여 사용하는 두가지 방법이 있으며 精液의 採取가 가능한 家畜은 射出精液을, 射出精液의 採取가 어려운 實驗小動物의 경우는 外科的으로 精巢上體尾部의 精子를 採取하여 使用한다.

精子가 卵子의 透明帶(zona pellucidae)를 통과하고 卵細胞質內에 침입하여 受精을 完遂하기 위하여 受精能獲得(capacitation)과 先體反應(acrosome reaction)이라 불리는 生理 및 機能的 變化를 거친다(Fig. 1).

따라서 體外受精에 사용되는 정자는 人工的으로 受精能獲得의 처리과정이 先行되어야 한다.

1) 交配後回收精子 : 交配後 一定時間(動物別 受精能獲得時間)에 수정능을 획득한 정자를 회수하는 방법으로 자연상태에 가깝고, 초기 체외수정의 연구과정에 널리 이용되어온 방법이다.

정자는 자궁에서 난관으로 移送되는 과정에서 受精能을 획득하게 되므로 卵管內 精子를 回收하는 것이 완전한 방법이 되겠으나, 난관내에 이송된 정자수는 극히 적으므로 통상 子宮腔內의 精子를 회수하여 사용한다.

2) 精巢上體精子 : 외과적으로 채취한 정소상체미부의 정자는 動物種에 따라 적당한 培養液(Table 2)내에서 일정한 시간(體內 受精能獲得에 要하는 시간) 前培養한다.

3) 射出精子 : 家畜精液은 배양액에 희석한 후에 원심분리하여 精漿部分을 제거한 후에 ① 人工培養液(chemically defined medium)의 단독 또는 ② 卵胞液(Follicular fluid)이나 血淸(serum)을 첨가한 배양액내에 일

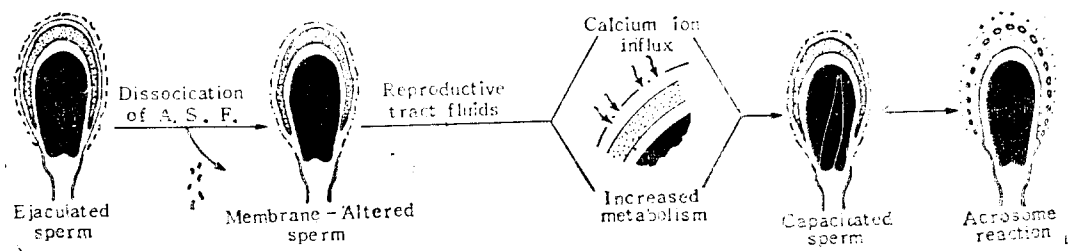

Figure 1. Sequence of events required to capacitate sperm (Oliphant & Eng, 1981)

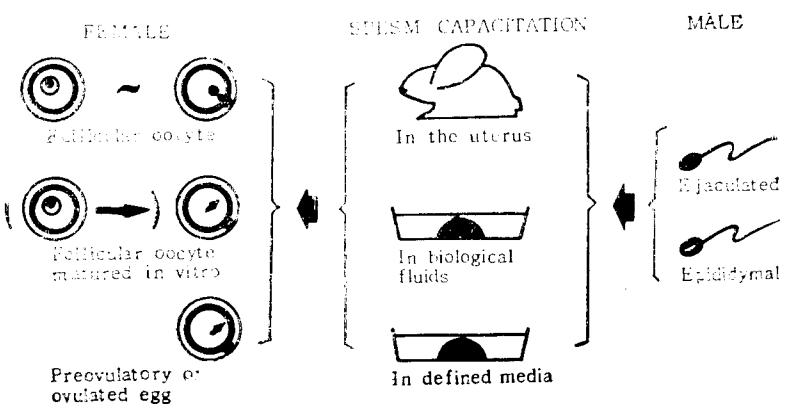

Figure 2. Gametes Used for in vitro Fertilization in Mammals.

정시간 전배양하거나 ③ 摘出한 同種 또는 異種의 子宮內에서 5시간 내외 체외배양(37°C, 생리식염수)하여 수정능획득 정자를 준비한다.

2. 卵子의 준비

內因 혹은 外因性의 LH放出에 의하여 卵胞內卵子에 일어나는 變化는 卵核胞의 崩壞(germinal vesicle break down: GVB)이고, 계속해서 成熟分裂은 中期에 들어가 잠시 머문 후 배란직전에 제1극체(first polarbody)를 방출하는 제2성숙분열의 중기(second metaphase stage)의 단계에서 멈추된다.

난자의 성숙에 수반되는 변화는 정자에 대한 反應性이다. 즉, 卵子내에 침입한 정자의 두부가 雄性前核(male pronucleus)으로 발육되는 것은 第1成熟分裂 中期(HCG주사후 10시간) 이후이다.

體外受精에 사용되는 난자는 1) 排卵直前에 成熟卵胞나 排卵直後에 卵管上端部(卵管膨大部)에서 採取한 신선한 成熟卵子를 利用하는 것이 가장 理想的이라 하겠으나, 2) 卵巢內의 成熟過程에 있는 未成熟卵子(第1成熟分裂 中期以後) 또는 3) 體外의 人工培養液內에서 成熟시킨卵子가 利用된다(Fig. 2).

3. 受精(또는 媒精)

體外受精에 이용되는 기초배양액의 組成(Tabie 2)중 無機鹽類의 濃度는 Krebs-Ringer bicarbonate(KRB)液(mouse, rat, guinea pig)과 Tyrode液(hamster, 兎, 사람)과 같으며, 연구자에 따라 glucose, pyruvate, lactate, 牛血淸 albumin(BSA) 및 抗生物質이 調整 첨가된다. 이밖에 필요에 따라 不活化(56°C, 30~60分)된 血淸과 卵胞液 등의 體液(body fluid)이 첨가(5~25%)된다. 一般的으로 배양액의 滲透壓은 血淸과 等張(約 308 mosmol)이고, 動物種에 따라 염화나트륨(Nacl)의 量을 증가시켜 高張液(407mosmol : Brackett& Williams, 1968)이 사용된다.

체외수정시 정자의 적당한 농도는 연구자에 따라 일정하지 않으나 정자부유액의 정자농도가 낮으면 정자의 활력이 떨어지고, 높으면 多精子侵入(polyspermy)의 발생율이 높아지며, 지나치면 수정이 일어나지 않으므로 활력이 떨어지지 않는 범위내에서 정자수를 조절할 필요가 있다.

배양액의 水素이온農度(pH)와 배양액의 液量도 動物種에 따라 體外受精의 중요한 要因으로 지적되고 있다.

4. 受精의 判定

수정의 판정은 연구목적에 따라 1) 受精途上 2) 受精完了期 및 3) 受精完了後에 실시된다. 체외수정의 완전한 판정은 檢査卵을 雌性動物에 移植하여 胎兒發生을 검토하는 것이 되겠으나 時間과 경제상의 문제가 수반되므로 수정도상이나 수정완료 직후에 검사하는것이 일반적이다.

수정초기의 판정은 세포질내에 침입하여 膨大한 정자의 두부, 雄性前核의 형성 및 제2극체의 방출을 확인한다. 체외수정의 경우는 未受精卵이 活性化되어 雌性由來의 前核이 1개 또는 2개가 발생하는 單爲發生(parthenogenesis)의 경우가 있으므로 정자미부의 同伴여부를 확인하여 수정의 증거로 삼는다. 第1 및 第2卵割期에서는 卵球와 染色體異常의 檢出이 포함된다.

Ⅲ. 家畜의 體外受精의 現況

1. 牛의 體外受精

소의 체외수정에 있어서 기금까지 연구 보고된 중요한 결과는 Table 3과 같다.

Sreenan(1970)은 體外成熟시킨 卵胞卵과 射出精子를 卵胞液 또는 組織培養液內에서 體外受精하여 확실한 수정의 근거를 관찰하지 못하였으나, 발정한 암컷의 卵管內에 소 정자를 주입하여 1~7.5시간후에 소의 成熟卵子를 移植한 결과 2~8세포기의 受精卵을 얻었다.

Bregulla 等(1974)은 卵胞에서 採取한 1,977個의 卵胞卵을 10%의 牛胎兒血淸(fetal calf serum)을 첨가한 Ringer 또는 TC199培養液中에서 배양한 후에, 子宮頸管粘液과 子宮內容液 및 子宮內의 體內培養等의 前處理한 정자와 體外受精(24~84시간)한 결과 배양액에 卵胞液을 첨가한 실험구에서 2세포기의 난자 1개, 4세포기의 난자 2개, 5세포기의 난자 2개 및 9세포기의 난자 1개를 얻었으나 수정의 확실한 증거는 관찰하지 못하였다. Baker와 Polge도 50個의 卵胞卵을 體外培養하여 摘出子宮內에서 4~6시간 前培養한 射出精子와 체외 수정하였으나 卵子內 정자의 侵入結果는 얻지 못하였다.

이상의 연구결과는 受精의 判定基準이 不確實하여 受精의 可否를 단정짓기 어려우나, 1977년 Iritani와 Niwa는 牛卵胞卵을 修正 KRB液內에서 20~24시간 體外培養하여 成熟시킨 卵子(約 60%)와 발정한 소의 난관과 자궁 및 토끼자궁에서 3~4시간 前處理시킨 사출정자를 체외수정하여, 1) 精子의 卵子內侵入, 2) 中片部와 尾部의 卵細胞質內存在, 3) 雌雄前核의 形成 및, 4) 第2極體의 放出等의 體外受精의 確實한 證據를 提示하였다(Fig. 3). 그러나 人工培養液(m-KRB)에서 前培養(12~14시간)한 정자는 卵子內侵內에는 미치지 못

Table 2. Chemically defined media used fertilization in vitro

Component	Brakett (1970)	Biggers, Whitten & Whittingham (1971)	Toyoda, Yokoyama & Hoshi (1971)	Toyoda & Chang (1974)
NaCl	112.00mM	95.59mM	119.37mM	94.6mM
KCl	4.02	4.78	4.78	4.78
$CaCl_2$	2.25	1.71	1.71	1.71
KH_2PO_4	—	1.19	1.19	1.19
NaH_2PO_4	0.83	—	—	—
$MgSO_4$	—	1.19	1.19	1.19
$MgCl_2$	0.52	—	—	—
$NaHCO_3$	37.00	25.07	25.07	25.07
Glucose	13.90	5.56	5.56	5.56
Na pyruvate	—	0.25	1.00	0.55
Na lactate	—	21.58	20.00	21.58
BSA	3mg/ml	3mg/ml	10mg/ml	4mg/ml
Penicillin	31μg /ml	100unit/ml	75μg/ml	75μg/ml
Streptomycin	—	—	50μg/ml	50μg/ml
pH	7.8	7.4~7.5	7.4~7.5	7.4~7.6
Animal	Rabbit	Guinea pig	Mouse	Rat

Table 3. Summary of in vitro fertilization methodology in cattle.

Investigator	Sperm source & preparation	Source & Condition of eggs	Culturemedium	fertilization criteria
Sreenan(1970)	Ejaculated sperm: fresh or diluted	Ovarian oocytes in culture	Follicular fluid or growth medium	—
Bregulla, et al(1974)	Uterine sperm	Ovarian oocytes in culture	Ringer's sol. or TC199+10% FCS	A few eggs cleaved
Baker & Polge(1976)	Uterine sperm	Ovarian oocytes in culture	—	—
Iritani & Niwa(1977)	Uterine sperm: in vitro(3—4h)	Ovarian oocytes in culture	modified KRB	Enlarged sperm head, polar body & pronucleus
Brackett, et al(1980)	Ejaculated sperm	Ova ovulated or just before ovulation	HIS, m-Tyr.(BW) —pyruvate. HamF 10+10% FCS	Enlarged sperm head, pronucleus & cleavage (4-cell)

FCS: Fetal calf serum; m-Tyr. (BW): modified Tyrode's medium by Bracket & Williams; HIS: High ionic strength medium.

하였다(Table 4).

最近, Brackett 等 (1980)은 소의 정자를 高張液(NaCl 152mM)으로 처리한 후에 等張液(NaCl 112mM)에서 전배양한 사출정자와 배란직전 또는 배란직후의 성숙한 25개의 난자를 受精培養한 결과, 수정란 16개(56%) 중에서 24시간에 2個, 48시간에 4個가 각각 2세포기와 4세포기로 分割하였다고 보고하고 있다.

이들 결과는 表層粒(cortical grauales)의 崩壞를 受精의 證據로 제시하고 있으나 1) 表層粒의崩壞는 受精과 반드시 일치한다고 볼 수 없으며(Barckett, 1979), 2) 同一한 追試의 結果가 없는 點等을 감안할 때 今後追試의 餘地가 남아 있다.

2. 豚의 體外受精

돼지의 체외수정에 있어서 중요한 연구보고의 결과를 Table 5에 요약하였다.

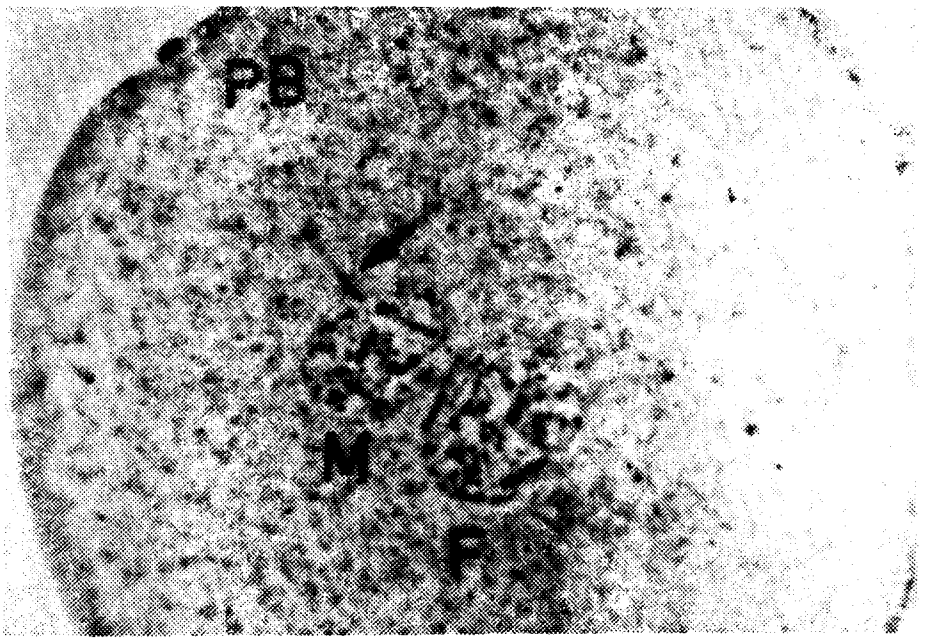

Figure 3. Bovine oocytes fertilized in vitro (Iritani & Niwa, 1977) PB: Second polar body; M:male pronucleus; F: female pronucleus; Arrow: sperm mid-piece.

Table 4. The fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture (Iritani & Niwa, 1977)

Preincubation of spermatozoa	No. oocytes cultured	No. oocytes maturing to M-Ⅱ(%)	No. oocytes fertilized(%)
12～14h in m-KRB	62	38(61.3)	0(0.0)
3～4h in cow oviduct	48	29(60.4)	6(20.7)
3～4h in cow uterus	44	27(61.4)	5(18.5)
12～14h in rabbit uterus	78	47(60.3)	10(21.3)

Table 5. Summary of in vitro fertilization methodology in swine.

Investigator	Sperm source & preparation(h)	Source & condition of eggs	Culture medium	Fertilization criteria
Harms & Smidt(1970)	Uterine sperm(3)	tubalo ova*	TC199, serum, F. fluid.	polar body, pronucleus
Iritani et al.(1978)	Epididymal & ejaculated sperm	Ovarian oocytes matured in culture	m-KRB	eggs penetrated cleavaged & pronucleaus
Meinecke(1978)	Ejaculaed sperm: storaged & washed	tubal & ovarian ova matured in culture	TC 199 serum, F. fluid.	pronucleaus cleavage

* ova collected from oviduct after ovulation

돼지는 多排卵動物이므로 自然排卵卵子와 卵胞內卵子가 體外受精에 흔히 사용된다. 正常性週期의 19日(發情開始後)에 HCG 500IU를 靜脈注射하면 약 42시간 후에 배란이 일어나고, 교배시키면 배란난자는 3시간 이내에 정자의 침입을 받아 14～16시간이 경과하면 2細胞期에 도달한다(Hunter, 1974).

Table 6. The fertilized in vitro of pig oocytes matured in cattle (Iritani, et al, 1978)

Preincubation of Spermatozoa	Spermatozoa	No. oocytes examined	No. oocytes fertilized(%)
4.5~5 h in	Ejaculated	19	0(0.0)
m-KRB	Epididymal	17	1(5.9)
4.5~5 h in	Ejaculated	24	4(16.7)
pig oviduct	Epididymal	28	9(32.1)
4.5~5 h in	Ejaculated	27	8(29.6)
pig uterus	Epididymal	36	14(38.9)

Table 7. Summary of in vitro fertilization methodology in sheep

Investigator	Sperm source & preparation	Source & condition of eggs	Culture medium	Fertilization criteria
Thibault & Dauzier(1961)	Uterine sperm (11~24h)	Tubal ova	Locke	Sperm penetration(3/56)
Dondioli & wright(1979)	Ejaculated sperm (3h)	Tubal ova	Locke	Sperm penetration(14%), cleavage(8%)
Dehlhausen, et al(1980)	Ejaculated sperm	oocytes in culture	Ham F_{10}+Serum	2nd polar body(4/6), cleavage(2/6)

Harms와 Smidt(1970)는 처녀태양한 卵胞卵子와 체지의 난포액과 난관액내에서 수정능을 획득시킨 정자를 체외수정에 사용하여 각각 19.4%와 18.9%의 卵胞卵子가 수정되었고, HCG注射後 42~43시간에 採取한 過排卵卵子를 射出精子 또는 交配後 3시간에 자궁에서 회수한 정자와 체외수정한 결과 42%, 44%의 난자에서 수정의 確證(제2극체와 전핵형성)을 관찰하였다. 배양액은 TC199에 同種의 血清 또는 卵胞液을 同量(1 : 1) 첨가되었다.

Iritani等(1978)은 未成熟卵胞卵을 m-KRB液內에서 24시간 體外培養하여 射出精子 또는 精巢上體精子와 體外受精한 結果(Table 6) 사출정자의 경우에 m-KRB, 적출난관 및 적출자궁에서 각각 4.5~5시간 前培養한 결과 0%, 16.7%, 및 29.6%의 受精卵을 관찰하였고 精巢上體精子의 경우는 同一條件에서 5.9%, 32.1%, 38.9%로 사출정자에 비하여 우수한 성적을 얻고 있다(Table 6).

이와같은 결과는 受精能獲得過程에서 精子被覆抗原(sperm coating antigen)이 비교적 적은 정소상체 정자가 유리하였던 것으로 추측된다.

Meinecke(1978)은 排卵 또는 卵胞內卵子를 射出精子, 洗淨精子 및 子宮內精子와 體外受精한 結果, 排卵卵子의 경우가 卵胞內卵子 보다 受精率(14/110 : 1/489)이 높았다고 보고하고 있다.

3. 緬羊의 體外受精

면양의 경우 射出精子와 排卵卵子를 體外受精하면 受精이 일어나지 않으나 交配 12~24시간 후에 자궁경 또는 자궁각에서 회수한 정자를 受精시키면 卵子는 정자의 침입을 받아 제2극체를 방출하고 雌雄前核이 형성되는 것으로 보아 면양정자의 경우도 受精에 앞서 受精能獲得이 필요한 것을 시사하고 있다(Dauzier & Thibault, 1959).

최근, Bondioli와 Wright(1979)은 排卵卵子와 合成卵管液(SOF液) 내에서 전처리(3시간)한 사출정자를 수정시켜 14%의 정자침입율과 8%의 分割卵을 얻어, 體外에서 受精能獲得의 가능성을 입증하였다.

한편 Dahlhauten 等(1980)도 PMS와 HCG의 처리에 의하여 採取한 卵胞內卵子(28개)를 體外에서 第2成熟分裂中期(7개)로 배양, 射出精子와 함께 배양(6개)하여 제2극체를 방출한 卵子 4개와 分割卵子 2개를 얻었다고 보고하였다(Table 7).

4. 山羊의 體外受精

산양은 대가축과는 달리 外科的으로 卵子의 採取가 용이한 뿐만 아니라 經濟的인 利點에도 불구하고 體外受精에 供用된 報告는 드물다.

Kim(1981)은 PMS와 HCG의 처리후 採取한 過排卵卵子와 PMS처리후 發育卵胞에서 採取한 卵胞卵을 사

Table 8. In vitro fertilization of goat oocytes with capacitated spermatozoa. (Kim, 1981)

Egg source & condition(zona)		Sperm source & preparation			No. eggs fertilized/examined(%)
		Sperm	culture medium(hr.)		
Egg: ovulated	(intact)	EP	KRB	(8)	0/ 2(0.0)
	(intact)	EJ	R. utr	(5)	0/ 7(0.0)
	(intact)	EJ	G. utr	(6.5)	0/ 6(0.0)
Oocyte* : cultured	(intact)	EP	KRB	(8~10)	0/13(0.0)
	(free)	EP	KRB	(8~10)	1/6(16.7)
	(intact)	EP	R. utr	(5)	0/10(0.0)
	(free)	EP	R. utr	(5)	5/5(100)
	(intact)	EP	G. utr	(5)	0/2(0.0)
	(free)	EP	G. utr	(5)	2/3(66.7)

1) Oocytes collected on the onset of estrus induced by PMS injection and matured for 25hr. in the m-KRB medium.
EP; Epididymal spermatozoa. R. utr: Rabbit uterus
EJ; Ejaculated spermatozoa. G. utr; Gilt uterus

응하여 射出 또는 精巢上體精子와 體外受精하였다.

精子의 受精能獲得誘起를 위하여 1) 修正 Krebs-Ringer bicarbonate(m-KRB)液, 2) 未經產雌豚의 摘出子宮 및 3) 토끼의 摘出子宮內에서 前培養하였다. 卵胞卵(卵核胞期)은 m-KRB液內에서 25시간 成熟培養시킨후에 일부는 無處理(zona-intact)로 일부는 透明帶를 제거(zona-free)하여 授精에 供用하였다.

上記의 方法으로 前處理한 精子와 卵子를 體外受精한 結果, 無處理區의 卵子(zona-intact)에는 정자의 침입이 일어나지 않았으나 透明帶를 除去하면 m-KRB液(1/6 : 17%), 토끼자궁(5/5 : 100%) 및 돼지자궁(2/3 : 67%)에서 전처리한 정자의 침입이 확인(雄性前核 및 尾部) 되었다(Table 8).

Ⅳ. 結　言

家畜의 경우 排卵卵子와 卵胞內卵子 및 射出精子와 精巢上體의 精子가 體外受精에 供用된 成功例가 보고되고 있으나 受精率이 극히 낮으며, 人工培養液에 의한 체외수정에는 이르지 못하고 있다.

현단계에서 가축의 體外受精術은 매란 직후 또는 직전의 成熟卵子와 發情雌畜의 生殖器내에서 前處理한 정자를 수정하는 것이 最良의 방법이 되겠다.

가축의 체외수정은 實驗動物에 비하여 ① 卵細胞質內에 脂肪球가 顯著하여 수정의 初期判定이 어렵고, ② 많은 수의 성숙난자의 입수가 곤란하므로 多樣한 培養條件의 검토가 어려울 뿐 아니라, ③ 實驗設計와 實施에 막대한 실험비가 소요되는 문제등으로 인하여 受精能獲得因子에 대한 결정적인 보고가 없는 실정에 있다.

今後, 가축정자의 生體 또는 摘出生殖器 및 培養液內 처리 등의 문제를 비교 검토하여 수정능획득에 필요한 시간을 재검토하고 체외수정(受精成立)의 임계한 배양조건을 검토하는데 필요한 成熟排卵卵子의 代用으로 屠殺畜에서 採取하여 體外에서 培養한 성숙난자와 實驗小動物의 透明帶를 除去한 난자등의 활용방안의 검토가 기대된다.

References

1. Baker, R.D. and Polge, C. 1976. Fertilization in swine and cattle. Can. J. Anim. Sci. 56 : 105—119.
2. Biggers, J.D., Whiten, W.K. and Whittingham, D.G. 1971. The culture of mouse embryo in vitro. In:Method in mammalian embryology(ed. Daniel)., Freeman, pp. 86—116, Table6—5.
3. Bracket, B.G. 1970. In vitro fertilization of mammalian ova. Adv. Biosci. 4 : 73—94.
4. Brackett, B.G. 1979. In : Animal reprod. in agri. (ed. Hawk, H.W. et al) pp. 171—193.
5. Brackett, B.G. and Williams, W.L. 1968. Fertilization of rabbit ova in a defined medium. Fertil. Steril. 19 : 114—155.
6. Brackett, B.G., Oh, Y.K., Evans, J.F. and Donawick, W.J. 1978. In vitro fetilization of cow

ova. Theriogenology 9 : 89(abstr.)

7. Brackett, B.G., Oh, Y.K., Evans, J.F. and Donawick, W.J. 1980. Fertilization and early development of cow ova. Biol. Reprod. 23 : 189—205.
8. Bregulla, K., Gerlach, U. and Hahn, R. 1874. Versuche zur extrakorporalen Reifung, Befruchtung und Embryonenzucht mit Rinderkeimzellen. Dtsch. Tierarztl. Wschr. 81 : 465—470.
9. Chang, M.C. 1959. Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature 184 : 466—467.
10. Dahlhausen, R.D. et al. 1980. Theriogenology, 13 : 93 (abstr).
11. Dauzier, L. and Thibault, C. 1959. Compt. Acad. Sci., 248 : 2655—2656.
12. Edward, R.G., Bavister, B.D. and Steptoe, P.C. 1969. Early stages of fertilization in vitro human oocytes matured in vitro. Nature (London) 221 : 632—635.
13. Gould, K.G., Cline, E.M. and Williams, W.L. 19 73. Observations on the induction of ovulation and fertilization in vitro in the squirrel monkey (Saimiri Sciurens) Fertil. Steril. 24 : 260—268.
14. Hamner, C.E., Jennings, L.L. and Sojka, N.J. 19 70. Cat (Felis catus, L) Spermatozoa required capacitation. J. Reprod. Fertil. 23 : 477—480.
15. Harms, V.E. and Smidt, D. 1970. In vitro fertilization of follicular and tubal eggs of swine. Ber. Muench. Tieraerztl. Wochenschr. 83 : 269—275.
16. Hoppe, P.C. and Pitts, S. 1973. Fertilization in vitro and development of mouse ova. Biol. Reprod. 8 : 420—426.
17. Hunter, R.H.F. 1974. Chronological and cytological details of fertilization and early embryonic development in the domestic pig. Sus scrofa. Anat. Rec. 178 : 169—186.
18. Iritani, A. and Niwa, K. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert. 50 : 119—121.
19. Iritani, A., Sato, E. and Nishikawa, Y. 1975. The fertilization of pig follicular oocytes in vitro with capacitated spermatozoa. Jap. J. Fertil. Steril. 20 : 404—409.
20. Iritani, A., Niwa, K. and Imai, H. 1978. Sperm penetration in vitro of pig follicular oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert. 54 : 379—383.
21. Iwamatsu, T. and Chang, M.C. 1969. In vitro fertilization of mouse eggs in the presence of bovine fluid. Nature (London) 224 : 919—920.
22. Kim, C.I(1981) In vitro fertilization of goat oocytes with capacitated spermatozoa. Doctoral Dissertation, Kyoto Univ. pp. 53—60.
23. Mahi, C.A. and Yanagimachi, R. 1976. Maturation and sperm penetration of canine overian oocytes in vitro. J. Exp. Zool. 196 : 189—195.
24. Meinecke, B. 1978. Z. Tierzüchtg. Züchtgsbiol., 94 : 198—208.
25. Noske, I.G. 1972. In vitro fertilization of the Mongolian gerbil egg. Experientia. 28 : 1348—1350.
26. Oliphant, G. and Eng, L.A. 1981. Collection of gametes in laboratory animals and preparation of sperm for in vitro fertilization. In: Fertilization and Embryonic Development in vitro (ed Mastroianni & Bigers) Plenum press. pp. 11—26.
27. Pickworth, S. and Chang, M.C. 1969. Fertilization of chines hamster eggs in vitro. J. Reprod. Fertil. 19 : 371—374.
28. Sreenan, J.M. 1970. In vitro maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes. J. Agric. Sci. 75 : 393—396.
29. Stepoe, P.C. and Edwards, R.G. 1978. Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet 2 : 366.
30. Thibault, C. 1973. In: The regulation of mammalian Reprod. (eds. Seagal, S.J. et al) 221—239.
31. Thibault, C., Dauzier, L. and Wintenberger, S. 1954. C.R. Soc. Biol.(Paris) 148 : 789.
32. Toyoda, Y. and Chang, M.C. 1968. Sperm penetration of rat eggs in vitro after dissolation of zona pellucida by chymotrypsin. Nature (London) 220 : 589—591.
33. Toyoda, Y. and Chang, M.C. 1974. Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of the eggs following transfer. J. Reprod. Fertil. 36 : 9—22.
34) Toyoda, Y., Yokoyama, M. and Hoshi, M. 1971. Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. Jap. J. Anim. Reprod. 16 : 147—151.
35. Yanagimachi, R. 1972. Fertilization of guinea pig eggs in vitro. Anat Rec. 174 : 9—20.
36. Yanagimachi, R., Chang, M.C. 1963. Fertilization of hamster eggs in vitro. Nature. 200 : 281—282.