

투명대 제거 햄스터난자를 이용한 인간정자 침투능에 관한 연구

경희대학교 의과대학 산부인과학교실(불임클리닉)

김재명 · 서병희 · 이재현

진국대학교 축산대학

정 길 생

Analysis of Human Spermatozoal Fertilizing Ability Using Zona-free Hamster Oocyte

J.M. Kim, M.S., B.H. Suh, M.D. and J.H. Lee, M.D.

*Infertility Clinic, Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine,
Kyung Hee University*

K.S. Chung, Ph. D.

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

ABSTRACT

An in vitro fertilization assay employing zona-free hamster embryos was used to investigate human spermatozoal fertilizing ability. Yanaghimarchi et al.(1976) first introduced this cross species fertilization technique, with its application as a diagnostic tool for male infertility.

Human spermatozoa were preincubated for 3 to 4 hrs in B W W medium at concentration of 4×10^6 sperm/ml prior to the addition to zona-free hamster embryos. After 3 hrs, human sperm was evaluated for fertilizing potential by the presence of swelling or decondensing sperm head in the cytoplasm.

The results of penetration rates for sperm were as follow :

1. The average penetration rate of a 7 fertile donor group was $47.8 \pm 27.67\%$ (Range 14.3-98.0%)
2. The average penetration rate of 12 infertile patients with normal semen analysis was $21.7 \pm 26.9\%$ (Range 0-38.8%)
3. The average penetration rate of 10 infertile patients with semen abnormalities was $6.1 \pm 8.1\%$ (Range 0-25%)

서 론

남성에 있어서 가임능력의 평가는 사출된 정액의 질에 의해 좌우된다. 정액농도는 가임능력이 있어서 중요한 요인의 하나로 알려져 있으며, 정자밀도가 $10 \sim 20 \times 10^6/ml$ 이하면 불임의 원인

으로 받아들여지고 있다. 그러나 Davis등에 의하면 $10 \times 10^6/ml$ 의 정액성상을 지닌 남성군의 3%가 가임능력을 지녔고, $100 \times 10^6/ml$ 이상의 정액성상을 지닌 남성군에서 25%가 불임이었다고 보고하였다. 정액에 있어서 운동성이 있는 정액의 페센트 또한 불임진단에 중요한 요인이다. 오랜 기간동안 정액검사는 정액량, 정액농도, 정자

운동성 및 기형정자율등을 검사하는 현미경적 검사, 성교 후 자궁경부 점액검사 및 항정자 항체 검사 등이 실시되어 왔다. 그러나 현미경적 검사는 무정자증, 정자회소증 및 정자 사멸증 등의 평가를 제외하고 불임의 원인 검사에 낮은 연관성을 지니며 성교 후 자궁경부 점액검사와 항정자 항체 검사는 여성측과 남성측의 원인을 종합하여 평가할 수 있다는 점에서 실시되고 있으나, 아직 표준화가 되어있지 않고 검사 결과의 해석에 어려움이 많다.

1976년 Yanagimachi은 인간정자가 투명대 제거 햄스터 난자를 수정시킬 수 있다는 보고 이래, 여러 연구자들에 의해서 남성 불임의 진단 방법으로 햄스터 투명대 제거 난자가 널리 이용되고 있다. 바로 사출된 정자는 난자와 직접 접촉하고 있어도 난자를 수정시킬 수 있는 능력이 없다. 여성 생식기 도내에 체류하는 동안 정자는 수정능력(capacitation)을 획득하며, 여러 실험 조건에 의해서도 유지 될 수 있다.

수정능에 필요한 시간은 종에 따라서 다르며, 일반적으로 인간정자는 서너시간을 요한다고 한다. Yanagimachi에 의하면 사출된 정자라 할지라도 capacitation이 정자 모두에서 발생하는 것이 아니며, 동시에 사출된 정자라 할지라도 각 인각색으로 capacitation에 필요한 시간의 차이가 크다고 하였다. 또한 임신한 경험이 있는 대조군의 정액도 각개인마다 차이가 있어 투명대 제거 햄스터 난자를 수정시킬 수 있는 범위가 크며, 정자의 배양시간과 농도 등 실험 조건에 따라서도 수정률에 변이가 크다고 하였다.

본 연구는 ①정상적인 정액성상을 보이는 불임 남성군 ②비정상적인 정액성상을 보이는 불임 남성군 및 ③임신한 경험이 있는 남성군(대조군) 등 3군으로 나누어 투명대 제거 햄스터 난자를 이용하여 정자의 수정능을 조사하여 얻은 결과를 보고하는 바이다.

대상 및 방법

1. 공시정액

공시정액은 48시간 이상 금욕한 불임증으로 추정되는 환자와 제공자(donor)가 수음법으로 멸균된 용기에 사정한 것을 상온에서 30분 동안 정치시킨 후 일정소량을 취하여 정자의 농도, 운동성 및 정액의 량등을 조사한 후 실험하였다.

2. 공시 동물

공시동물은 Golden Hamster를 사용하였다. 이들 중 공란 햄스터는 8~10주령이었으며, 일조시간 14시간과 온도가 일정하게 조절되는 사육실에서 사육하였으며 급이와 급수는 무제한으로 급여하였다.

3. 배양액

정자의 세척 및 난자와 정자의 배양액으로는 B.W.W.(Biggers, Whitten, Whitten, 1971) 배양액을 사용하였으며, pH는 7.2~7.4로 조정하였다. 배양액은 0.2 μ m의 millipore filter(German Science, Inc. U.S.A)를 사용하여 여과 시킴으로서 세균을 제거하였다.

4. 난구세포 및 투명대 제거 용액

햄스터 난자의 난구세포를 제거하기 위해서 0.1% Hyaluronidase를 함유한 B.W.W.배양액을 한편 투명대를 제거하기 위해서는 BSA가 함유되어 있지 않은 B.W.W.배양액 20ml에 PVP(polyvinylpyrrolidone, Sigma, U.S.A) 20mg과 Trypsin(Sigma, U.S.A) 100mg이 함유된 용액을 0.2 μ m의 Millipore Filter로 여과하여 냉동보관 하였다가, 사용하기 직전에 용해 원심분리하여 사용하였다.

실험 방법

1. 다배란 유기

Golden Hamster의 다배란을 유기하기 위하여 오후 5시에 마리당 30IU의 PMSG(Folligon Intervet, Holland)를 복강에 주사한 후, 48~52시간째에 동일한 방법으로 30IU의 HCG(Chorulon, Intervet, Holland)를 복강에 주사하여 다배란을 유기하였다(Fig. 1).

2. 난자의 회수

HCG주사 15~16시간 후에 경추 파열법으로 햄스터를 도살하여 난관을 적출한 후, 실제 현미경하에서 전술한 배양액으로 난관을 관류하여 난자를 회수하였다.

3. 난구세포 및 투명대 제거

회수된 햄스터 난자를 0.1% Hyaluronidase가 함유된 배양액에 노출시켜 난구세포를 제거한 후, 신선한 배양액으로 3회 이상 세척하였다. 한

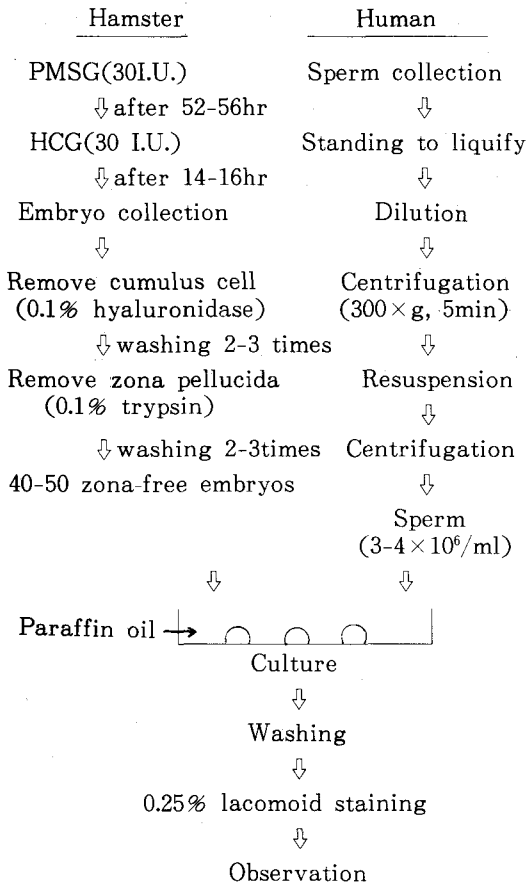


Fig. 1. Experimental procedures for assessment of human sperm fertilizing capacity.

편 투명대 제거를 위해서 Trypsin용액에 노출시켜, 실제 현미경하에서 투명대가 거의 연화되었을 때 다른 신선한 배양액으로 옮겨서 3회 반복 세척하였다.

4. 인간정액의 수정능 획득 및 햄스터 난자의 수정

수음법에 의해 사출된 정액을 일정한 시간동안 상온에 방치하여 액화시킨 다음 300×g에서 5분간 원심분리하여, 상층액을 제거한 후 배양액을 첨가하여 정자를 재 부유시켰다. 이어 300×g에서 5분간 원심분리하여 재차 상층액을 제거한 후 배양액을 첨가하여 3~4×10⁶/ml의 정자수로 조정하였다. 세포배양용 Petri-dish에 각각 0.1ml의 소적을 만들고, 그 위에 Paraffin oil을 피복하여 2~3시간전배양하여 정자의 수정능력을 획득시킨 후, 투명대 제거 햄스터난자를 소적에 넣어 3시간동안 배양하였다.

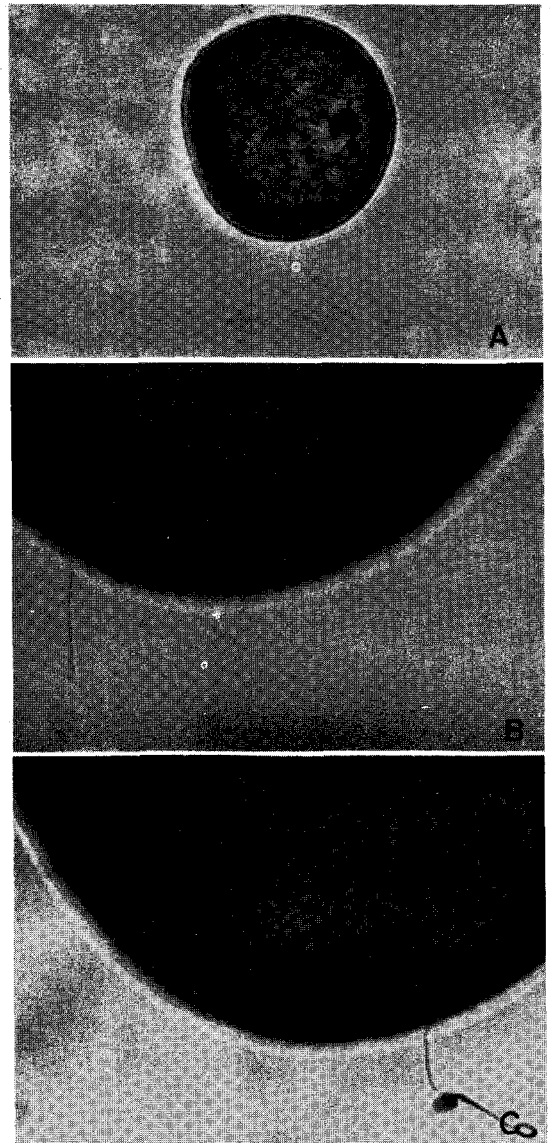


Fig. 2. Cross-species fertilization using hamster eggs and human spermatozoa. A. egg with four swollen sperm heads(Arrows). B. C. swollen sperm heads under a higher magnification (Arrows).

5. 햄스터난자 수정여부의 판정

95% ethanol으로 세척한 slide glass위에 cover glass의 네귀에 맞도록 waselin 소적(waselin : paraffin=15 : 1)을 만든 후, 그 중앙에 햄스터난자를 적하시킨 후 cover-glass를 덮어서 조심스럽게 눌렀다. 1% glutaraldehyde를 slide glass와 cover glass 사이에 침투시켜 난자를 1차고정시킨 후, 10% formalin용액

Table 1. Semen Characteristics and Sperm Penetration Capacity for Donor of Proven Fertility (N=7)

Donor No.	Semen Characteristics			Penetration Capacity	
	Volume ml	Total Count cell $\times 10^6$	Motility %	Penetration %	Polyspermy mean no. sperm/egg
1	2.1	286.4	63.2	28.6	1.8
2	3.3	357.7	50.6	29.5	2.4
3	1.8	127.3	45.0	14.3	1.4
4	2.4	230.4	58.2	98.0	3.6
5	3.8	220.4	62.12	62.0	1.2
6	2.0	153.0	57.0	47.8	0.9
7	1.6	118.6	52.6	54.6	0.4
Mean \pm SEM	2.4 \pm 0.8	213.4 \pm 88.0	55.5 \pm 6.52	47.8 \pm 27.67	1.67 \pm 1.06
Range	1.6 - 3.8	118.6 - 357.7	45.0 - 63.2	14.3 - 98.0	0.4 - 3.6

Table 2. Semen Characteristics and Sperm Penetration Capacity for Infertile Couples with Normal Semen Analysis (N=12)

Patient No.	Semen Characteristics			Penetration Capacity	
	Volume ml	Total Count cell $\times 10^6$	Motility %	Penetration %	Polyspermy mean no. sperm/eggs
1	2.0	69.0	51.0	10.0	2.8
2	2.1	120.8	39.5	22.9	0.8
3	1.5	117.8	49.8	10.4	0.2
4	2.0	324.8	63.5	11.0	0.1
5	2.3	168.4	52.7	6.8	0.7
6	5.0	112.5	52.5	0.0	0.0
7	3.0	142.8	28.8	0.0	0.0
8	1.2	68.6	57.0	38.8	0.4
9	1.0	50.2	52.0	19.1	1.2
10	2.1	94.9	46.1	14.3	0.6
11 ^a	1.8	100.8	58.2	12.5	0.2
12	2.4	203.0	56.4	25.0	0.4
Mean \pm SEM	2.2 \pm 1.0	131.2 \pm 74.7	50.7 \pm 8.8	21.7 \pm 26.9	0.62 \pm 0.78
Range	1.0 - 5.0	50.2 - 324.4	28.8 - 63.5	0.0 - 38.8	0.0 - 2.8

a less than 20 aggs analyzed

에 24시간 침투시킨 다음, 증류수로 수세하였다. 수세된 slide glass를 95% ethanol 용액에 담궈 탈수시킨 후 0.25% lacomid(25mg/ml lacomid in 45% acetic Acid) 용액을 침투시켜 염색한 후, cover glass 주위를 manicure로 봉입한 다음 위상차 현미경하에서 난자의 수정여부를 판별하였다. 체외수정의 판정은 제2극체의 방출, 세포질내 침입한 정자두부의 팽대, 정자 미부의 관찰 및 응성 전핵의 확인등을 기준으로 하여 실시하였다(Fig. 2).

실험 성적

수음법에 의해 채취된 정액을 전술한 방법으로 정자농도를 4×10^6 /ml motile sperm을 조정하여 0.1ml의 소적을 만들어 2~3시간 전 배양한 후 40~50개의 투명대 제거 햄스터 난자를 혼합하여 3시간 배양한 후 염색하여 실험결과를 조사하였다.

본 실험은 1군: 가임능력을 지닌군 (대조군 N=7) 2군: 비정상적인 정액성상인 불임남성군

Table 3. Semen Characteristics and Sperm Penetration Capacity for Infertile Couples with Abnormal Semen Analysis(N=10)

Patient No.	Semen Characteristics			Penetration Capacity	
	Volume ml	Total Count cell $\times 10^6$	Motility %	Penetration %	Polyspermy mean no. sperm/eggs
1	1.5	1.0	45.0	25.0	0.4
2	6.0	19.6	13.5	0.0	0.0
3	2.1	11.2	41.8	6.1	0.1
4	3.0	64.5	15.0	0.0	0.0
5	0.8	18.5	32.0	8.3	0.2
6	2.3	47.5	38.8	0.0	0.0
7	3.0	20.0	43.0	11.0	0.4
8	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0
9	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0
10	1.6	97.2	36.3	10.2	0.2
Mean \pm SEM	2.4 \pm 1.4	28.5 \pm 31.7	26.5 \pm 17.7	6.1 \pm 8.1	0.13 \pm 0.16
Range	0.8 + 6.0	0.0 - 97.2	0.0 - 45.0	0.0 - 25.0	0.0 - 0.4

(volum < 1 ml or count < 20 $\times 10^6$ /ml or motility < 40%, N=12) 및 3군 : 정상적인 정액성상인 불임남성군(N=10) 등 29명을 대상으로 하였다.

이전에 임신을 경험한 7명(대조군)의 평균 정액량은 2.64ml, 평균 정자수는 $213.4 \pm 88.07 \times 10^6$ /ml, 운동성은 $55.5 \pm 6.5\%$ 였으며, 햄스터 난자의 침투율(penetration rate)은 $47.8 \pm 27.67\%$ 로서 그 범위가 14.3 ~ 98.2%를 나타냈으며, 난자당 침투한 평균 정자수는 1.67 ± 1.06 개 었다(Table 1). 이와같이 대조군에서도 각 개인에 따라서 침투율에 있어서 큰 변이를 나타냈다.

정상인의 정액성상인 불임남성 12명의 평균 정액량은 2.2 ± 1.0 ml, 정자수는 $131.2 \pm 74.7 \times 10^6$ /ml 운동성은 $50.7 \pm 8.8\%$ 로 대조군의 정액성상과 별다른 유의차를 나타내지 않는 반면, 침투율은 $21.7 \pm 26.9\%$ 로서 그 범위가 0 ~ 38.8%로 유의차가 있었고(p < 0.05) 난자에 침투한 평균 정자수는 0.62 ± 0.78 개 었다. 환자 6, 7례의 경우에서 정액세척 후의 정자의 운동성 및 형태학상 지적할만한 이상사항이 없었으나 침투율에 있어서 0%를 나타냈다. 환자 8례는 평균정자수가 대조군보다 적은반면 38.8%의 높은 침투율을 나타냈다.

비정상적인 정액성상을 지닌 10명의 불임남성군의 평균정액량은 2.43 ± 1.42 ml로서 대조군과 별 유의차를 나타내지 않는 반면, 정자수 $26.5 \pm 31.7 \times 10^6$ /ml 운동성 $26.5 \pm 31.7\%$ 침투율은 $6.1 \pm 8.1\%$ 로 그 범위가 0-25%였고 난자당 평균 침투

정자수는 0.13 ± 0.16 개 었다. 무정자증군 환자, 8 및 9례는 햄스터난자 처리시 hyaluronidase에 의한 단위발생여부를 알아보기 위해 실험결과 침투율 0%를 나타냈다(Table 3).

고 찰

Austin(1951)과 Chang(1951)에 의해 토끼정자가 암컷생식기도 내에서 수정능회득(capacitation)이 선행되어야 난자를 수정시킬 수 있다는 보고 이래 정자의 수정능에 대한 많은 연구들이 보고되었다.

사출된 정자는 정장에 부유되어있는 수정능 억제인자(decapacitation factor)에 피복되어 있는데, 이 정자 피복항원은 자궁과 난관을 통과하는 과정 또는 실험실내 배양조건에 의해서 제거되며, 수정능을 획득한 정자는 난관 상단부에서 첨체반응(acrosome reaction)을 일으키며, 난자와 수정이 일어난다고 한다. Yanaghimachi가 투명대 제거햄스터 난자를 이용하여 이종간의 정자 침투능검사(sperm penetration assay)를 실시한 이후 여러연구자들에 의해 불임남성 진단 방법으로 사용되고 왔다.

Overstreet등은 정상적인 정액성상을 갖고 있어도, 정자가 수정능을 획득하지 못하는 경우가 있으며 불임남성의 햄스터난자 침투율은 14 ~ 100%라 하였고, Karp등은 불임환자에서는 12%이하, 가임능력의 남성은 15%이상의 침투율

을 보이는데, 이들 차이에 대한 명확한 원인은 밝혀져 있지 않으며 일반적인 정액 검사방법과도 일치하지 않는다고 하였다.

본 실험에서 저자들의 경우 대조군의 침투율은 14.3-98.2%의 범위로 평균 47.8%를 나타냈고 정상적인 정액소견인 불임남성군에서는 0~38.8%로서 평균 21.7%인 반면, 비정상적인 정액성상이 불임군에서는 0-25% 범위로서 평균 6.1%의 침투율을 나타냈는데, 이 성적은 Ku등 Overstreet등 Karp등의 성적과 유사할 반면, Hall등, Barros등, Bela의 성적보다는 낮은 수치를 나타냈다.

Loputa등과 McMaster등은 인간정자가 인간 난자를 수정시키기 위해서는 적어도 3-4시간이 필요하고, 수정시의 정자농도가 중요하다고 한 반면, Hall등은 임신 가능군에서는 침투율이 총 정자수와 상관관계가 있으나 불임군에서는 정자의 운동성, 농도와 상관관계가 있다고 하였고, Overstreet등은 정자수와 침투율사이에는 관계가 없고, Barros등은 정자의 농도와 배양시간에 따라서도 침투율에 많은 변이가 있다고 하였다.

Zukerman등에 의하면 평균 정자수가 임신율 사이에는 상관관계가 나타나지 않고, Santomuro등은 정자의 운동성이 정자의 농도보다 임신율에 중요한 요인이라고 보고했다.

이상과 같이 정자의 수정능획득율은 일반적인 정액검사방법인 정액량, 정자농도, 운동성에 어느정도 상관관계가 있으나, 투명대 제거 햄스터 난자에 의한 정자의 수정능획득 여부를 검사하고, 정자수, 배양시간 및 여러 실험조건에 따라서 어떤 연관성이 있는지 좀 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

투명대 제거 햄스터난자를 이용해 정자의 수정능 획득여부를 검사하기 위해 29명 남성정액이 공시되었다. 각각 정액의 일정소량을 취하여 일반적인 검사 실시 후 이종간 수정을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대조군 7명의 평균 정액량은 24 ± 0.8 ml, 정자수 $213.4 \pm 88.1 \times 10^6$ /ml 운동성은 $55.5 \pm 6.52\%$ 였으며 침투율은 14.3~98.2%의 범위로 평균 47.8 $\pm 27.7\%$ 였다.

2. 정상적인 정액성상을 지닌 불임 남성군의 평균 정액량은 22 ± 1.03 ml 정자수 $131 \pm 74.7 \times 10^6$ /ml,

운동성 $507. \pm 8.8\%$ 이었고, 침투율은 0-38.8%의 범위로 평균 $21.7 \pm 26.9\%$ 였다.

3. 비정상적인 정액성상 불임남성군의 평균 정액량 2.43 ± 1.42 ml, 정자수 $28.5 \pm 31.7 \times 10^6$ /ml 운동성 $26.5 \pm 17.7\%$ 였고, 침투율은 0-25%의 범위로 평균 $6.1 \pm 8.1\%$ 였다.

참 고 문 헌

- 1) Bavister, B.D., Leibfried, M.L. and Lieberman, G. : *Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. Biol. Repro* 28 : 235-247, 1983.
- 2) Bolanos, J.R. and Overstreet, J.W. : *Human sperm penetration of zona free hamster eggs after storage of the semen for 48 hours at 2°C to 5°C. Fertil Steril* 37 : 536-541, 1983.
- 3) Baroson, R.A., Cooper, G.A. and Rosefeld, D. : *Ability of anti-body bound human sperm penetrate zona-free hamster ova. Fertil Steril* 36 : 778-783, 1981.
- 4) Broson, R.A., Dooper, G.W. and Rosenfeld, D.L. : *Complement mediated effects of sperm head directed human antibodies on the ability of human spermatozoa to penetrate zona-free hamster eggs. Fertil Steril* 40 : 91-95, 1983.
- 5) Cohen, J. and Weber, Rob F.A. : *In vitro fertilizing capacity of human spermatozoa with the use of zona-free hamster ova ; intra assay variation and prognostic value. Fertil Steril* 37 : 565-572, 1982.
- 6) Crosingnani, P.G. and Rubin, B.L. : *In vitro fertilization and embryo transfer. Academic press* : 101-193, 1983.
- 7) Gould, J.E. and Overstreet, J.W. : *What functions of the sperm cell are measured by in vitro fertilization of zona-free hamster eggs. Fertil Steril* 40 : 344-352, 1983.
- 8) Guelman, B.T., Blasoco, L. and Wolf D.P. : *Zona free hamster eggs and human sperm penetration capacity : A comparative study of proven fertile donors and infertility patients. Fertil Steril* 36 : 771-777,

- 1981.
- 9) Hall, J.L. : *Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. Fertil Steril 35 : 457-463, 1981.*
 - 10) Halme, J. and Hall J.L. : *Effect of pelvic fluid from endometriosis patients on human sperm penetration of zona-free hamster ova. Fertil Steril 37 : 573-576, 1982.*
 - 11) King, A.L. and Trounson, A. et al. : *Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoa under the zona pellucida. Fertil Steril 48 : 642-647, 1987.*
 - 12) Lanzendorf, A.E., Malony, M.K. and Veeck, L.L. : *A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. Fertil Steril 49 : 835-842, 1988.*
 - 13) Lassalle, L. Courtot, A.M. and Testart, J. : *In vitro fertilization of human and hamster oocyte by microinjection of human sperm. Gammate Res 16 : 69-78, 1987.*
 - 14) Martin, R.H. and Taylor, P.J. : *Effect of sperm concentration in zona-free hamster ova penetration assay. Fertil Steril 39 : 379-381, 1983.*
 - 15) Overstreet, J.W. and Hembree, W.C. : *Penetration of the zona pellucida of non-living human oocyte by human spermatozoa in vitro. Fertil Steril 27 : 815-831, 1976.*
 - 16) Quinn, P., Barros, C. and Whittingham, D.J. : *Preservation of hamster oocytes assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. J. Reprod. Fertil 66 : 161-168, 1982.*
 - 17) Roger, B.T. and Campen, H.V. et al. : *Analysis human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. Fertil Steril 32 : 664-670, 1979.*
 - 18) Roger, B.T. : *Mammalian sperm capacitation and fertilization in vitro : A critique of methodology, Gammate Res 1 : 165-233, 1978.*
 - 19) Roger, B.T. and Perreault, S.D. : *Variability in the human-hamster in vitro assay for fertility evaluation. Fertil Steril 49 : 204-211, 1983.*
 - 20) Sengoku, K. and Dukelow, W.R. : *Gonadotropin effects on chromosomal normality of hamster preinplantation embryos. Biol. Reprod 38 : 150-155, 1988.*
 - 21) Talbot, P. and Chacon, R.S. : *Ultrastructural observations on binding and membrane fusion between human sperm and zona-pellucida free hamster oocytes. Fertil Steril 37 : 240-248, 1982.*
 - 22) Vander Ven, and Binor, H.H. : *Effect of heterologous seminal plasma on the fertilizing capacity of human spermatozoa as assessed by the zona-free hamster egg test. Fertil Steril 40 : 512-520, 1983.*
 - 23) Weeda, A.J. and Cohen, J. : *Effect of purification or split ejaculation of semen and stimulation of spermatozoa by caffeine on their motility and fertilizing ability with the use of zona-free hamster ova. Fertil Steril 37 : 817-822, 1982.*
 - 24) Wolf, D.P. and Martin, M.O. : *Human in vitro fertilization and embryo transfer. Plenum Press, 297-326, 1984.*
 - 25) Yanagimachi, R. : *Zona-free hamster eggs ; Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. Gammate Res 10 : 187-232, 1984.*