

Hydrogel Chamber를 이용한 수정 및 배양

김 명 철

충남대학교 농과대학 수의학과

Utilization of Hydrogel Chamber for Fertilization and In Vivo Culture

M. C. Kim

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Chungnam National University

Summary

The in-vitro fertilization in human clinic and animal reproduction is a very important technique but the rate of success is still low.

When the in-vitro fertilization and culture of gametes or embryos were done under the condition which Hema hydrogel chamber were implanted into the peritoneal cavity of mouse, the in-vitro fertilization and development of embryos could be significantly improved and the cell-block under in-vitro culture could be overcome. Also, the Hema hydrogel chamber was very useful for the protection of isolated blastomeres.

It is concluded that the polymerized Hema (pHema) hydrogel chamber may be effectively used in the fields of embryo transfer and in vitro fertilization.

서 론

포유동물의 기전에 관한 지식의 발달은 체외에서의 처리의 용이함 때문에 체외수정에 의해 힘 입은 바 크다. 더 나아가서, 체외수정은 人醫臨床 및 動物繁殖에 상당한 중요성을 갖고 있다.

체외수정은 토끼, 마우스, rat, golden hamster, Chinese hamster, gerbil, 고양이, 개, 소 및 사람 등에서 이루어 졌다. 그러나 체외에서 수정된 卵의 태아 또는 출산까지의 발육 성공율은 토끼 및 쥐에서 약 20% 정도이다. 그리고 소에서는 더욱 낮다.

착상전의 마우스胚는 자궁외의 위치에 있을 경우에도 분할된다. 前眼房 및 雄 또는 雌마우스의 복강은 분할, 영양배엽 조직의 발달 및 자궁외 위치로의 이들 胚들의 이식을 도와준다.

토끼의 상실배는 雌마우스의 복강에 이식될 때 포배기로의 발달을 일으킨다. agar chip 계통은 nude blastomere의 수란관 환경으로의 직접적인 노출을 막아 주며, 부가해서, chips는 동일함을 증명할 수 있는 blastomere들을 임시로 보존한다. 그럼에도

불구하고, 이 계통의 유효성은 시간을 경과한 agar 의 분해로 감소된다.

Polymerized Hema (pHema)는 인체의학에서는 임상적용에 오랜 역사를 갖고 있는 반투명한, 확산성의, 생체에 사용할 수 있는, 그리고 생체에 해를 미치지 않는 hydrogel이다.

여기에서 다루고져 하는 내용은 hydrogel chamber의 제조방법, chamber 내에서의 수정 및 배양 그리고 chamber의 이용 가능성에 관한 검토이다.

Hydrogel chambers의 제조방법

PHema의 formulation 및 PHema chamber를 위한 반응제의 처치는 Fig. 1 및 Fig. 2와 같다.

Hydrogel chamber는 monomer로서 lowacid Hema를, cross linkers로서는 tetraethylene glycol dimethacrylate (TGD), ethylene glycol (EG)를 사용한다 (Polysciences, Inc., Warrington PA). Chamber를 주형하기 위하여, 3개의 원액을 준비하고 초자시험관에 위치시켰다: 용액A - 10ml의 Hema, 0.1ml TGD,

3.0ml EG 및 2.0ml 증류수의 혼합물: 용액B- 증류수 100ml에 40g을 용해한 1.0ml ammonium persulfate (initiator); 용액C- 증류수 100ml에 15g을 용해한 1.0ml sodium metabisulfite (coinitiator). 각 원액은 질소로 15분간 purge하고, 반응제를 혼합하여 압력하에 중합한다.

Hydrogel chamber는 71mm 길이, 3.5mm 직경의

Components	ml
Monomer:	
2-Hydroxyethyl Methacrylate (HEMA)	10
Crosslinkers:	
Tetraethylene glycol dimethacrylate (TGD)	0.1
Ethylene glycol (EG)	3.0
Distilled Water	2.0
Initiator:	
Ammonium persulfate, 40g / 100ml water	1.0
Co-initiator:	
Sodium metabisulfite, 15g / 100ml water	1.0

* Lee et al., *J. Bioengineer.*, 2:269-278, 1978.

Fig. 1. PHema formulation*

0.5ml 인슐린주사기(No. 8471, single use, plastipak LO-dose U-100; Becton Dickinson, NJ)를 실온에서 사용하여 주형한다. 주사침은 제거하고, Syringe로부터 plunger를 꺼내어, plunger 끝에 있는 gasket를 분리하여 다시 전도시켜 주입시킴으로써, plunger에 접해 있던 gasket의 부분이 주사기 내강을 향하게 하고, 전도된 gasket를 주사기의 50 unit mark에 위치시킨다. 1.5ml의 용액 A, 0.1ml의 용액B 및 0.1ml의 용액C를 3ml의 polyethylene syringe 내에서 혼합시켜서 주형 인슐린주사기에 주입시킨다. 인슐린 주사기에 0.5ml의 중합혼합물을 채운 직후에 1.7mm 직경의 Teflon tubing (Cole Parmer International, Chicago, IL)을 씌운, 5.6cm 길이, 0.9mm 직경의 stainless steel rod를 주사침연결부분을 통하여 통과시켜서, 반응제 혼합물을 거쳐서 gasket에 접촉시켜서 polymerizing gel이 hollow chamber를 형성하도록 한다. Steel rod가 들어 있는 Teflon tubing은 주사침 연결부분과 gasket의 내강에 의해서 barrel의 중심에 위치시킨다. 4cm 길이의, 3.5mm 직경의 stainless steel rod를 주사기 barrel의 flanged end에 삽입시키고, 주사기를 neoprene stoppers 사이에 끼우고 pipe

Tube A Mix in a 20 ml glass tube: 10 ml pHema*, 0.1 ml TGD', 3.0 ml EG', and 2.0 ml distilled water. Purge with nitrogen for 15 min. Molarity of crosslinker in hema=3.72 M.

Tube B Place 1.0 ml of a 1.75 M ammonium persulfate solution in a 5 ml glass tube. Purge with nitrogen for 15 min.

Tube C Place 1.0 ml of a 0.79 M sodium metabisulfite solution in a 5 ml glass tube. Purge with nitrogen for 15 min.

1. Take 1.51 ml of mixture from Tube A, 0.1 ml from Tube B, and 0.1 ml from Tube C, and mix within a 3.0 ml polyethylene syringe. Polymerization of Hema begins as soon as the initiator (Tube B) and co-initiator (Tube C) are mixed with the monomer (Hema) and crosslinkers. Therefore, mixing of A, B, C, should be done rather rapidly.

2. Fill each casting insulin syringe with 0.5 ml of the polymerizing mixture in the 3.0 ml polyethylene syringe. This volume of the mixture is sufficient to fill 3 insulin syringes and make approximately 15 chambers.

3. Apply pressure for 15 min.

*Hema=2-Hydroxyethyl methacrylate, low acid.

'TGD=tetraethylene glycol dimethacrylate.

'EG=ethylene glycol.

Fig. 2. Handling of reactants for pHema chamber

clamp의 jaws에 닿게 한다. Polymerizing gel에 기포가 안보일 때까지 clamp의 jaws를 조이고, 15분동안 압력을 가한다. 압력하의 중합이 15분간 일어난 후, 인슐린주사기로 부터 cast hydrogel을 제거하고, 가운데 위치한 rod가 들어 있는 teflon tubing을 cast hydrogel로 부터 제거하여, 5cm 길이의, 0.9mm 두께의, 1.7mm 강을 갖고 있는 hydrogel tube를 만든다. pHema hydrogel tube를 95% ethanol을 함유한 100ml 유리 비커에 위치시키고, nonpolymerized Hema

를 제거하기 위하여, 12시간 간격으로 ethanol을 교체하면서 96시간 동안 담가 둔다. Ethanol washing 후에, pHema tubes를 500ml의 증류수를 함유하고 있는 배지에 4시간동안 열을 가하고, 증류수를 교환하였는데, 이 과정을 12번 반복한다. 그 후, pHema tubes를 1cm 길이가 되게 razor blade를 사용하여 절단한다. 분절은 10X의 입체현미경 하에서 검검하고, 결함을 갖고 있는 것은 제거한다. Silastic adhesive 로 채운 2.16mm 직경의, 2mm 길이의 silastic

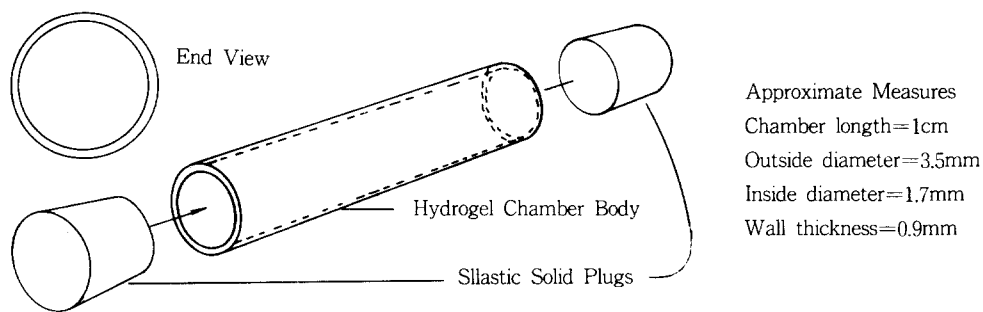


Fig. 3. pHema hydrogel chamber for the in vitro fertilization of embryos. Schematic representations of the chamber depicting general features and measures.

tubing (Dow Corning Corp., Medical Products, MI) 로 고체의 plugs를 만들고, chamber를 형성하도록 pHema tube의 양단을 막는 데 사용한다(Fig. 3). 2ml 유리앰플에 증류수를 주입하고, 1개의 hydrogel tube의 분절과 2개의 solid plugs를 위치시킨다. 앰플들은 120°C에서 40분동안 고압멸균처리한 후, fire-sealed 하고, 사용할 때까지 실온에 보관한다.

Chamber내에서의 수정 및 배양

Pollard와 Pineda(1988)는 토끼에서 자연교미후 14시간경에 수란관을 flushing 하여 회수한 embryos를 생리식염수로 채워진 pHema hydrogel chamber 내에 넣고 in vitro, male mouse 복강 또는 female mouse 복강내에 이식한 후 72시간경에 회수하여 배양상태를 확인하였는데 그 결과는 Table 1과 같다. Female mouse 복강내에서 배양하였던 1세포기의 토끼 embryos는 119개 중에서 68개가 포배기까지, 그리고 23개가 상실배기까지 배양되었으며, male

Table 1. Development of one-cell rabbit embryos during 72 hr of in vitro or in vivo culture in saline-filled pHema hydrogel chambers

Treatment	Number of embryos				
	Cultured	Degenerated	Retarded ^a	Morula	Blastocyst
In vitro controls	119	119	0	0	0
Male mouse	119	12	10	72	25
Female mouse	119	10	18	23*	68*

^aEmbryos that cleaved beyond the one-cell stage but did not advance to the morula stage.

*Significantly ($p < 0.0005$) different from the corresponding in vivo treatment group.

(Pollard and Pineda, 1988)

mouse 복강내에서 배양하였던 1세포기 토끼 embryos 는 119개 중에서 25개가 포배기까지, 그리고 72개가 상실배기까지 배양됨으로써, female mouse를 intermediate recipients로 사용할 때가 male mouse를 intermediate recipient로 사용할 경우보다 포배기로의 발육이 더 많이 되었다고 한다.

또한 Table 2에서 나타난 바와 같이 male 및 female mouse의 복강에 이식되었던 pHema chambers로 부터 회수한 188개의 상실배 및 포배를 雌兔의 좌측 또는 우측 자궁각에 이식하였던 바, 23두의 생존한 仔兔를 얻었다고 하며, female mouse의 복강내에서 배양된 embryos가 (20/91) male mouse의 복강내에서 배양된 embryos (3/97)보다 仔兔를

더 많이 생산하였었다고 한다.

金(1989)은 defined medium(4)으로 채워진 pHema hydrogel chamber내에 냉동용해된 卍당 1×10^2 의 牛精子를 넣고 female intermediate mouse recipient의 복강에 이식한 후 시간경과에 따른 정자 운동성을 관찰하였는 데 그 결과는 Table 3과 같다. mouse의 복강에 이식하기 직전인, 0시간에서는 Bull No. 1, 2, 3 및 4에서 각각 32, 28, 40 및 35%를 나타내었으나, 6시간에서는 각각 25, 23, 27 및 24%를 나타내었고, 12시간에서는 각각 15, 11, 13 및 12%를 나타내었으며, 시간이 경과할수록 유의성있는 운동성의 감소를 나타내었다고 한다.

또한 인공질법으로 채취된 토끼정액으로 부터 정장

Table 2. Viability after transfer of rabbit embryos cultured in vivo in saline-filled pHema hydrogel chambers

Recipient	Sex of intermediate mouse recipient	Number & stage of embryos transferred		Uterine horn	Fetuses ^a	Offspring born alive
		Morula	Blastocyst			
1	Male	7	3	Left	0	-
	Female	1	9	Right	0	-
2	Male	8	4	Right	0	-
	Female	-	11	Left	3	3
3	Male	6	2	Left	0	-
	Female	-	9	Right	3	3
4	Male	10	1	Right	0	-
	Female	-	13	Left	4	4
5	Male	7	1	Left	0	-
	Female	7	-	Right	0	-
6	Male	7	2	Right	0	-
	Female	1	7	Left	2	2
7	Male	11	2	Left	1	1
	Female	3	9	Right	4	4
8	Male	5	5	Right	2	2
	Female	-	9	Left	4	4
9	Male	7	1	Left	0	-
	Female	6	-	Right	0	-
10	Male	4	4	Right	0	-
	Female	5	1	Left	0	-
Total	Male	72	25	-	3	3
	Female	23	68	-	20	20

^aDetermined by laparotomy on day 25 of gestation.

(Pollard and Pineda, 1988)

Table 3. Frozen-thawed bovine sperm motility (%) in Hydrogel chambers implanted in the peritoneal cavity of intermediate mouse recipients

Bull No.	Duration of preservation (hours)				
	0	6	12	18	24
1	32	25	15	8	5
2	28	23	11	7	3
3	40	27	13	9	5
4	35	24	12	6	2
Mean ± S.D.	33.8** ± 5.06	24.8 ± 1.71	12.8 ± 1.71	7.5 ± 1.29	3.8 ± 1.50

**p<0.01

(Kim, 1989)

Table 4. Rabbit sperm motility (%) in Hydrogel chambers implanted in the peritoneal cavity of intermediate mouse recipients

Rabbit No.	Duration of preservation (hours)				
	0	6	12	18	24
1	95	70	37	23	11
2	75	55	24	12	7
3	80	65	26	18	6
4	70	60	28	12	3
5	85	70	31	16	10
Mean ± S.D.	81.0** ± 9.62	64.0 ± 6.52	29.2 ± 5.07	16.2 ± 4.60	7.4 ± 3.21

**p<0.01

(Kim, 1989)

을 제거하고 defined medium에 10^7 /ml의 농도에서 20분간 보관한 후, defined medium으로 채워진 pHema hydrogel chamber내에 냉동용해된 씨당 1×10^2 의 토끼정자를 female intermediate mouse recipient의 복강에 이식한 후 시간경과에 따른 정자 운동성을 관찰하였는데 그 결과는 Table 4와 같다.

mouse의 복강에 이식하기 직전인, 0시간에서는 Rabbit No. 1, 2, 3, 4 및 5에서 각각 95, 75, 80, 70 및 85%를 나타내었으나, 12시간에서는 각각 37, 24, 26, 28 및 31%를 나타내었고, 24시간에서는 각각 11, 7, 6, 3 및 10%를 나타내었으며, 시간이 경과할수록 유의성있는 운동성의 감소를 나타내었다고 한다.

한편 토끼에서 외과적 방법으로 수관관을 노출하여, defined medium으로 flushing 하여 난모세포를 채취하고, 인공질법으로 sperm을 채취한 후, defined medium으로 채워진 pHema hydrogel chamber내에 6개의 oocyte와 씨당 1×10^2 의 sperm을 넣고, female intermediate mouse recipient의 복강에 이식한 후

84시간 경에 chamber를 복강으로 부터 회수하여 수정 및 배양상태를 관찰하였는데 그 결과는 Table 5와 같다.

Donor 1에서는 변성상태 2, 상실배기 10, 포배기 6을 나타내었고, Donor 2에서는 변성상태 3, 상실배기 7, 포배기 8을 나타내었으며, Donor 3에서는 변성상태 3, 상실배기 3, 포배기 12을 나타내었고, Donor 4에서는 변성상태 3, 상실배기 2, 포배기 13을 나타냄으로

Table 5. Fertilization and culture of rabbit oocyte in Hydrogel chamber implanted in the peritoneal cavity of intermediate mouse recipients.

Oocyte donor	Degenerated	Molura	Blastocyst
1	2	10	6
2	3	7	8
3	3	3	12
4	3	2	13

(Kim, 1989)

서 in chamber fertilization 및 culture에 있어서 좋은 성적을 나타내었다고 한다.

Chamber의 이용 가능성

용성수태능력을 결정하는 데 있어서 중요한 것은 정액의 量 보다는 오히려 質이며, 정액평가는 volume, density, 운동성, 전진운동성 및 형태학적 특성의 5가지로 이루어 진다(11).

Table 3 및 Table 4에서 복강은 정자운동성의 보존을 도와 준다는 것을 알 수 있다.

토끼의 체외수정에서, Brackett 및 Oliphant (1975)는 배란된 신선 난자가 들어 있는 4.0ml의 defined medium에 0.1ml volume의 10^6 sperm cells 를 주입하였는 데, 金(1989)은 defined medium 1 0μl에 5~6개의 난모세포와 10^3 sperm cells를 주입하여 chamber내 수정을 이루었다.

in vivo culture에서 처리군의 신뢰성 있는 구분을 하는 데에 있어서의 실패와 embryos의 손실들은 胚生存에 대한 실험영향을 평가하는 데에 있어서 심각한 제한을 만든다. 그러나 Pollard 및 Pineda (1988)과 金(1989)의 pHema chambers를 이용한

in vivo culture에서는 卵들을 전부 회수함으로써, chamber의 이용은 embryos 실험에 있어서 평가의 신뢰도를 높였다.

Pollard 및 Pineda (1988)의 실험에서는 female mouse를 intermediate recipients로 사용하였을 때 119개의 oocytes를 배양한 결과 23개의 상실배와 68개의 포배를 나타내었고, hydrogel chamber내에서 배양된 이들 91개의 상실배 또는 포배를 recipient 토끼의 자궁각에 이식하였을 때 20두의 仔兔를 생산하였다고 한다. 그리고 金(1989)은 난모세포의 chamber 내 수정 및 배양에서 전체 난모세포들 중에

-
1. Transport of embryos in intermediate recipients
 2. In vivo culture of isolated blastomeres in partitioned pHema chambers
 3. Maturation of follicular oocytes and spermatozoal capacitation
 4. Collection of body fluids containing growth factors
 5. Evaluation of influence of agents on embryo viability
 6. In vivo culture of certain cells or tissues
-

Fig. 4. Potential uses of PHEMA chambers

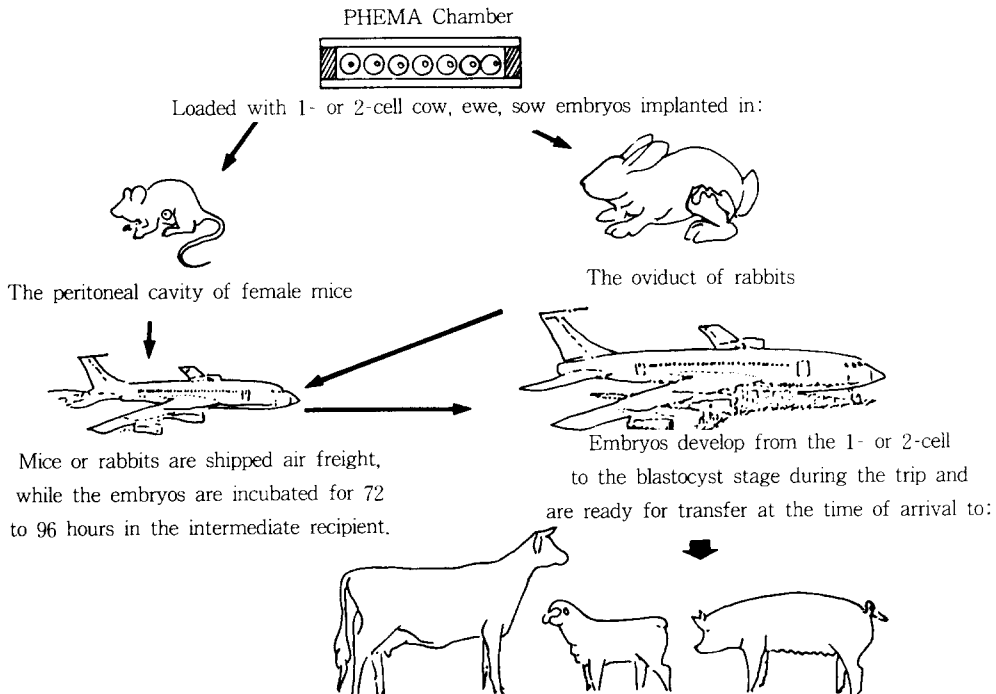


Fig. 5. Transport of embryos in intermediate recipients

서 약 85%가 상실배기 또는 포배기까지 배양되었다고 한다.

한편 분리된 blastomeres도 hydrogel chamber내에서 배양되었다는 보고도 있다(15, 16). 따라서 이러한 결과들은 Fig. 4~Fig. 10과 같은 pHema chambers의 이용가능성을 제시한다.

Intermediate recipients를 이용한 embryos의 수송은 Fig. 5와 같다.

1~2세포기의 소, 면양 및 돼지 embryos를 pHema chamber에 충전하고, female mice의 복강이나 토끼의 수란관에 이식하여 비행기로 수송하면, 수송하는 72~96시간 동안 intermediate recipient 내에서 배양이 이루어진다. 이 때 1 또는 2세포기로 부터 배양된 포배를 도착시에 이식준비하여 놓은 recipient에 이식할 수 있다.

분획된 pHema chambers에서 분리된 blastomeres를 in vivo culture 하는 방법은 Fig. 6과 같다. 4~8세포기의 embryos로 부터 분리된 blastomeres를 분획된 pHema chamber에 넣으면 포배기까지 발달될 수 있는 데, 이것을 분만을 위해 적당한 recipient에 이식할 수 있다.

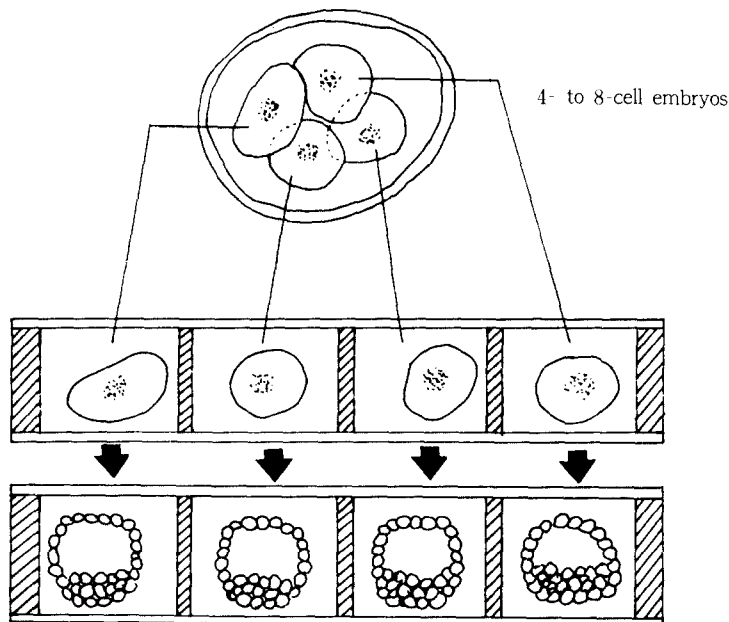
난포난모세포의 성숙 및 정자의 capacitation을 위해 Fig. 7과 같이 사용할 수 있다. 대부분의 종들에서, 난포난모세포의 수는 약 100,000~300,000으로 추정된다. 난소로부터 채취된 난포난모세포들과 non-capacitated sperm을 pHema chamber 내에 넣고 적당한 host에서 in vivo culture하면 정자의 capacitation 및 난모세포의 성숙과 수정이 일어난다.

성장인자들을 함유한 체액의 채취를 Fig. 8과 같이 할 수 있다.

pHema chambers는 어떠한 크기 또는 형태로도 주형될 수 있으며, chamber의 제조방법은 확산성을 증가 또는 감소시키기 위하여 수정될 수 있다. Chamber는 胚發育을 도와 주게 하기 위하여 다양한 종들 및 위치들에 이식될 수 있다. 적절한 기간의 in vivo culture후에, chamber를 이식위치로 부터 회수하여, 내용물을 胚의 culture medium으로 사용하거나, 성장인자들을 분리하여 구명할 수 있다.

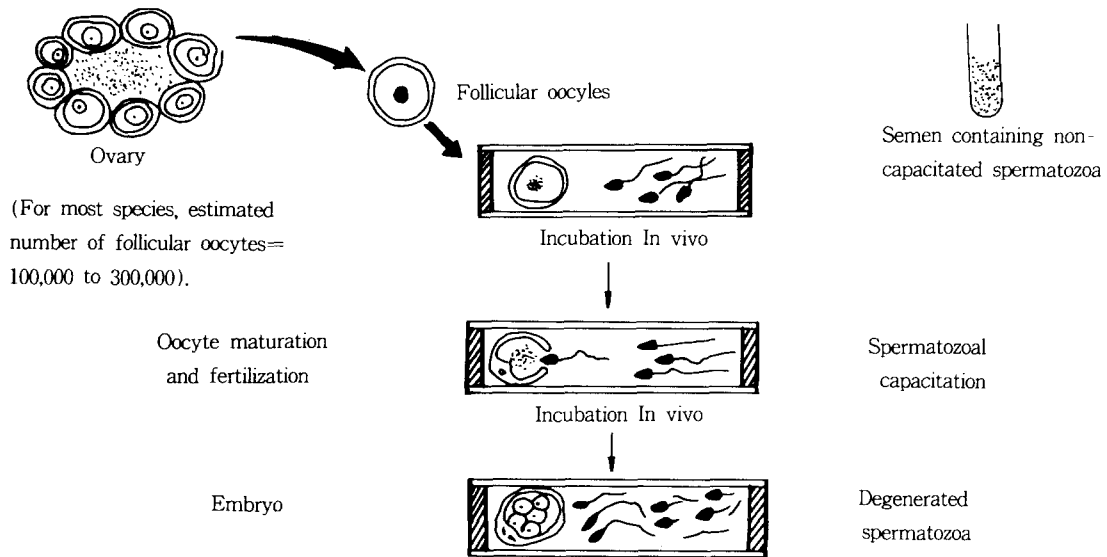
胚의 생존성에 대한 因子들의 영향을 Fig. 9와 같이 평가할 수 있다.

통제된 상태하의 환경 또는 독성 영향에 1~2 세포기의 embryos를 간헐적 또는 지속적으로 노출시킬



During a period of in vivo culture (mice peritoneal cavity or rabbit oviduct), the isolated blastomeres develop to blastocysts. These could then be transferred to appropriate recipient(s) for gestation to term.

Fig. 6. In vivo culture of isolated blastomeres in partitioned PHEMA chambers



The whole process of oocyte maturation, spermatozoal capacitation, fertilization and subsequent embryonic development could be achieved within PHEMA chambers, while the chambers are incubated in vivo in appropriate hosts.

Fig. 7. Maturation of follicular oocytes and capacitation of spermatozoa

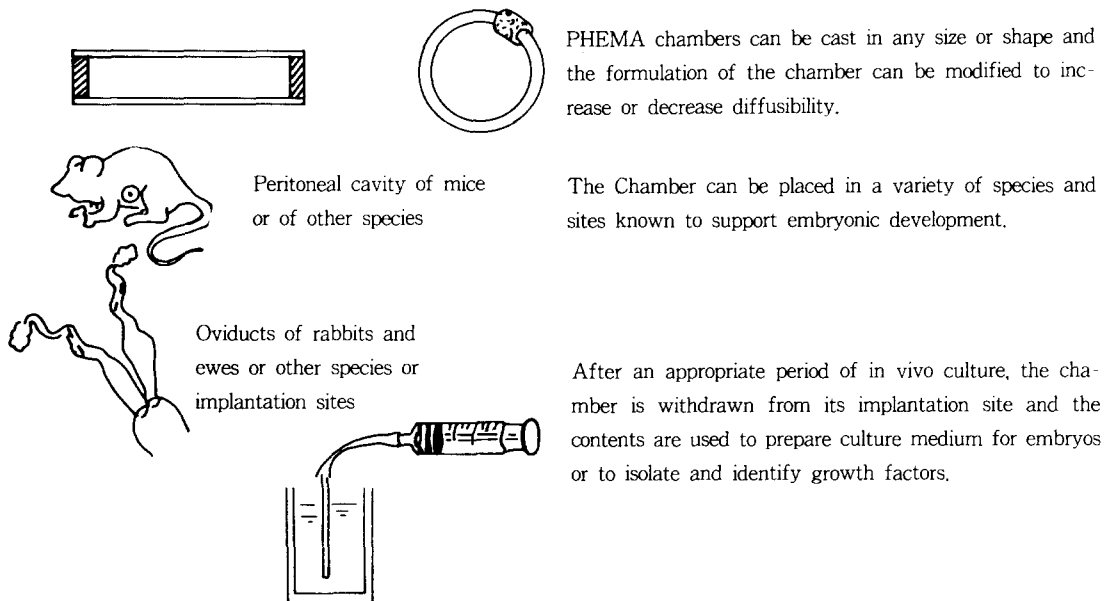


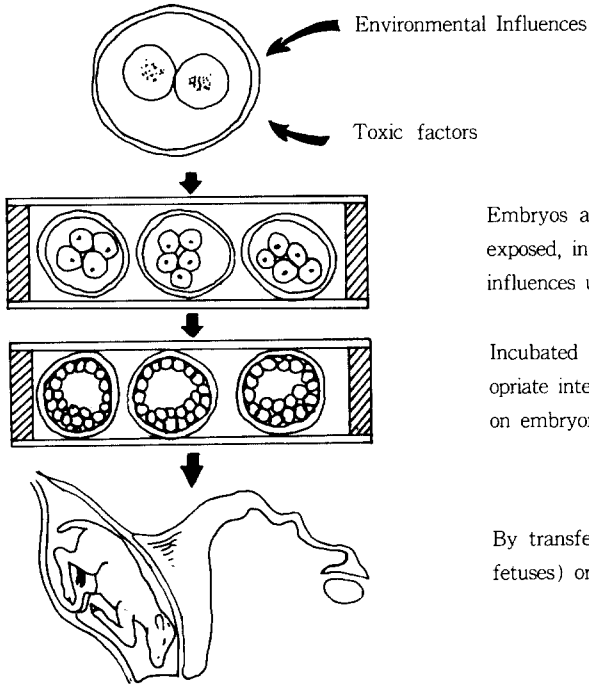
Fig. 8. Collection of body fluids containing growth factors

수 있다. dye-exclusion assays 등이 배발육에 대하여 미치는 영향을 평가하기 위하여 pHEMA chamber 내에서 in vivo culture 하거나, 또는 임신이나 생존태

아를 얻기 위하여 적절한 recipients에 이식한다. 세포 또는 조직들을 Fig. 10과 같이 in vivo culture 할 수 있다. 종양, 內分泌 또는 다른 세포나 조직, 그리

고 세균을 pHema chamber 내에 넣고 적절한 recipient 및 위치에 이식하면, 세포들의 source로서 사용하거나, 세포에 의해 생산된 비확산성 인자들을 분리

및 同定할 수 있다. chamber로 부터 확산된 因子들이 숙주들에 어떠한 영향을 미치는 가를 알아 볼 수 있다.



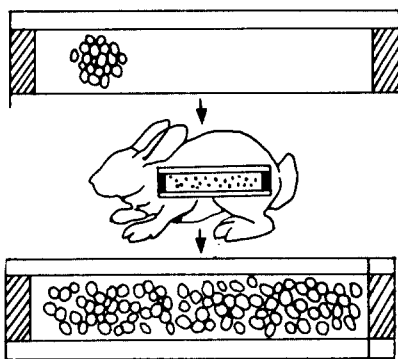
Embryos at early (1- or 2-cell) stages of development can be exposed, intermittently or continuously, to environmental or toxic influences under controlled conditions.

Incubated in vivo within PHEMA chambers implanted in appropriate intermediate recipients to evaluate the effects of exposure on embryonic development by dye-exclusion assays.

By transfer to appropriate recipients for gestation (evaluation of fetuses) or for the obtainment of live offspring.

Fig. 9. Evaluation of influence of agents on embryo viability

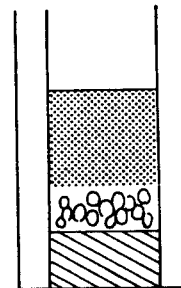
Tumor, endocrine, or other cells or tissues and bacteria could be cultured in vivo within PHEMA chambers implanted in the appropriate site and recipient.



As a source of cells

To determine the effects, on the host, of factors diffused from the chamber:

1. Antigens (vaccines, cancer?)
2. Hormones; treatment of certain diseases (diabetes?)
3. Other factors



or

To isolate and identify nondiffusible factors produced by the cells

Fig. 10. In vivo culture of cells or tissues

結 論

체외수정은 人醫臨床 및 動物繁殖에 상당한 重要性을 갖고 있는 데, 그 성공률이 높지 않은 실정이다.

Polymerized Hema (pHema)를 사용한 hydrogel chamber는 mouse 복강내에 이식하였을 경우에 in vivo fertilization 및 in vivo culture가 良好한 성적으로 일어나므로 체외수정시의 그 cell block을 우회하기 위하여 사용할 수 있으며, 특히 분리된 blastomeres를 배양시에 직접적인 노출을 막아 주며, 동일함을 증명할 수 있으므로 수정란이식 및 체외수정 등의 분야에 널리 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

參 考 文 獻

- Boland, M. P. 1984. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 21:126-137.
- Bowen, R. A. 1977. Fertilization in vitro of feline ova by spermatozoa from the ductus deferens. *Fert. Steril.* 17:144-147.
- Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F. and Dressel, M. A. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27:147-158.
- Brackett, B. G. and Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 12:260-274.
- Briones, H. and Beatty, R. A. 1954. Interspecific transfers of rodent eggs. *J. Exp. Zool.* 125:99-118.
- Coro, C. M. and Trounson, A. 1986. Successful fertilization, embryo development, and pregnancy in human in vitro fertilization (IVF) using a chemically defined culture medium containing no protein. *J. Vitro Fert. Embryo Transfer* 3:215-217.
- Chang, M. C. 1959. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature* 184:466-467.
- Edwards, R. G., Bavister, B. D. and Steptoe, P. C. 1969. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature (Lond.)* 221:632-635.
- Fawcett, D. W., Wislocki, G. B. and Waldo, C. M. 1947. The development of mouse ova in the anterior chamber of the eye and in the abdominal cavity. *Am. J. Anat.* 81:413-443.
- Iwamatsu, T. and Chang, M. C. 1969. In vitro fertilization of mouse eggs in the presence of bovine follicular fluid. *Nature (Lond.)* 224:919-920.
- Lipshultz, L. I. 1982. Beyond the routine semen analysis. *Fert. Steril.* 38:153-155.
- Mahi, C. A. and Yanagimachi, R. 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. *J. Exp. Zool.* 196:189-196.
- Noske, I. G. 1972. In vitro fertilization of the Mongolian gerbil egg. *Experientia* 28:1348-1350.
- Pickworth, S. and Chang, M. C. 1969. Fertilization of Chinese hamster eggs in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 19:371-374.
- Pollard, J. W. 1987. Controlled in vivo culture of mammalian embryos and blastomeres. Master of Science Thesis, Iowa State University.
- Pollard, J. W. and Pineda, M. H. 1988. Culture of rabbit embryos and isolated blastomeres in hydrogel chambers implanted in the peritoneal cavity of intermediate mouse recipients. *J. Vitro Fert. Embryo Transfer* 5:207-215.
- Ratner, B. D. 1981. Biomedical application of hydrogels: Review and critical appraisal. In *Biocompatibility of Clinical Implant Materials*, DF Williams (ed), Boca Raton, FL, CRC Press, Vol II, pp. 145-175.
- Seidel, G. E., Bowen, R. A. and Kane, M. T. 1976. In vitro fertilization, culture and transfer of rabbit ova. *Fert. Steril.* 27:861-870.
- Sreenan, J. 1970. In vitro maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes. *J. Agr. Sci., Cambridge* 75:393-396.
- 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.
- Yanagimachi, R. 1972. Fertilization of guinea pig eggs in vitro. *Anat. Rec.* 174:9-20.
- Yanagimachi, R. and Chang, M. C. 1963. Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature (Lond.)* 200:281-282.

Yanagimachi, R. and Chang, M. C. 1964. In vitro fertilization of golden hamster ova. J. Exp. Zool. 156: 361-376.

김명철. 1989. 소 및 가토에 있어서 Chamber내 수정에 관한 연구. 한국수정란이식연구회지. 4:21-27.