韓國臨床獸醫學會誌 第10卷 第1號
Korean J. Vet. Clin. Med.
Vol. 10, No. 1, June, 1993

# 개 정자의 수정능력 검정을 위한 Hamster test의 이용 가능성

이 해 이·김 용 준
전북대학교 수의과대학

## 서 론

최근 애완동물산업이 고도로 신장되면서 개의 繁殖效率의 향상은 큰 관심의 대상이 되고 있다. 특히 개에서 人工授精은 많은 관심과 연구의 대상이 되어 新鮮精液[18]을 이용한 受胎의 사례가 많이 보고되어 왔고 근래에는 凍結精液[18,25,31]도 이용되고 있다.

인공수정은 물론 번식효율을 고도로 향상시키는 기술로 인정되고 있는 受精卵移植術 및 體外受精에서의 정자의 수정능력은 가장 중요한 요인의 하나이므로 정자의 수정능력을 정확히 판정하는 것은 성공적인 수정과 번식을 위하여 매우 중요하다고 하겠다.

최근 Yanagimachi[37] 이후로 사람정자의 수정능력 판정에 이용되고 있는 햄스터검사(Hamster test)는 소[10,11,17,19], 돼지[8,9] 및 산양[7] 정자의 수정능력검사에도 시도된 바 있다. 그러나 개에서는 햄스터검사가 거의 시도되지 않았고 Yanagimachi[38]는 개의 수정능력 검정으로 햄스터검사가 성공되지 못한 것으로 보고하였으나 그후 Howard 등[22]은 최초로 고양이에서 햄스터검사가 정자의 수정능력판정에 가치가 있는 것으로 보고한 바, 이에 저자는 햄스터검사가 같은 육식수인 개에서도 이용가능할 것으로 추측되어 과거 번식력에서 차이를 보인 개들에 대하여 햄스터검사를 이용하여 정자의 수정능력 판정이 가능한지를 알아보고자 본 실험을 시도하였다. 동시에 개 정자의 활력에 따른 햄스터검사 성적을 비교하였다.

## 材料 및 方法

**精液의 準備 :**

**供試動物 :** 供試犬은 과거에 번식력을 나타낸 바 있는 2~3년령의 雜種牡犬 3두와 번식력을 보이지 않은 5년령의 雜種牡犬 1두를 대상으로 하였다.

**精液處理培地 :** 精液의 처리를 위하여 washing 배지와 배양배지로 나누어 사용하였으며, modified BWW(Biggers, Whitten, Whittingham) 배지[35]에 Bovine serum albumin[BSA, Sigma]을 0.3%첨가한 것을 washing 배지로, 3.5% 첨가한 것을 배양배지로 사용하였다. 배지의 pH는 7.4~7.6이었다.

**精液의 採取 :** 정액은 수지법으로 정액의 농축부분을 중심으로 채취하였다. 채취된 원정액 중 그 일부를 취하여 정액의 일반적 검사 즉, 活力, 精子數 및 畸形率검사에 사용하고 나머지는 washing배지를 혼합하여 200g에서 5분, 2회 원심분리시켜 washing한 후 배양배지를 적정량 혼합하여 4℃에서 보관하였다.

**實驗前處理 :** 실험전 정자에 대해 다음과 같은 조건을 부여하였다.

實驗 I : 과거 2년간 번식력을 보인 개와 번식력을 보이지 않은 개의 햄스터 검사성적을 비교하기 위하여 4두의 개 정액을 이용하였다. 번식력을 보이지 않은 개(subfertile)는 1두로서 과거 2년간 약 20두의 牝犬을 상대로 번식력을 나타낸 바 없는 牡犬이었다.

이 실험에 사용된 정액은 $Ca^{2+}$농도가 2.6mM이고 FCS(Fetal calf serum)가 첨가된 BWW배지로 washing하였고, 배양배지로 혼합하여 4℃에서 18~22시간동안 보존하였다.

정자수는 mℓ당 $1.5\times10^8$으로 조정한 후 그 희석정액으로부터 150μℓ를 취하여 35×10mm petri dish 내에 droplet을 만들고 paraffin oil로 덮어 1시간 내지 1시간 30분동안 37℃, 5% $CO_2$ incubator내에 보관하

였다.

**實驗 Ⅱ** : 정자의 활력이 햄스터검사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 과거에 번식력을 보인 3두의 개 정액을 이용하였으며 정자의 활력은 난자와 반응시킬 때의 활력으로서 60~80%, 30~50%의 두 등급으로 구별하여 햄스터검사 성적을 비교하였다.

이 실험에 사용된 정액은 $Ca^{2+}$의 농도가 1.3mM이고 FCS가 첨가된 BWW 배지로 washing하였고, 배양배지로 혼합하여 4℃에서 18~22시간동안 보존하였다. 정자수 조정 및 햄스터난자와 반응전 처리는 실험 Ⅰ과 같다.

**卵子의 準備** :

**供試햄스터** : 공시햄스터는 생후 5~7주령의 golden hamster로서 사육실은 오전 7시에 點燈하고 오후 8시에 消燈하여 明暗을 조절하였다. 사료는 마우스·랫트 연구검정용 고형사료(삼양사료)로서 자유급식시켰으며 물도 자유급수시켰다.

**過排卵處理** : 햄스터의 膣分泌物 존재여부를 검사하여 排卵후 분비물을 보이는 햄스터를 선택하였으며 당일 오전 10시에 pregnant mare serum gonadotrophin[PMSG, Intervet] 30IU를 腹腔內 주사하였고 약 56시간 후 human chorionic gonadotrophin[HCG, Intervet] 30IU를 주사하였다.

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

**卵子의 採取** : HCG주사 후 평균 16시간에 頸椎脫臼法으로 햄스터를 죽인 후 子宮, 卵管 및 卵巢를 외과적으로 적출하였고, 실체현미경하에서 난관을 washing 배지로 관류하여 난자가 포함된 난구세포들을 회수하였다. 난자를 포함한 난구세포는 0.1% hyaluronidase[sigma]에 10분간 정치시켜 제거시킨 후 난자를 회수하였다. 실험에 사용할 난자는 50배의 크기로 경검하여 그 형태가 양호하고 제1극체가 존재하는 난자만을 선택하였다. 난자는 washing 배지에서 3회 washing하였다.

**透明帶 除去** : Washing한 난자들을 0.1% bovine pancreatic trypsin[Sigma]에 수분간 정치하여 실체현미경하에서 관찰하였으며, 투명대가 제거된 난자들을 washing 배지에서 평균 5회 washing하였다. washing한 난자는 배양배지에 넣어 37℃, 5% $CO_2$ incubator 내에 보관시켰다.

**卵子와 精子의 反應** : 실험전 처리가 끝난 정자의 각 droplet 내에 20~25개의 투명대가 제거된 난자를 넣은 후 37℃, 5% $CO_2$ incubator내에서 5시간동안 반응시켰다.

**卵子의 固定** : 반응이 종료된 난자들은 난자에 부착된 정자들을 제거하고자 washing 배지로 평균 10회 washing하였다. washing은 실험군별로 실시하였고, washing후 난자들을 슬라이드상에 올려놓아 커버글라스로 덮고나서 1% glutaraldehyde를 點滴하였으며 그후 슬라이드를 Dulbecco's PBS[10% formalin 함유]에 넣어 약 24시간동안 고정시켰다.

**卵子의 染色** : 염색을 위하여 슬라이드를 증류수로 간단히 씻고 95% ethanol로 脫水시켰다. 그후 0.25% lacmoid로 수분간 염색하였다.

**檢査의 判定** : 염색을 마친 슬라이드는 위상차현미경하에서 400배로 경검하였다. 정자가 부착된 난자의 율(이하 정자 부착난자율)을 알아보기 위하여 실험군별 전체난자 중 정자가 부착된 난자수를 구하였으며 또한 각 난자별 부착된 정자수를 산정하였다.

정자의 난자침입은 난자내 정자꼬리가 확인된 정자로서 그 두부가 팽대되어 있거나 頭部核의 弛緩 및 그 진행과정을 보이는 정자만으로 판정하였으며, 정자가 침입된 난자의 율(이하 정자침입 난자율)은 실험군별 난자전체수에 대해 정자가 침입된 난자수로 구하였다. 또한 각 난자별 침입된 정자수를 산정하였다.

**結果分析** : 정자부착난자율, 난자당부착정자수, 정자침입난자율, 난자당침입정자수에 대하여 실험 Ⅰ은 ANOVA로 통계처리한 후 DUNCAN 다중검정, 실험 Ⅱ는 t 검정에 의해 실험군간 유의차를 구하였다.

## 結 果

**개체간 햄스터검사결과 비교** : 과거 번식력을 보인 개와 번식력을 보이지 않은 개의 정액에 대한 햄스터검사 결과는 Table 1과 같다.

정자부착난자율은 F-1이 SF-1보다 현저히 높은 난자율을 보였고($p<0.01$), F-2는 SF-1보다 유의성있게 높은 난자율을 나타내었다($p<0.05$). SF-1과 F-3간에 유의성있는 차이는 인정되지 않았다. 난자

Table 1. Comparison of Sperm Binding and Penetration between Fertile and Subfertile Dogs(Mean±SD)

| Indiv. No. | No.of eggs examined | Semen analysis at collection (mean %) | | Binding | | Penetration | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Motility | Abnormality | B%* | No.of sperm/egg | P%** | No.of sperm/egg |
| SF-1 | 214 | 94.28 | 7.66 | $24.81\pm13.88^{b,d}$ | $1.59\pm0.86^{b}$ | $15.49\pm8.75^{b,d}$ | $1.07\pm0.11^{b}$ |
| F-1 | 290 | 83.21 | 10.28 | $48.31\pm12.64^{a}$ | $4.18\pm1.43^{a,c}$ | $29.78\pm5.60^{c}$ | $2.26\pm0.83^{a,c}$ |
| F-2 | 236 | 87.50 | 6.45 | $44.09\pm16.23^{c}$ | $2.70\pm1.02^{d}$ | $32.93\pm9.71^{a}$ | $1.59\pm0.64^{d}$ |
| F-3 | 228 | 87.86 | 9.12 | $38.90\pm19.09$ | $1.97\pm0.86^{b}$ | $30.49\pm16.49^{c}$ | $2.10\pm0.57^{a}$ |

SF : subfertile, not proven to be fertile during the past two years. F : fertile
* : No. of eggs bound with sperm/Total No. of eggs examined.
** : No. of eggs penetrated by sperm/Total No. of eggs examined.
a,b : Different superscripts denote significant differences within columns($p<0.01$).
c,d : Different superscripts denote significant differences within columns($p<0.05$).

Table 2. Effect of Motility of Canine sperm on Sperm Binding and Penetration (Mean±SD)

| Motility at insemination | No. of experiments | No.of eggs examined | Binding | | Penetration | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | B%* | No.of sperm/egg | P%** | No.of sperm/egg |
| 60 ~ 80% | 4 | 64 | $44.86\pm32.08$ | $3.57\pm2.55$ | $35.28\pm27.31$ | $1.53\pm1.09$ |
| 30 - 50% | 6 | 140 | $38.92\pm17.65$ | $2.20\pm0.95$ | $24.55\pm19.17$ | $1.31\pm0.29$ |

* : No. of eggs bound with sperm/Total No. of eggs examined.
** : No. of eggs penetrated by sperm/Total No. of eggs examined.

당부착정자수는 F-1이 SF-1과 F-3보다 각각 현저히 높은 수를 나타내었고($p<0.01$), 또한 F-2보다는 유의성있게 높은 부착정자수를 나타내었다($p<0.05$). 그리고 SF-1, F-2, F-3 상호간에는 유의성있는 차이가 인정되지 않았다.

정자침입난자율은 F-2는 SF-1보다 현저히 높은 난자율을 나타내었고($p<0.01$), F-1과 F-3는 SF-1보다 각각 유의성 있게 높은 난자율을 나타내었다($p<0.05$). 그리고 F-1, F-2, F-3 상호간에는 유의성있는 차이가 인정되지 않았다. 난자당 침입정자수는 F-1과 F-3는 SF-1보다 각각 현저히 높은 정자수를 나타냈으며($p<0.01$), 또한 F-1은 F-2보다도 유의성있게 높은 정자수를 보였다($p<0.05$). F-1과 F-3 그리고 F-2와 F-3간에는 각각 차이가 인정되지 않았다.

**개 정자의 활력과 햄스터검사 결과 :** 정자의 활력에 따라 비교된 햄스터검사 결과는 Table 2와 같다.

정자부착난자율과 정자침입난자율 모두에서 60~80%군이 30~50%군보다 높은 수치를 보였으나 상호간에 유의성있는 차이는 보이지 않았다.

난자당부착정자수는 30~50%군이 60~80%군보다 낮은 수치를 보였으나 유의성있는 차이는 없었고 난자당침입정자수도 상호간에 유의성있는 차이는 인정되지 않았다.

## 考 察

개체간 비교에서는 과거 번식력을 보인 군이 번식력을 보이지 않은 군보다 햄스터검사의 모든 항목에서 높은 성적을 나타내었다.

정자부착난자율은 번식력을 보인 군이 38.9~48.3%이었고, 번식력을 보이지 않은 군은 24.8%이었다. 이 결과는 개에 대한 연구보고를 접하지 못해 비교할 수는 없으나 Kim[39]이 보고한 돼지의 정자부착난자율과 비교해 볼 때 돼지보다 낮은 부착난자율을 나타내었다.

난자당부착정자수는 번식력을 보인 군이 2.0~4.2의 범위를 나타내었고, 번식력을 보이지 않은 군은 1.6이었으나, Kim[39]은 돼지의 경우 59~74의 부착정자수 범위를 보고했고, Clarke와 Johnson[12]은 돼지 희석정액을 이용한 실험에서 부착정자수를 약 10정도로 보고하였는 바 이 실험에서의 부착정자수는 돼

지보다 낮게 나타났다.

정자침입난자율은 번식력을 보인 군이 29.8~32.9이고 번식력을 보이지 않은 군은 15.5%이었다. 이 결과는 개에 대한 햄스터검사 결과를 나타낸 보고를 접할 수가 없어 비교하기가 어려우나 Howard 등[22]이 고양이 정액을 이용한 실험에서 4.8~25.3%의 정자침입난자율을 보고한 것보다는 상회하는 성적이었다.

이 실험에서 번식력을 보인 군과 번식력을 보이지 않은 군간에 정자침입난자율에서 차이가 인정된 것은 다른 연구자들의 보고와 비교해 볼 때 Berger와 Parker[9]는 돼지에 대한 연구에서 번식력을 보인 돼지는 평균 84%, 번식력을 전혀 보이지 않은 돼지는 24%, 낮은 번식력을 보인 돼지는 36%의 정자침입난자율을 나타내었다고 하였고, Berger와 Horton[8]은 각각 93%, 11%의 정자침입난자율을 나타냈다고 보고했다.

한편 Berger[7]는 산양에 대한 연구에서 번식력이 있는 산양의 정자는 32~100%의 정자침입난자율을 나타내었음을 보고하였고, Brackett 등[11]은 소에 대한 연구에서 번식력을 보인 두 마리의 숫소가 각각 92.6%, 92.3%, Lorton과 First[26]는 90%, Graham과 Foote[19]는 80% 이상을 나타내었다고 각각 보고하였다. 사람정자에 대한 연구에서는 많은 연구자들이 번식력을 가진 남성의 정자는 11%이상[14,23,30,32,36] 또는 14~25%이상[3,15,16,21,24,27~29,33,34,38]의 정자침입난자율을 보인다고 하였고, 번식력을 보이지 않은 남성의 경우는 0~11%[24,28,30] 또는 35%이하[5,20]의 평균 정자침입난자율을 보고하였다.

이상의 보고들과 이 실험의 결과를 비교해 볼때 이 실험에서 번식력을 보인 군이 정자부착난자율 및 침입난자율에서 번식력을 보이지 않은 군보다 더 높은 성적을 나타낸 것은 상기의 보고들과 일치되는 것으로 사료된다. 한편 이 실험에서 번식력을 보인 개와 번식력을 보이지 않은 개를 구별할 수 있는 정자침입난자율의 기준은 번식력을 보이지 않은 동물수가 너무 적어 설정하기가 어렵다고 생각되나 번식력을 보인 개의 최저치인 29.8% 이상을 번식력이 있는 개로 인정할 수 있을 것으로 보인다.

난자당 침입정자수는 번식력을 보인 군이 1.6~2.3의 범위를 나타냈으며 번식력을 보이지 않은 군은 1.1이었다. Berger와 Horton[8]이 돼지정자를 이용한 실험에서 1.1~4.1의 침입정자수를 나타내었고, Hirsh 등[21]은 사람에서 한 난자당 2개 이상의 침입정자가 있을 때 受精能力이 있다고 보고하였다. 이 실험에서의 개의 침입정자수는 Hirsh 등[21]의 보고와 유사한 성적을 나타낸 것으로 사료된다.

Yanagimachi[37]는 개 정자를 이용한 연구에서 개 정자에 대하여 햄스터검사가 이용되지 못한다고 하였으나 이 실험에서 번식력을 보인 군이 번식력을 보이지 않은 군보다 정자부착난자율, 부착정자수, 정자침입난자율, 침입정자수에서 모두 높은 성적을 보인 것은 햄스터검사가 개 정자에 대해서도 수정능력 검사로 사용가능성이 있음을 시사하는 것으로 판단된다.

과거 번식력을 보인 바 있는 개만을 이용한 개 정자의 활력에 따른 비교에서 난자와 반응시 정자의 활력이 30~80%의 차이를 나타냈으나 햄스터검사 결과에서는 60~80%와 30~50% 군간 유의성있는 차이가 나타나지 않았다. 이 사실을 다른 연구자들의 연구와 비교해 볼때 Berger와 Parker[9]는 돼지정자를 이용한 실험에서 정자의 활력과 침입난자율과는 상관관계가 있다고 보고하였고, Aitken 등[2], Albertsen 등[4] 그리고 Berger 등[6]도 사람정자에서 상관관계가 있다고 보고하였으나 Cohen 등[13], Hall[20], Rogers 등[30] 그리고 그밖에 많은 연구자들[33,38]은 사람정자에서 정자의 활력과 정자침입난자율간에 상관관계가 없다고 하였다.

한편 Aitken 등[1], Hall[20] 및 Hirsh 등[21]은 사람정자에서 번식력이 있는 군에서는 정자의 활력이 침입난자율에 영향을 미치지 않는다고 하였으나, 번식력이 없는 군에서는 정자의 활력이 정상범위를 보여도 정자침입난자율이 낮게 나타났다고 하였고, Kim[39]은 과거 번식력을 보인 돼지정자를 이용한 실험에서 정자의 활력과 침입난자율간에 상관관계가 없다고 하였다.

이상의 보고들과 비교해 볼때 이 실험에서 정자의 활력에 따른 차이가 인정되지 않은 것은 이 실험에 이용된 동물들이 모두 번식력을 나타낸 바 있는 개들이었기 때문인 것으로 사료된다.

이상의 결과들을 종합해 볼때 번식력을 보인 군과 번식력을 보이지 않은 군간 햄스터난자에 대하여 정자부착 및 정자침입의 차이를 나타낸 것으로 보아 개에서도 햄스터검사를 사용할 수 있을 것으로 판단

된다.

## 結　論

개 정자의 수정능력 검정에 햄스터검사의 이용가능성과 개 정자의 活力에 따른 햄스터검사 성적을 비교하기 위하여 4두의 개로부터 정액을 채취하여 BWW 배지에 보존시킨 후 실험에 사용하였다.

정자에 대한 실험적 처리를 한 후 투명대가 제거된 햄스터난자에 5시간동안 반응시켜 lacmoid로 염색하여, 정자부착난자율, 난자당정자부착수, 정자침입난자율, 난자당침입정자수를 조사한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 번식력을 보인 개들은 번식력을 보이지 않은 개보다 정자부착난자율에서 현저히 높거나 유의성있게 높은 차이를 나타내었다($p<0.01$, $p<0.05$). 난자당부착정자수에서 번식력을 보인 개 1두는 번식력을 보이지 않은 개보다 현저히 높은 차이를 보였고($p<0.01$), 번식력을 보인 개들간에도 개체의 차이가 인정되었다($p<0.01$, $p<0.05$).

정자침입난자율은 번식력을 보인 모든 개들이 번식력을 보이지 않은 개보다 현저히 높거나 유의성있게 높은 차이를 나타내었다($p<0.01$, $p<0.05$). 난자당침입정자수에서 번식력을 보인 개들은 번식력을 보이지 않은 개보다 현저히 높은 차이를 나타내었다($p<0.01$).

2. 4℃에서 18~22시간동안 보존된 개 정자는 난자와 반응시 30~80%의 활력을 보였으나 정자부착난자율, 난자당부착정자수, 정자침입난자율, 난자당침입정자수에서 정자활력에 따른 차이는 나타나지 않았다.

## Legends for Figures

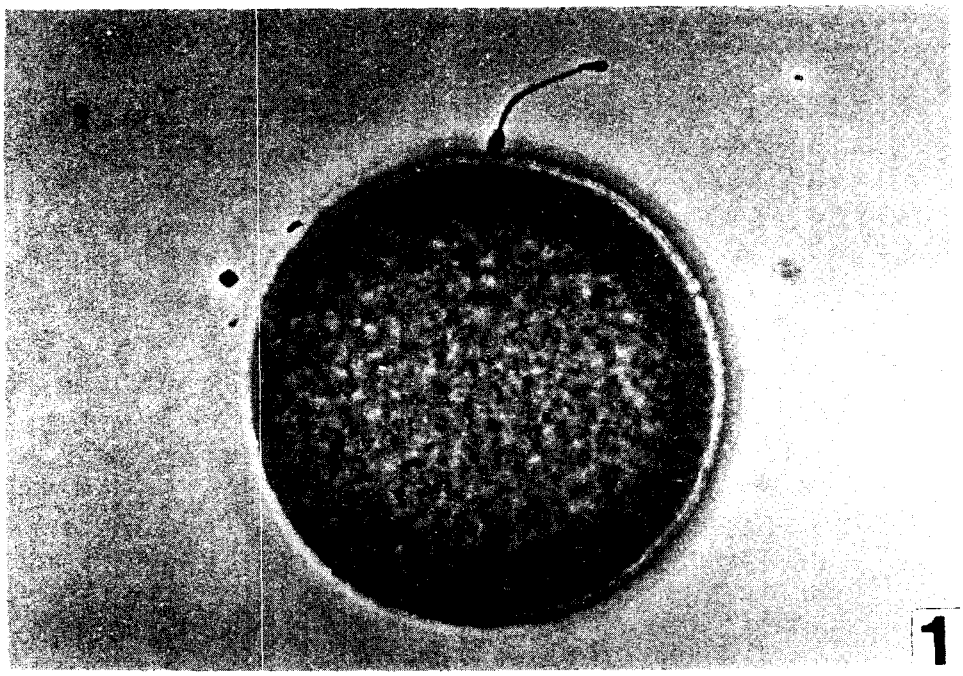
**Fig. 1.** Zona free hamster ovum exposed to a subfertile dog spermatozoa for 5 hours : a sperm is bound to the ovum with no penetration. Lacmoid stain.
Phase contrast microscope × 400.

**Fig. 2.** Zona free hamster ovum exposed to a fertile dog spermatozoa for 5 hours : numerous spermatozoa are bound to the ovum.
Lacmoid stain.
Phase contrast microscope × 400.

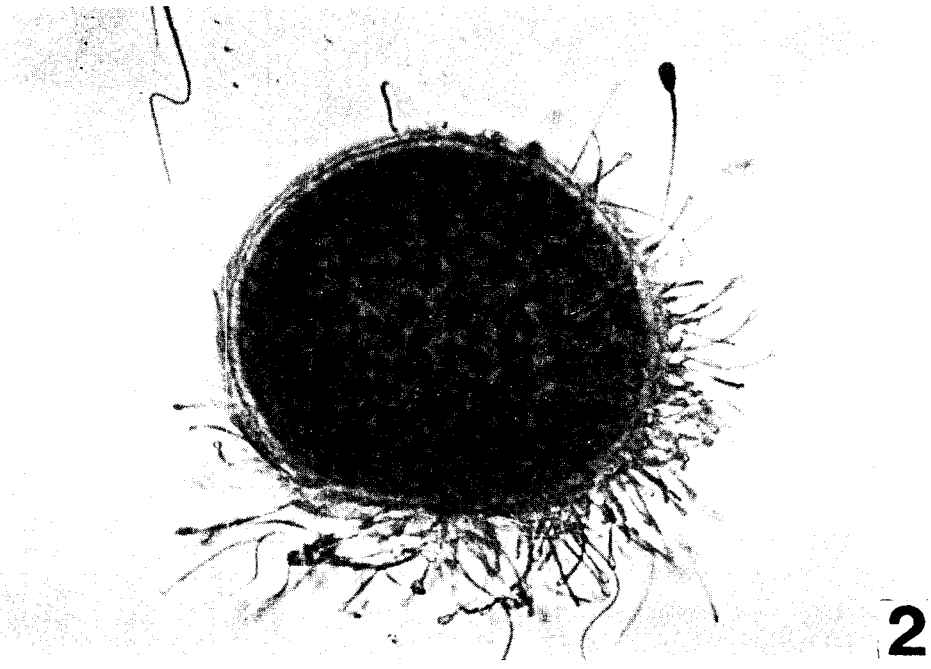
**Fig. 3.** Zona free hamster ovum exposed to dog spermatozoa for 5 hours.
A : a sperm under penetration. The forepart of the head is decondensed and swollen.
B : a sperm bound to the ovum with its intact head.
Lacmoid stain.
Phase contrast microscope × 400.

**Fig. 4.** Zona free hamster ovum exposed to dog spermatozoa for 5 hours.
A : a penetrated sperm with its swollen head and accompanied tail.
B : a sperm with its intact head.
Lacmoid stain.
Phase contrast microscope × 400

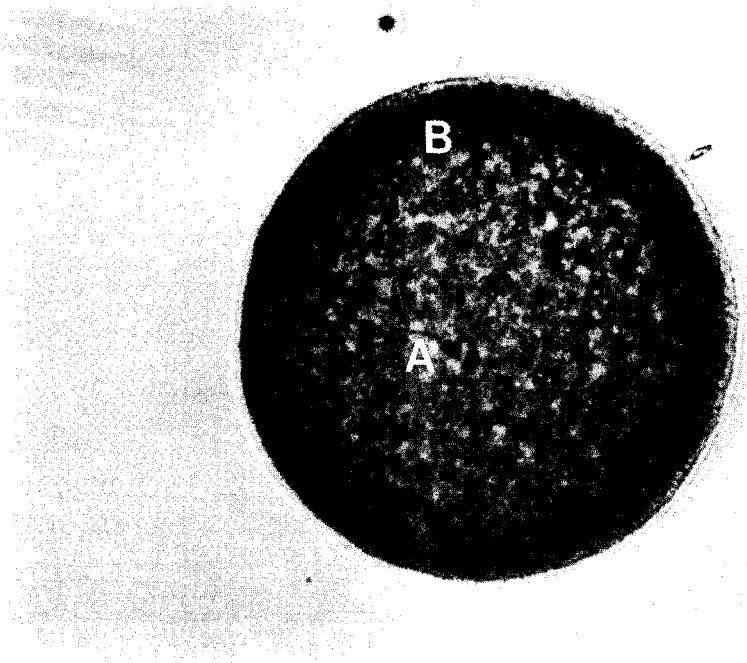
**Fig. 5.** Zona free hamster ovum exposed to dog spermatozoa for 5 hours.
A : penetrated spermatozoa with their swollen head and accompanied tail.
B : a sperm under penetration.
Lacmoid stain.
Phase contrast microscope × 400.



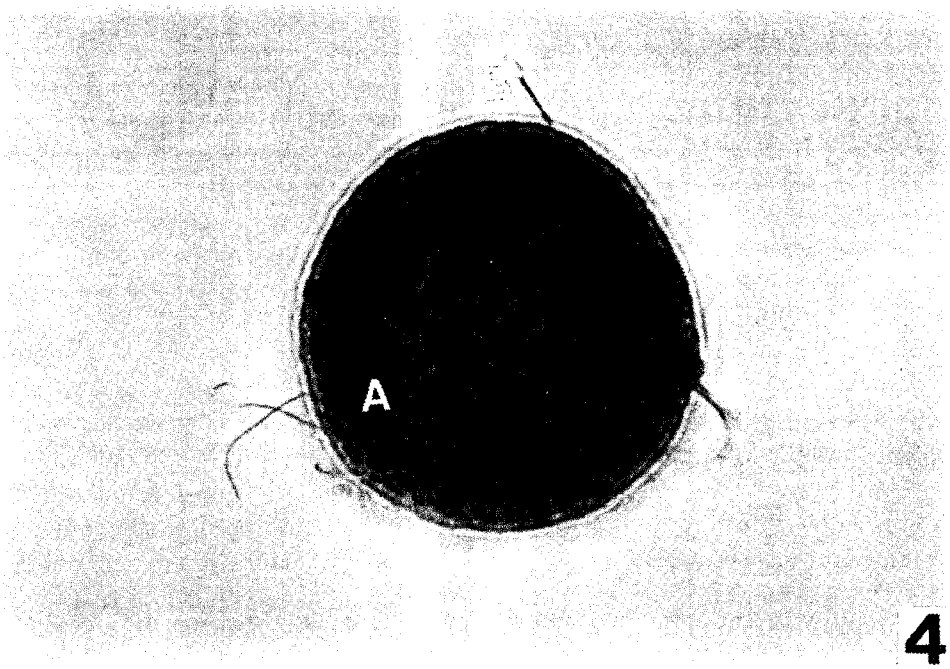
1



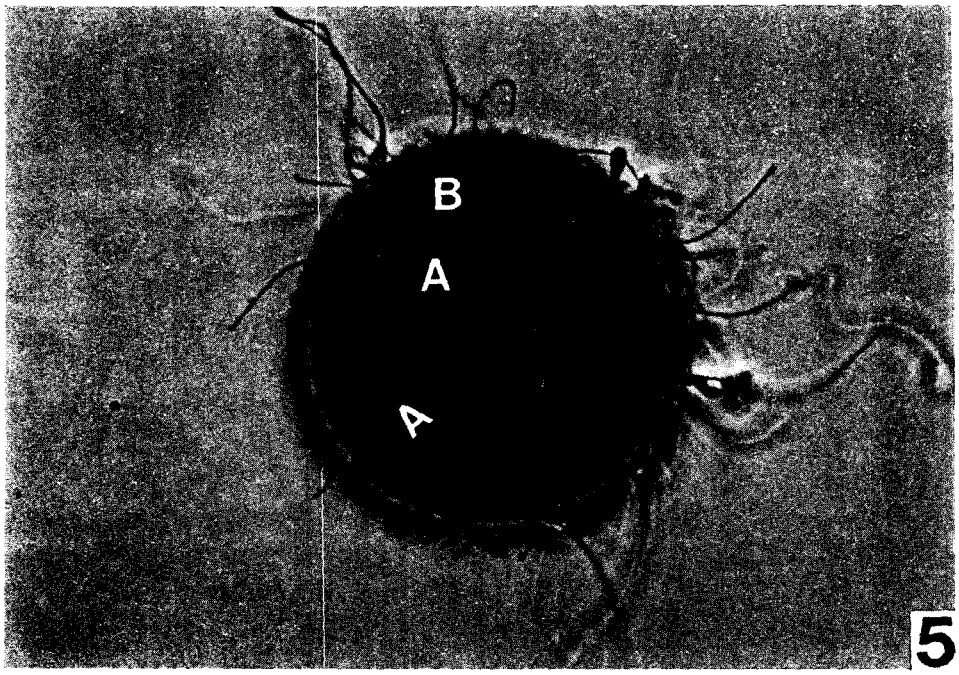
2




3




4




## 참 고 문 헌


1. Aitken, R.J., Best, F.S.M., Richardson, D.W., et al. : An analysis of semen quality and sperm function in cases of oligozoospermia. Fertil Steril.(1982)38 : 705~711.
2. Aitken, R.J., Best, F.S.M., Richardson, D.W., 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.
3. Aitken, R.J., Best, F.S.M., Richardson, D.W., et al. : The correlates of fertilizing capacity in normal fertile men. Fertil Steril.(1982) 38 : 68~76.
4. Albertsen, P.C., Chang T.S.K., Vindivch, D., et al. : A critical method of evaluating tests for male infertility. The Journal of Urology.(1983) 130 : 467~475.
5. Barros, C., Gonzalez, J., Herrera, E., et al. : Fertilizating capacity of human spermatozoa evaluated by actual penetration of foreign eggs. Contraception.(1978) 17 : 87~92.
6. Berger, R.E., Karp, L.E., Williamson, R.A., 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.
7. Berger, T. : Development of a zona-free hamster ova bioassay for goat sperm. Theriogenology. (1989) 32 : 69~77.
8. Berger, T. and Horton, M.B. : Evaluation of assay conditions for the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility. Gamete Res. (1988) 19 : 101~111.
9. Berger, T. and 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.
10. Bousquet, B. and Brackett, B.G. : Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage. Theriogenology.(1982) 17 : 199~213.
11. Brackett, B.G., Cofone, M.A., Boice, M.L., et al. : Use of zona-free hamster ova to assess sperm fertilizing ability of bull and stallion. Gamete Res.(1982) 5 : 217~227.
12. Clarke, R.N., Johnson, L.A. : Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and the penetration of zona-free hamster ova *in vitro*. Gamete. Res.

(1987) 16 : 193~204.
13. Cohen, J., Mooyaart, M., Vreeburg, J.T.M., et al. : Fertilization of hamster ova by human spermatozoa in relation to other semen parameters. Int. J. Andrology.(1982) 5 : 210~224.
14. Cohen, J., Webber, R.F.A., Van der Vijvor, J.C.M., 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.
15. Comhaire, F. and Vezmeulen, L. : Effect of high dose oral kallikreine treatment in men with idiopathic subfertility : evaluation by means of in vitro penetration test of zona-free hamster ova. Int. J. Andro.(1983) 6 : 168~172.
16. Corson, S.L., Batzer, F.R., Marmar, J., et al. : The human sperm-hamster egg penetration assay : Prognostic value. Fertil. Steril.(1988) 49 : 328~334.
17. Davis, A.P., Graham, J.K. and Foote, R.H. : Homospermic versus heterospermic insemination of zona-free hamster eggs to assess fertility of flurochrom-labeled acrosome-reacted bull spermatozoa. Gamete. Res.(1987) 17 : 343~354.
18. Gill, H.P., Kaufman, C.F. and Foote, R.W. : Artificial insemination of beagle Bitches with Freshly collected, Liquid-stored and Frozen-stored semen. Am. J. Vet. Res.(1970) 31 : 1807~1813.
19. Graham, J.K. and Foote, R.H. : Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and *in vitro* penetration of zona-free hamster egggs by bull semen : I.A. fertility assay for fresh semen. Gamete Research.(1987) 16 : 133~145.
20. Hall, J.L. : Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. Fertil Steril.(1981) 35 : 457~463.
21. Hirsh, I., Gibbons, W.E., Lipshultz, L.I. : *In vitro* fertilization in couples with male factor infertility. Fertil Steril.(1986) 45 : 659~669.
22. Howard, J.G., Post, G.S., Bush, M., et al. : Heterologous penetration of zona-free hamster ova by ejaculated domestic cat spermatozoa. Theriogenology.(1988) 29 : 263.
23. Johnson, J.P. and Alexander, N.J., : Hamster egg penetration : Comparison of preincubation periods. Fertil Steril.(1984) 41 : 599~602.
24. Karp, L.E., Williamson, R.A., Moore, D.E. et al. : Sperm penetration assay : Useful test in evaluation of male fertility. Obstetrics and Gynecology.(1981) 5 : 620~623.
25. Lees, G.E. and Castleberru, M.W. : the use of frozen semen of artificial insemination of German Shepherd dogs. J.A. A.H.A. (1977)13 : 382~386.
26. Lorton, S.P. and First, N.L. : Hyaluronidase does not disperse the cumulus oophorus surrounding bovine ova. Biol Reprod.(1979) 21 : 301.
27. Margalioth, E.J., 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.
28. Martin, R.H. and Taylor, P.J. : Reliability and accuracy of the zona-free hamster ova assay in the assessment of male fertility. Br. J.Obs. Gyn. (1982) 89 : 951~956.
29. Overstreet, J.W., Yanagimachi, R., Katz, D.F., 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.
30. Rogers, G.J., Campen, H.V., Ueno, M., et al. : Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. Fertil Steril.(1979) 32 : 664~670.
31. Seager, S.W.J. and Platz, C.C. : Artificial insemination and frozen semen in the dog. Vet. clin. north. Am.(1977) 7 : 757~764.
32. Stenchever, M.A., Spadoni, L.R., smith, W.D., 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.
33. Tyler, J.P.P., Ryor, J.P. and Collins, W.P. : Heterologous ovum penetration by human spermatozoa. J. Reprod. Fert.(1981) 63 : 499~508.
34. Wichings, E.J., Frieschem, C.W., Langer, K., et al. : Heterologous ovum penetration test and seminal parameters in fertile and infertile men. J. Androl.(1983) 4 : 261~271.
35. Wolf, D.P. : Assessment of human sperm fertility potential. In : Wolf D.P. ed, *in vitro* fertilization and embryo transfer. Plenum Press.(1988) 103~136.
36. Wolf, D.P., Sokoloski, J.E. and Quigley, M.M. :

Correlation of human *in vitro* fertilization with the hamster egg bioassay. Fertil Steril.(1983) 40 : 53 ~59.
37. Yanagimachi, R. : Zona-free hamster eggs : their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. Gamete Res.(1984) 10 : 187~232.
38. Zausner-Guelman, B., Blaseo, 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.(1981) 36 : 771~777.
39. 김용준. Hamster test를 이용한 가축정자의 수정능력 검정. I. 돼지정자의 보존온도 비교 및 돼지와 개 정자의 hamster test 결과. 대한수의학회지.(1992) 32 : 435~450.

# Availability of Hamster Test to Assess the Fertilizing Capacity of Dog Sperm

**Hae-Lee Lee** D.V.M., MS. and **Yong-Jun Kim** D.V.M., MS., Ph.D.

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

## Abstract

To investigate the availability of hamster test in assaying the fertilizing capacity of dog sperm and the effect of canine sperm motility on sperm binding and penetration, semen were collected from four dogs(three dogs had been proven to be fertile and one dog to be subfertile during the past two years) and then preserved in BWW(Biggers, Whitten, Whittingham) medium for about 20 hours.

The semen were given each different treatment according to the experimental design 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 ova bound with sperm(sperm binding) and ova penetrated by sperm(penetration), and also numbers of both bound and penetrated sperm per ovum.

In comparison between fertile dogs and a subfertile dog, the rate of sperm binding was higher in fertile dogs than the subfertile dog($p<0.01$, $p<0.05$). The number of bound sperm per ovum was considerably higher in a fertile dog than the subfertile dog(($p<0.01$), and also difference of number of the bound sperm was obtained among the fertile dogs($p<0.01$, $p<0.05$).

The rate of penetration as well as the number of penetrated sperm per ovum was higher in the fertile dogs than the subfertile dog($p<0.01$, $p<0.05$).

In fertile dogs, the canine semen preserved at 4℃ for 18 to 22 hours showed from 30 to 80% motility at insemination, however, no difference in hamster test was obtained according to different degree of sperm motility.

These results indicated that hamster test would be of avail in assaying the fertilizing capacity of dog sperm.