

개에서 Hamster test의 이용을 높이기 위한 정액처리조건

김 용 준·이 해 이
전북대학교 수의과대학
(1993년 3월 29일 접수)

Semen treatment to enhance the use of hamster test in the dog

Yong-jun Kim, Hae-iee Lee
College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University
(Received Mar 29, 1993)

Abstract : To determine the test conditions to enhance the use of hamster test in dogs, semen were collected from four dogs which had been proven to be fertile in the past 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 of different concentrations of canine sperm, the rate of sperm binding was higher in 1.5×10^8 , 1×10^8 , and 5×10^7 sperm concentrations than 5×10^5 concentration($p < 0.01$), and also than 5×10^6 concentration($p < 0.05$), respectively.

The number of bound sperm per ovum was considerably higher in 1.5×10^8 sperm concentration than 5×10^7 , 5×10^6 , and 5×10^5 concentrations($p < 0.01$).

The rate of penetration was considerably higher in 1.5×10^8 and 1×10^8 sperm concentrations than 5×10^5 concentration, ($p < 0.01$), and also the higher result of penetration was shown in 5×10^7 than 5×10^5 ($p < 0.05$).

The number of penetrated sperm per ovum was considerably higher in 1.5×10^8 sperm concentrations than 5×10^5 ($p < 0.01$), and also the higher number was shown in 1×10^8 than 5×10^5 ($p < 0.05$).

In comparison of the different preincubation period of canine spermatozoa, no difference was obtained in the results of hamster test among the preincubation periods of 4 hours, 18~24 hours and 48 hours.

The canine spermatozoa in BWW medium with Ca^{2+} (1.3mM) and without FCS(fetal calf serum), with both Ca^{2+} (1.3mM) and FCS, with Ca^{2+} (2.6mM) and without FCS, and with both Ca^{2+} (2.6mM) and FCS showed no difference in the results of hamster test.

These results indicated that the appropriate concentration of sperm should be given in hamster test for dog sperm.

緒 論

정자의 수정능력 검정의 특이적인 검사로서 최근 햄

스터검사(hamster test)가 인체^{1~6}의 체외수정에서 많이 이용되고 있다. 뿐만아니라 여러 연구자들에 의해 소^{7~10}, 돼지^{11, 12}, 산양¹³ 및 고양이¹⁴ 정자의 수정능력에도

시도되었다. 그러나 개에서는 햄스터검사가 거의 시도되지 않았고, Yanagimachi¹⁵는 개의 수정능력검정으로 햄스터 검사가 성공되지 못한 것으로 보고하였으나 저자는 같은 육식수인 고양이¹⁴에서 햄스터검사를 사용한 것으로 보아 개에서도 이용가능할 것으로 추측되어 Yanagimachi¹⁵ 및 다른 연구자들이 시도한 바 없는 여러가지 실험조건 즉, 정자수의 차이, 전배양시간(preincubation period)의 차이 및 정액배지의 조성차이를 부여하여 개에 대한 햄스터검사의 이용성을 높이기 위한 정액처리 조건들을 알아보고자 본 실험을 시도하였다.

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 雜種杜犬 4두를 대상으로 하였다.

精液處理培地 : 精液의 처리를 위하여 washing培地와 배양배지로 나누어 사용하였으며, modified BWB(Biggers, Whitten, Whittingham)培地¹⁶에 Bovine serum albumin[BSA, Sigma]을 0.3% 첨가한 것을 washing培地로, 3.5% 첨가한 것을 배양배지로 사용하였다.培地의 pH는 7.4~7.6이었다.

精液의 採取 : 精液은 수지법으로 정액의 농축부분을 중심으로 채취하였다. 채취된 원정액중 그 일부를 취하여 精液의 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℃ 또는 37℃에 보관하였다.

實驗前 處理 : 실험전 정자에 대해 다음과 같은 條件을 부여하였다.

實驗 I : 개 정자수가 햄스터검사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 3두의 개 정액을 이용하였으며 실험군별 정자수는 1.5×10^8 군, 1.0×10^8 군, 5×10^7 군, 5×10^6 군, 5×10^5 군의 5군으로 구별하였다. 이 실험에 사용된 정액은 Ca^{2+} 농도가 2.6mM이고 FCS(Fetal calf serum)가 10% 첨가된(이하 FCS 10% 첨가) BWB배지로 washing하였고, 배양배지로 혼합하여 4℃에서 18~22시간 보존하였다.

정자수를 각각 조정 한 후 그 희석정액으로 부터 150 μ l 를 취하여 35 \times 10mm Petri dish내에 droplet을 만들고 paraffin oil로 덮어 1시간 내지 1시간 30분동안 37℃, 5% CO₂ incubator내에 보관하였다.

實驗 II : 개 정액의 前培養時間이 햄스터검사 결과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 3두의 개 정액을 이용하였으며 4시간군, 18~24시간군, 48시간군의 3군으로 구별하여 각 배양시간군에 대한 hamster test를 실시하였다.

정액은 Ca^{2+} 농도가 1.3mM이고 FCS를 첨가한 배지를 사용하여 washing하고 배양배지를 혼합하여 4시간군은 37℃, 5% CO₂ incubator 내에, 18~24시간군과 48시간군은 4℃ 냉장실내에 보관하였다. 정자수를 mL 당 1.5×10^8 으로 조정하였고 난자와 반응전 처리는 실험 I 과 같다.

實驗 III : BWB배지중 Ca^{2+} 농도와 FCS가 햄스터검사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 3두의 개 정액을 이용하였으며, Ca^{2+} 농도가 1.3mM이면서 FCS가 첨가되지 않은 군과 첨가된 군, Ca^{2+} 농도가 2.6mM이면서 FCS가 첨가되지 않은 군과 첨가된 군의 4군으로 실험군을 나누었다.

실험에 이용된 정액은 原精液을 각각 上記의 배지로 washing하고 각각의 배양배지를 혼합한 후 약 3시간동안 37℃, 5% CO₂ incubator에서 보관하였다. 정자수를 mL 당 1.5×10^8 으로 조정하였고 난자와 반응전 처리는 실험 I 과 같다.

卵자의 準備 :

供試햄스터 : 공시햄스터는 생후 5~7주령의 golden hamster로서 飼育室은 午前 7시에 點燈하고 午後 8시에 消燈하여 明暗을 조절하였다. 飼料는 마우스 랫트 연구검정용 固形飼料(삼양사료)로서 自由給食시켰으며, 물도 自由給水시켰다.

過排卵處理 : 햄스터의 腔分泌物 존재 여부를 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 培養에 사용한 배지는 각각 정액의 washing 및 배양에 사용한 동일한 BWB배지로서 BSA도 각각 0.3%, 3.5%로 동일하게 첨가되었다.

卵자의 採取 및 透明帶 除去 : 난자의 채취 및 투명대 제거는 Kim¹⁷의 방법을 이용하였다.

卵자와 精子의 反應 : 실험전 처리가 끝난 정자의 각 droplet내에 20~25개의 透明帶가 제거된 난자를 넣은 후 37℃, 5% CO₂ incubator내에서 5시간동안 반응시켰다.

卵자의 固定 및 染色 : 난자의 고정 및 염색은 Kim¹⁷ 및 Wolf¹⁸의 방법을 이용하였다.

檢査의 判定 : 염색을 마친 슬라이드는 위상차현미경 하에서 400배로 경검하였다. 정자부착난자율을 알아보기 위하여 실험군별 전체 난자중 정자가 부착된 난자수를 구하였으며 또한 각 난자별 부착된 정자수를 산정하

였다.

정자의 난자침입은 난자내 정자꼬리가 확인된 정자로서 그 두부가 팽대되어 있거나 頭部核의 弛緩 및 그 진행과정을 보이는 정자만으로 판정하였으며, 정자침입 난자율은 실험군별 전체 난자중 정자가 침입된 난자수를 구하였다. 또한 각 난자내 침입된 정자수를 산정하였다.

結果分析 : 정자부착난자율, 난자당부착정자수, 정자침입난자율, 난자당침입정자수에 대하여 ANOVA로 통계처리한 후 DUNCAN 다중 검정에 의해 실험군간 유의차를 구하였다.

結 果

정자수차이에 따른 햄스터검사 결과 : 정자수를 구분하여 비교된 결과는 Table 1과 같다.

정자부착난자율에서 1.5×10^8 군, 1×10^8 군, 5×10^7 군은 상호간에는 차이없이 5×10^5 군보다 각각 현저히 높은 난자율을 나타내었고($p < 0.01$) 또한 1.5×10^8 군, 1×10^8 군은 5×10^6 군보다 각각 유의성 있게 높은 율을 나타내었다($p < 0.05$). 5×10^6 군과 5×10^5 군간에는 차이가 인정되지 않았다.

난자당부착정자수는 1.5×10^8 군이 5×10^7 군, 5×10^6 군, 5×10^5 군보다 현저히 높은 부착수를 나타내었다($p < 0.01$). 1.5×10^8 군과 1×10^8 군 상호간, 그리고 1×10^8 군, 5×10^7 군, 5×10^6 군, 5×10^5 군 상호간에는 차이가 인정되지 않았다.

정자침입난자율은 1.5×10^8 군, 1×10^8 군이 상호간에는 차이없이 5×10^5 군보다 현저히 높은 난자율을 나타내었고($p < 0.01$), 5×10^7 군은 5×10^5 군보다 유의성 있게 높은 난자율을 보였다($p < 0.05$). 1.5×10^8 군, 1×10^8 군, 5×10^7 군, 5×10^6 군 상호간 그리고 5×10^6 군과 5×10^5 군 상호간에는 차이가 인정되지 않았다.

난자당침입정자수는 1.5×10^8 군이 5×10^5 군보다 현저히 높은 침입정자수를 나타내었고($p < 0.01$), 1×10^8 군은 5×10^5 군보다 유의성 있게 높은 침입정자수를 나타내었다($p < 0.05$).

정자의 전배양시간과 햄스터검사 결과 : 정액의 전배양시간 차이에 따른 햄스터검사 결과는 Table 2와 같다.

정자부착난자율, 난자당부착정자수, 난자당침입정자수에서 서로간에 각각 유의성 있는 차이는 보이지 않았고, 정자침입난자율에서 18~24시간군이 4시간군과 48시간군 보다 낮은 수치를 보였으나 상호간에 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

정액배지 조성의 차이에 따른 햄스터 검사결과 : 배지 조성을 다르게 하여 비교된 햄스터검사 결과는 Table 3과 같다.

정자부착난자율에서 FCS가 첨가된 Ca^{2+} ($1.3mM$) FCS+군과 Ca^{2+} ($2.6mM$) FCS+군은 FCS가 첨가되지 않은 두 군들보다 각각 높은 수치를 나타냈으나 서로간에 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다. 난자당부착정자수는 Ca^{2+} ($2.6mM$) FCS+군이 실험군간 가장 높

Table 1. Effect of concentration of canine sperm on sperm binding and penetration (Mean \pm SD)

Concentration of sperm	No. of eggs examined	Binding		Penetration	
		B%*	No. of sperm / egg	P%**	No. of sperm / egg
1.5×10^8	163	46.64 \pm 14.49 ^{ac}	6.02 \pm 4.84 ^a	35.99 \pm 17.25 ^a	1.79 \pm 0.60 ^a
1×10^8	156	42.37 \pm 14.78 ^{ac}	3.70 \pm 3.84	32.67 \pm 20.90 ^a	1.49 \pm 0.97 ^c
5×10^7	161	34.08 \pm 32.50 ^a	1.53 \pm 0.81 ^b	28.12 \pm 29.56 ^c	1.37 \pm 0.99
5×10^6	157	18.82 \pm 9.72 ^d	1.37 \pm 0.52 ^b	16.86 \pm 7.58	1.10 \pm 0.21
5×10^5	159	6.58 \pm 4.46 ^b	0.93 \pm 0.45 ^b	3.28 \pm 3.54 ^{bd}	0.57 \pm 0.53 ^{bd}

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

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

ab : Different superscripts denote significant differences within columns($p < 0.01$).

cd : Different superscripts denote significant differences within columns($p < 0.05$).

Table 2. Effect of preincubation period of canine sperm on sperm binding and penetration (Mean \pm SD)

Preincubation period (hours)	No. of eggs examined	Binding		Penetration	
		B%*	No. of sperm / egg	P%**	No. of sperm / egg
4	126	36.89 \pm 10.99	3.40 \pm 2.40	36.03 \pm 15.82	1.59 \pm 0.62
18~24	115	37.97 \pm 23.17	3.84 \pm 4.67	27.77 \pm 19.69	1.67 \pm 0.41
48	120	39.08 \pm 14.26	3.22 \pm 3.97	36.34 \pm 11.83	1.55 \pm 0.29

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

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

Table 3. Effect of Ca^{2+} concentration and fetal calf serum in BWW medium on canine sperm binding and penetration (Mean \pm SD)

Composition	No. of eggs examined	Binding		Penetration	
		B%*	No. of sperm/egg	P%**	No. of sperm/egg
Ca^{2+} (1.3mM)FCS-	101	35.59 \pm 17.64	4.66 \pm 2.45	27.58 \pm 17.06	1.17 \pm 0.29
Ca^{2+} (1.3mM)FCS+	100	41.06 \pm 30.62	3.94 \pm 3.14	33.35 \pm 22.97	1.09 \pm 0.61
Ca^{2+} (2.6mM)FCS-	102	36.61 \pm 23.99	3.97 \pm 5.33	29.76 \pm 19.60	1.39 \pm 0.67
Ca^{2+} (2.6mM)FCS+	97	42.11 \pm 19.46	8.62 \pm 9.23	35.51 \pm 27.30	1.49 \pm 0.48

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

은 수치를 보였으나 서로간에 유의성 있는 차이는 없었다.

정자침입난자율은 FCS가 첨가된 Ca^{2+} (1.3mM) FCS+군과 Ca^{2+} (2.6mM) FCS+군이 FCS가 첨가되지 않은 두 군들보다 각각 높은 수치를 나타냈으나 실험군간 유의성 있는 차이는 없었고, 난자당침입정자수도 서로간에 유의성 있는 차이가 인정되지 않았다.

考 察

개 정자 농도 비교에서 고농도군이 저농도군보다 정자부착난자율, 부착정자수, 정자침입난자율, 침입정자수의 모든 항목에서 높은 성적을 나타내었다. 이 결과를 다른 연구자들의 보고와 비교해 볼 때 Cohen et al¹⁹과 Rogers et al¹⁹은 사람에서, Berger와 Horton¹¹은 돼지에서, 정자수와 햄스터검사간에 相關關係가 없거나 낮은 상관관계를 보고한 반면, Berger¹³는 산양에서 1×10^7 까지 정자수를 증가시킬 수록 햄스터검사 결과도 높게 나타났으며 1×10^7 과 4×10^7 간에는 차이가 없다고 하였고, Kim¹⁷은 돼지에서 높은 정자농도군과 낮은 정자농도군간의 햄스터검사 결과의 차이를 보고하였으며, Martin과 Taylor²¹는 사람에서 5×10^4 과 1×10^7 사이의 정자수에서 1×10^7 군이 가장 높은 정자침입난자율을 나타냈다고 하였으며 많은 연구자들^{2, 22~25}이 정자농도와 햄스터검사 결과가 상관관계가 있음을 보고하였는데 이 보고들은 이 실험에서의 결과와 일치되는 것으로 판단된다.

햄스터검사를 위한 정자의 적정수에 대하여 많은 연구자들이 사람정자에 대한 햄스터검사 결과에서 5×10^6 ,^{16, 21, 22, 26} 또는 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$,^{25, 27}의 범위가 가장 좋은 결과를 나타낸다고 하였고, 돼지정자를 이용한 실험에서 Kim¹⁷은 5×10^6 을 적정농도로 제시하였고, Pavlok et al²⁸은 $4 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 의 정자수 범위중 5×10^5 군이 가장 높은 성적을 나타낸다고 보고하였다.

본 실험에서는 $1 \times 10^8 \sim 1.5 \times 10^8$ 의 정자수 범위에서

정자부착난자율 및 정자침입난자율이 높게 나타났으므로 개에서 햄스터검사를 이용한 정자의 수정능력 검정시 이 농도가 바람직할 것으로 사료된다.

개 정자의 전배양시간 비교에서 4시간, 18~24시간, 48시간군 상호간에는 유의성 있는 차이가 인정되지 않았다. 이 결과를 다른 연구자들의 사람 정자를 이용한 연구와 비교해 볼 때 Binor et al²⁹은 17~24시간의 전배양시간보다 2~3시간의 전배양시간에서 더 좋은 결과를 나타냈다고 보고했고, Hirschel과 Mixon³⁰도 7시간과 18시간의 전배양시간을 각각 비교했을 때 7시간의 전배양시간에서 더 성적이 우수한 것으로 보고한 반면, Gould et al³¹은 18~24시간군이 전배양시간이 전혀 없었던 군보다 더 좋은 성적을 나타냈다고 보고하였다.

한편 Wickings et al³²은 6~7시간군과 18~24시간군 사이에는 서로 차이가 없었다고 보고하였다.

上記의 보고들에서와 같이 정자를 난자와 반응시키기 전 정자의 전배양시간이 미치는 영향은 연구자 및 동물마다 다른 결과를 보여 전배양시간에 대한 기준이 제시되고 있지 못하지만 동물의 종류, 배지의 조성, Ca^{2+} 및 albumin의 농도 그리고 정자수 등의 요인에 의해 *in vitro*조건에서 정자가 침체반응을 일으키기까지의 기간이 전배양시간으로서 필요할 것으로 사료된다.

이 실험에서 개의 경우 4시간군, 18~24시간군, 48시간군 상호 차이를 보이지 않았지만 개에 대한 햄스터검사를 위하여 4시간 또는 18~24시간의 짧은 전배양시간이 바람직할 것으로 사료된다.

BWW 배지내 Ca^{2+} 농도차이와 FCS첨가여부 비교에서 군 상호간에 유의성 있는 차이가 인정되지 않았다. Yanagimachi^{6, 33}는 정자가 난자내에 침입하기 위하여 Ca^{2+} 이 반드시 필요하다고 하였고, 정자배지내 일반적인 Ca^{2+} 농도인 약 1.7mM은 난자내 정자의 침입작용을 나타내게 하는데 충분한 농도라고 하였다. Hoshi et al³⁴은 사람정자에서 Ca^{2+} 농도가 더 높을 때(例: 3.4mM) 정자침입난자율이 더 높아진다고 하였고, Berger와 Parker¹²는 돼지 정자에서 40mM의 Ca^{2+} 을 사용시 가장

높은 정자침입난자율이 나타났다고한 보고들은 정자의 난자침입시 calcium의 효과를 인정한 것으로 보여진다. 이밖에도 많은 연구자들³⁵⁻⁴²이 정자의 침체반응, 난자 부착 및 난자침입시 calcium이 반드시 필요하다고 보고 하였다.

이 실험에서는 BWW 배지내 Ca^{2+} 농도가 1.3mM과 그 2배인 2.6mM일 때 햄스터검사 성적을 비교하여 구간 차이는 나타나지 않았지만 Berger와 Parker¹², Hoshi et al³⁴의 보고를 참고로 하면 더 높은 농도의 Ca^{2+} 농도와 비교되었을 때 유의성 있는 차이가 나타날 수 있을 것으로 추측된다.

이 실험에서 또한 배지중에 FCS첨가여부에 관한 유의성 있는 차이는 인정되지 않았으며 BWW 배지내의 FCS 첨가여부에 대한 연구보고를 접하지 못하여 비교하기는 어려우나 FCS가 수정능력에 관계가 있으며 수정란의 실험실내 발달에 효과가 있음을 보고한 여러 연구자들⁴³⁻⁴⁵의 보고들로 미루어 볼 때 그리고 이 실험에서도 유의성 있는 차이는 인정되지 않았으나 FCS첨가군에서 비첨가군보다 더 높은 수치를 나타낸 것은 FCS 첨가가 정자의 침체반응을 일으키는 데 더 좋은 결과를 보일 수 있을 것으로 생각되며, 개 정자에 대한 햄스터 검사를 위하여 canine serum을 사용할 때 더 좋은 성적을 나타낼 수 있을 것으로 보여진다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때 개 정자에 대한 햄스터 검사의 성공가능성을 높이기 위하여는 적절한 수의 정자농도를 유지해야 할 것으로 사료된다.

結 論

개에서 햄스터검사의 이용성을 높이기 위한 정액처리 조건들을 알아보기 위하여 과거 번식력을 보인 4두의 개로부터 정액을 채취하여 BWW배지에 보존시킨 후 실험에 사용하였다.

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

1. 개 정자수 비교에서 정자부착난자율은 1.5×10^8 군, 1×10^8 군 및 5×10^7 군이 5×10^5 군보다 각각 현저히 높은 차이를 나타내었고($p < 0.01$), 1.5×10^8 군 및 1×10^8 군은 5×10^6 군보다 각각 유의성 있게 높은 차이를 보였다($p < 0.05$).

난자당부착정자수는 1.5×10^8 군이 5×10^7 군, 5×10^6 군 및 5×10^5 군보다 현저히 높은 차이를 나타내었다($p < 0.01$). 정자침입난자율은 1.5×10^8 군 및 1×10^8 군은 5×10^5

군보다 각각 현저히 높은 차이를 나타내었고($p < 0.01$), 5×10^7 군은 5×10^5 군보다 유의성 있게 높은 차이를 보였다($p < 0.05$).

난자당 침입정자수는 1.5×10^8 군이 5×10^5 군보다 현저히 높은 차이를 보였고($p < 0.01$), 1×10^8 군은 5×10^5 군보다 유의성있게 높은 차이를 보였다($p < 0.05$).

2. 개 정자의 前培養時間 비교에서 4시간군, 18~24 시간군 및 48시간군 상호간에 차이는 인정되지 않았다.

3. 개 정자가 보존된 BWW 배지내 calcium 농도 차이와 FCS첨가여부 비교에서, Ca^{2+} (1.3mM) FCS-군, Ca^{2+} (1.3mM) FCS+군, Ca^{2+} (2.6mM) FCS-군 및 Ca^{2+} (2.6mM) FCS+군 상호간에 차이는 인정되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Corson SL, Batzer FR, Marmar J, et al. The human sperm-hamster egg penetration assay : Prognostic value. *Fertil Steril* 1988 ; 49 : 328~334.
2. Hall JL. Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Fertil Steril* 1981 ; 35 : 457~463.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Yangimachi 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.
7. 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.
8. 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.

9. Davis AP, Graham JK, Foote RH. Homospermic versus heterospermic insemination of zona-free hamster eggs to assess fertility of fluorochrome-labeled acrosome-reacted bull spermatozoa. *Gamete Res* 1987 ; 17 : 343~354.
10. 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.
11. 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.
12. Berger T, Parker K. Modification of the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with *in vivo* fertility *Gametes Res* 1989 ; 22 : 385~397.
13. Berger T. Development of a zona-free hamster ova bioassay for goat sperm. *Theriogenology* 1989 ; 32 : 69~77.
14. Howard JG, Post GS, Bush M, et al. Heterologous penetration of zona-free hamster ova by ejaculated domestic cat spermatozoa. *Theriogenology* 1988 ; 29 : 263.
15. Yanagimachi R. Zona-free hamster eggs : their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res* 1984 ; 1 : 187~232.
16. Wolf DP. Assessment of human sperm fertility potential. In : Wolf DP ed. *In vitro* fertilization and embryo transfer. *Plenum Press* 1988 ; 103~136.
17. 김용준. Hamster test를 이용한 가축정자의 수정능력 검증. I. 돼지정자의 보존온도 비교 및 돼지와 개 정자의 hamster test 결과. 대한수의학회지 1992 ; 32 : 435~450.
18. Wolf DP, Sokoloski JE. Characterization of the sperm penetration bioassay. *J Androl* 1982 ; 3 : 445~451.
19. Cohen J, Mooyaart 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.
20. Rogers BJ, Campen HV, Ueno M, et al. Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil Steril* 1979 ; 32 : 664~670.
21. Martin RH, Taylor PJ. Effect of sperm of concentration in the zona-free hamster ova penetration assay. *Fertil Steril* 1983 ; 39 : 379~401.
22. 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.
23. Binor Z, Sokoloski JE, Wolf DP. Sperm interaction with the zona-free hamster egg. *J Exp Zoology* 1982 ; 222 : 187~193.
24. 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.
25. Tyler JPP, Ryor JP, Collins WP. Heterologous ovum penetration by human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1981 ; 63 : 499~508.
26. Binor Z, Sokoloski JE, Wolf DP. Penetration of the zona-free hamster egg by human sperm. *Fertil Steril* 1980 ; 33 : 321~327.
27. Rogers BJ, Perresault SD, Bentwood BJ. Variability in the human hamster *in vitro* assay for fertility evaluation. *Fertil Steril* 1983 ; 39 : 204~211.
28. Pavlok A, Travnik P, Kopecny 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.
29. Binor Z, Rao R, Scommegna A. Further studies on dysfunctional human spermatozoa using zona-free hamster oocyte penetration assay. *Fertil Steril* 1982 ; 33 : 321~327.
30. Hirschel MD, Mixon BA. Comparison of long and short capacitation period in the sperm penetration assay. *Biol Reprod* 1983 ; 28 (suppl 1) : 104a (abstr 144).
31. 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.
32. 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.
33. Yanagimachi R. Calcium requirement for sperm-egg fusion in mammals. *Biol Reprod* 1978 ; 19 : 949~958.

34. Hoshi K, Saito A, Suzuki M, et al. Effects of agents used for removal of zona pellucida on human sperm penetration into zona-free hamster egg. *Acta Obstet Gynecol Jpn* 1982 ; 34 : 2229~2234.
35. Bedford JM. Fertilization. In : Austin CR and Short RV ed. *Reproduction in mammals : 1*. Cambridge Univer. Press 1982 ; 128~163.
36. Bleil JD, Wassarman PM. Sperm-egg interactions in the mouse : Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Develop Biology* 1983 ; 95 : 317~324.
37. Fleming AD, Yanagimachi R. Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. *Gamete Res* 1981 ; 4 : 253 ~ 273.
38. Knobil E, Neil JD. *the physiology of reproduction*. Raven Press 1988 ; 151~152.
39. Tersarik J. Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A 23187 in human sperm populations of fertilizing ability *in vitro*. *J Reprod Fert* 1985 ; 74 : 383~388.
40. Tomkins PI, Houghton JA. The rapid induction of the acrosome reaction of human spermatozoa by electroporation. *Fertil Steril* 1988 ; 50 : 329~336.
41. Triana LR, Babcock DF, Lorton SP, et al. Release of acrosome hyaluronidase follows increased membrane permeability calcium in the presumptive capacitation sequence for spermatozoa of the *Biol Reprod* 1980 ; 23 : 47~59.
42. Yanagimachi R. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization related phenomena in the hamster. *Gamete Res* 1982 ; 5 : 323~344.
43. Aoyagi Y, Fujii K, Iwazumi Y, et al. Effects of two treatments on semen from different bulls on *in vitro* fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology* 1988 ; 30 : 973~985.
44. Funahashi H, Aoyagi Y, Takeda T, et al. Developmental capacity of bovine oocytes collected from ovaries of individual heifers and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 1991 ; 36 : 427~434.
45. Mochizuki H, Fukui Y, Ono H. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 1991 ; 36 : 793~986.