

Mouse 복강내에 이식된 Hydrogel Chamber 내에서의 돼지난모세포의 수정 및 배양에 관한 연구

金明哲 · 申相泰 · 朴昌植* · 李揆丞*

忠南大學校 獸醫科大學

Fertilization of Porcine Oocyte and Culture of Embryo in Hydrogel Chambers implanted in the Peritoneal Cavity of Intermediate Mouse Recipients

Kim, M.C., S.T. Shin, C.S. Park* and K.S. Lee*

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

SUMMARY

In vitro fertilization is very important in both human clinical practice and animal breeding. However, the success rate of *in vitro* fertilization is not high.

The purpose of this study was to determine whether *in vivo* fertilization and culture of porcine oocyte using a hydrogel chamber were possible or not. Hydrogel chambers were made of polymerized 2-hydroxyethyl methacrylate.

Matured follicular oocytes in Waymouth's medium and T L Hapes medium, tubal oocytes, and preincubated sperm in M199 medium were transferred into the lumen of the hydrogel chambers. The chambers containing porcine oocytes and spermatozoa implanted into the mouse peritoneal cavity, and ova were examined after the recovery of the chambers at 84 hours after preservation start.

The result was shown that fertilization and culture of porcine oocytes were successfully achieved inside of the hydrogel chamber.

(Key words : *in vivo* fertilization, *in vivo* culture, hydrogel chambers, porcine)

I. 緒 論

포유동물의 기전에 관한 지식의 발달은 체외에서 처리의 용이함 때문에 체외수정에 의해 힘 입은 바 크다. 더 나아가서, 체외수정은 人醫臨床 및 동물번식에 상당한 중요성을 갖고 있다. 체외수정은 토끼 (Chang, 1959; Seidel 등, 1976), 마우스 (Iwamatsu 및 Chang, 1969), rat (Toyoda 및 Chang, 1974), golden hamster (Yanagimachi 및 Chang, 1963, 1964), Chinese hamster (Pickworth 및 Chang,

1969), gerbil (Noske, 1972), 고양이 (Bowen, 1977), 개 (Mahi 및 Yanagimachi, 1976), 돼지 (Cheng, 1985), 소 (Sreenan, 1970) 및 사람 (Caro 및 Trounson, 1986; Edwards 등, 1969) 등에서 이루어졌다. 그러나 체외에서 수정된 난자가 태아 또는 출산까지의 발육 성공률은 토끼 (Seidel 등, 1976) 및 쥐 (Toyoda 및 Chang, 1974)에서 약 20% 정도이다. 그리고 소 (Brackett 등, 1982) 및 돼지 (Yoshida, 1987, 1989)에서 더욱 낮다.

착상전의 마우스胚는 자궁외의 위치에 있을 경우에도

본 연구는 교육부 학술진흥재단 1990년도 자유공모과제 지원연구비에 의하여 수행된 것임.

*忠南大學校 農科大學 (College of Agriculture, Chungnam National University)

분할된다. 前眼房 및 雄 또는 雌마우스의 복강은 분할, 영양배엽 조직의 발달 및 자궁의 위치로의 이들 胚들의 이식을 도와준다(Fawcett 등, 1947).

토끼의 상실배는 雌마우스의 복강에 이식될 때 포배 기로 발달을 일으킨다(Brions 및 Beatty, 1954). Agar chip 계통은 nude blastomere의 수란관 환경으로의 직접적인 노출을 막아 주며, 부가해서 chips는 동일함을 증명할 수 있는 blastomeres들을 입시로 보존한다. 그럼에도 불구하고, 이 계통의 유효성은 시간을 경과한 agar의 분해로 감소된다(Boland, 1984). Polymerized Hema(pHema)는 인체의학에서는 임상적용에 오랜 역사를 갖고 반투명한, 확산성의, 생체에 사용할 수 있는, 그리고 생체에 해를 미치지 않는 hydrogel이다(Ratner, 1981).

한편 가토에서의 chamber내 수정에 관한 보고(俞, 1989)도 있으나, 아직 돼지에서의 chamber내 수정 및 배양에 관한 보고에는 接한 바 없다.

이에 저자들은 hydrogel chamber를 이용한 돼지 oocytes 및 follicular oocytes의 수정 및 배양에 관한 실험을 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. Hydrogel chambers

Hydrogel chamber는 monomer로서 low-acid Hema를, cross linker로서는 tetraethylene glycol dimethacrylate(TGD), ethylene glycol(EG)를 사용한다(Polysciences, Inc., Warrington, PA). Chamber를 주형하기 위하여 3개의 원액을 준비하고 초차시험관에 위치시킨다: 용액 A-10ml의 Hema, 0.1ml TGD, 3.0ml EG, 2.0ml 증류수의 혼합물: 용액 B-증류수 100ml에 40g을 용해한 1.0ml ammonium persulfate(initiator): 용액 C-증류수 100ml에 5g을 용해한 1.0ml sodium metabisulfate(coinitiator).

각 원액은 질소로 15분간 purge하고, 반응제를 혼합하여 압력하에 중합한다(Ratner, 1981). Hydrogel chamber는 71mm 길이, 3.5mm 직경의 0.5ml 인슐린 주사기(No. 8471, single use, plastipak LO-dose U-100; Becton Dickinson,

NJ)를 실온에서 사용하여 주형한다. 주사침은 제거하고, syringe로부터 plunger 끝에 있는 gasket를 분리하여 다시 전도시켜 주입시킴으로써, plunger에 접해 있던 gasket의 부분이 주사기 내강을 향하게 하고, 전도된 gasket를 주사기에 50unit mark에 위치시킨다.

1.5ml의 용액 A, 0.1ml의 용액 B 및 0.1ml의 용액 C를 3ml의 polyethylene syringe 내에서 혼합시켜서 주형 인슐린주사기에 주입시킨다. 인슐린주사기에 0.5ml의 중합 혼합물을 채운 직후에 1.7mm 직경의 Teflon tubing(Cole Parmer International, Chicago, IL)을 씌운, 5.6mm 길이의 0.9mm 직경의 stainless steel rod를 주사침 연결부분을 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 clamp의 jaws에 닿게 한다. Polymerizing gel에 기포가 안 보일 때까지 clamp의 jaws를 조이고, 15분동안 압력을 가한다. 압력하의 중합이 15분간 일어난 후, 인슐린 주사기로부터 cast hydrogel을 제거하고, 가운데 위치한 rod가 들어 있는 Teflon tubing을 cast hydrogel로부터 제거하여 길이 5cm, 두께 0.9mm, 1.7mm 강을 갖고 있는 hydrogel tube를 만든다.

pHema hydrogel tube를 95% ethanol을 함유한 100ml 유리 비커에 위치시키고, nonpolymerized Hema를 제거하기 위하여 12시간 간격으로 ethanol을 교체하면서 96시간동안 담가둔다. Ethanol washing 후에, pHema tube를 500ml의 증류수를 함유하고 있는 배지에 넣고 4시간동안 열을 가하고, 증류수를 교환하는데, 이 과정을 12번 반복한다. 그후, pHema tubes를 1cm가 되게 razor blade를 사용하여 절단한다. 분질은 10×의 입체현미경하에서 점검하고, 결함을 갖고 있는 것은 제거한다.

Silastic adhesive로 채운 직경 2.16mm, 길이 2mm의 Silastic tubing(Dow Corning Corp.,

Medical Products, MT)으로 고체의 plug 를 만들어, chamber 를 형성하도록 pHema tube 의 양단을 막는데 사용한다. 2ml 유리앰플에 증류수를 주입하고, 1개의 hydrogel tube 의 분절과 2개의 solid plugs 를 위치시킨다. 앰플들은 120°C에서 40분동안 고압멸균 처리한 후, fire-sealed 하고, 사용할 때까지 실온에서 보관한다.

2. 실험동물

분만경력이 있는 雌豚 12두를 준비하여 donor 6두와 recipient 6두를 배정한다. Intermediate recipient 는 40두의 성숙한 자성 Balb/C mice 를 사용하며, mice 는 시판 mice 사료를 급여하고, 일정한 온도 (20~22°C) 및 조명 (14hr light : 10hr dark) 하에서 사육하며, 질점액검사를 하여 발정기의 mice 를 intermediate recipient 로 사용한다.

3. Oocytes 의 채취

Donor 와 recipient 에 PMSG 1500IU 를 근육주사 하고, 72시간후에 HCG 500IU 를 근육주사한다. HCG 주사후 13시간경에 마취시킨후 외과적 수술방법으로 수란관을 노출하여 oocytes 를 채취한다.

Porcine follicular oocytes 는 正常生殖器를 가진 屠殺後의 암돼지 (체중 80~130kg) 의 난소를 적출하여, 100IU/ml 의 penicillin G 와, 100μg/ml 의 streptomycin sulfate 를 첨가한 38°C 의 생리식염수에 침지하여 2時間이내에 실험실로 옮겨, 난소 표면을 세척하고 여과지로 난소 표면의 습기를 제거한 다음 18 gauge 주사기로 난포액을 흡인하여 채취한 후 위상차 현미경 (20~40×) 하에서 난포난을 회수하여 배양액으로 3회 세척하였다.

4. 發情豚 血清의 분리

대학 부속목장에서 발정징후가 발견된 雌畜成豚의 耳靜脈으로부터 채혈하여 정치시킨 후 1000×g 으로 10분간 원심분리한 다음 56°C에서 30분간 비동화 처리 후 사용까지 -20°C에 보관하였다.

5. Sperm 의 채취 및 受精能獲得 誘起

Sperm 을 인공질법으로 채취하였으며, Tyrode solution 으로 회석하여 100×g 로 3분간 원심분리하여 pellet 를 만든 다음 TCM 199배양액에 회석하여 4시간 동안 CO₂배양기에 정치시켜 수정능획득을 誘起시켰

다.

6. 顆粒膜細胞의 준비

직경 5mm 이상의 卵胞를 공시하여 미세가위를 이용하여 난포를 난소 표면에서 분리한 후 實體顯微鏡하에서 미세 핀셋으로 2~3겹의 卵胞外膜 및 毛細血管을 제거한 다음 PBS 로 3~4회 세척한 후 卵胞內容物을 5% FCS 를 첨가한 PBS 로 회수하였다. 1회에 4~5개의 난포를 선발 수집하여 2,000rpm 으로 10분간 원심분리후 침전된 과립막세포 (1×10⁶/ml) 를 배양액에 첨가하였다.

7. 培養液의 준비

돼지 卵胞卵의 체외성숙을 위한 기본 배양액은 Waymouths medium 과 T L Hepes medium 로서, 과립막세포 (1×10⁶/ml) 및 5%, 10%, 15% 및 20% (V/V) 의 發情豚 血清 (estrous porcine serum, EPS) 을 각각 첨가하여 실험에 사용하였다.

8. 卵胞卵의 體外培養 및 受精

Mineral oil (Squibb, USA) 로 피복한 50μl 의 培養液은 배양 2~3시간전에 CO₂배양기 (5% CO₂, 38°C) 에서 평형시킨 후 5~10개의 난모세포를 배양하였다.

배양시간을 달리하여 관찰한 실험에서는 20% EPS 가 첨가된 배양액들을 사용하여 실험군을 Waymouths 12hr+T L Hepes 30hr, Waymouths 18hr+T L Hepes 24hr, Waymouths 24hr+T L hepes 18hr 및 Waymouths 30hr+T L Hepes 12hr 군으로 나누어 실험하였다.

EPS 의 첨가농도를 달리하고 관찰한 실험에서는 Waymouths 18hr+T L Hepes 24hr 의 배양에 있어서 실험군을 5% EPS, 10% EPS, 15% EPS 및 20% EPS 첨가군으로 나누어 실험하였다.

體外에서 成熟시킨 난모세포를 배양액으로 세정한 후 mineral oil 로 피복한 45μl 의 T L Hepes for fertilization medium 小滴에 5~6개의 난모세포를 주입한 후 수정능획득을 유기시킨 精子乳游液 2μl (1.5×10⁶/ml) 로 媒精하였다. 6~7시간후에 mineral oil 로 피복한 45μl 의 T L Hepes for culture and wash medium 小滴에 옮기고 16~18시간 배양하였다.

체외성숙 42時間後 난모세포의 1/2은 成熟率을 조사

하였으며, 나머지 1/2은 媒精後 22~25시간에 수정율을 검사하였다.

9. 受精의 判定

배양된 卵胞卵은 0.1% hyaluronidase(Sigma Chemical Co., USA)의 처리로 주위의 卵丘細胞層을 제거한 體外成熟卵이나, 受精卵을 slide glass 중앙에 고정시키고 acetic alcohol 1:3으로 48시간 정도 고정시킨 후 0.1% acetic orcein액으로 염색하여 位相差 顯微鏡하에서 卵胞卵의 核의 성숙 정도 및 受精 여부를 Shea 등(1976), Ball 등(1983)의 방법에 준하여 판정한다.

10. Chamber 내 gamete의 주입

준비된 pHema tube의 일단을 plug로 막고, 3~6개의 oocytes와 μ l당 1×10^8 의 sperm이 들어 있는 T L Hepes for fertilization medium 약 10 μ l를 內腔에 주입시키고, plug로 나머지 일단을 폐쇄시켜서 chamber를 만들었다.

11. Chamber의 mouse복강내 이식

Mouse를 ether로 마취시킨 후, mouse에 1cm 길이의 복벽절개를 하여 chamber를 mouse의 복강내에 외과적으로 이식하였다.

12. Chamber의 회수

외과적으로 이식한 후에 84시간만에 mouse를 ether로 마취한 후에 chamber를 복강으로부터 회수하여 수정 및 배양결과를 확인하였다.

III. 結果

20% EPS가 첨가된 배양액들을 사용하여 실험군을 Waymouths 12hr+T L Hepes 30hr, Waymouths 18hr+T L Hepes 24hr, Waymouths 24hr+T L Hepes 18hr 및 Waymouths 30hr + T L Hepes 12hr 군으로 나누고 돼지 난포난을 배양한 결과는 Table 1과 같다. 體外成熟率は 각 실험군에서 37, 52, 48 및 34%를 나타내었으며, 受精率は 각 실험군에서 23, 32, 26 및 19%를 나타냄으로서, Waymouths 24hr+T L hepes 18hr에서 가장 양호한 성적을 나타내었다.

Waymouths 18hr+ T L Hepes 24hr의 배양에 있어서, 실험군을 5, 10, 15 및 20% EPS첨가군으로 나누어 실험한 결과는 Table 2와 같다.

體外成熟率は 각 실험군에서 37, 42, 47 및 52%를 나타내었으며, 受精率は 각 실험군에서 21, 25, 28 및 30%를 나타냄으로써, 20% EPS를 첨가한 군에서 가장 양호한 성적을 나타내었다.

체외에서 성숙된 돼지 卵胞卵을 hydrogel chamber에 넣어서, intermediate mouse recipients의 복강에 이식하여 84시간 후에 chamber를 회수하여, chamber內 受精 및 培養을 시도한 결과는 Table 3과 같다. Donor 1에서는 변성상태 45%, 상실배기 22%, 포배기 33%를 나타내었고, Donor 2에서는 변성상태 55%, 상실배기 18%, 포배기 27%를 나타내었

Table 1. In vitro maturation and fertilization of porcine follicular oocytes

Culture systems	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured*(%)	No. of oocytes fertilized(%)
Waymouths 12hr + T L Hepes 30hr	216	80(37)	50(23)
Waymouths 18hr + T L Hepes 24hr	232	121(52)	74(32)
Waymouths 24hr + T L Hepes 18hr	201	96(48)	52(26)
Waymouths 30hr + T L Hepes 12hr	186	63(34)	35(19)

*The number of oocytes matured to the second metaphase.

Table 2. Effects of various estrous porcine serum added to culture media on *in vitro* maturation and fertilization of porcine follicular oocytes.

Serum	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured* (%)	No. of oocytes fertilized (%)
5% EPS	123	46 (37)	26 (21)
10% EPS	107	45 (42)	27 (25)
15% EPS	115	54 (47)	32 (28)
20% EPS	123	65 (52)	38 (30)

*The number of oocytes matured to the second metaphase.

Table 3. *In vivo* fertilization and culture of *in vitro* matured porcine follicular oocytes in hydrogel chamber implanted in the peritoneal cavity of intermediate mouse recipients.

Donor gilt no.	No. of oocytes cultured	Degenerated* ova (%)	No. of oocytes developed to (%) *	
			Morula	Blastocyst
1	9	4 (45)	2 (22)	3 (33)
2	11	6 (55)	2 (18)	3 (27)
3	9	4 (45)	3 (33)	2 (22)
4	10	4 (40)	3 (30)	3 (30)
5	8	4 (50)	2 (25)	2 (25)
Total	47	22 (47)	12 (25)	13 (28)

*Ova were examined at 84hr after implantation of hydrogel chambers.

으며, Donor 3에서는 변성상태 45%, 상실배기 33%, 포배기 22%를 나타내었다. 또 Donor 4에서는 변성상태 40%, 상실배기 30%, 포배기 30%를 나타내었으며, Donor 5에서는 변성상태 50%, 상실배기 25%, 포배기 25%를 나타냄으로써 양호한 성적을 나타내었다.

수란관에서 채취한 배란된 oocytes를 hydrogel chamber에 넣어서, intermediate recipients의 복강에 이식하여 84시간후에 chamber를 회수하여, chamber내 수정 및 배양을 시도한 결과는 Table 4와 같다. 5頭の Donors로부터 채취한 총 42개의 oocytes를 배양한 결과, 변성상태 10, 상실배기 14 및 포배기 19개가 나타났으며, 상실배기 이상 배양된 성적은 77%를 나타냄으로써 양호한 성적을 나타내었다.

IV. 考 察

Lipshultz(1982)는 雄性受胎能力을 평가하는 데는 정자의 수보다도 정자의 質이 더욱 중요성을 가진다고 하였다. 본 실험에서는 T L Heps for fertilization medium 10 μ l에 5~6개의 난모세포와 10 sperm cells를 주입하여 chamber내 수정을 이루었다. 따라서 복강은 정자 운동성의 보존을 도와준다는 사실과, 10 sperm cells로 *in vivo* culture가 가능하다는 사실을 알 수 있었다.

Pollard(1987)와 Pollard 및 Pineda(1988)는 家兔의 embryos 및 분리된 blastomeres를 intermediate mouse recipients의 복강에 이식된 hydrogel chamber내에서 배양하였다고 보고하였으며, 金(1989)과 Kim(1991)은 家兔의 oocytes를 chamber

Table 4. *In vitro* fertilization and culture of porcine oocytes in hydrogel chamber implanted in the peritoneal cavity of intermediate mouse recipients.

Donor gilt no.	No. of oocytes cultured	Degenerated* ova (%)	No. of oocytes developed to (%)*	
			Morula	Blastocyst
1	11	3(27)	3(27)	5(45)
2	8	2(25)	3(38)	3(38)
3	7	1(14)	2(29)	4(57)
4	9	2(22)	4(44)	3(33)
5	8	2(25)	2(25)	4(50)
Total	43	10(23)	14(33)	19(44)

*Ova were examined at 84hr after implantation of hydrogel chambers.

내에서 受精 및 배양을 하였다고 보고한 바 있다. 체외에서 성숙된 돼지 卵胞卵 및 배란된 oocytes를 chamber 내에서 수정 및 배양을 한 본 실험의 성적은 상실배기 이상의 발육을 볼 경우에, 난포난의 경우 53% 그리고 tubal oocytes의 경우 77%의 성적을 나타냄으로써 양호한 성적을 나타내었다.

In vivo culture에서 처리군의 신뢰성 있는 구분을 하는 데 있어서의 실패와 embryos의 손실들은 胚生存에 대한 실험영향을 평가하는데 있어서 심각한 제한을 만든다. 그러나 pHema chamber를 이용한 본 실험의 *in vivo* culture에서는 난자들을 전부 회수함으로써, chamber의 이용은 embryos 실험에 있어서 평가의 신뢰도를 높였다.

pHema chambers는 어떠한 크기 또는 형태로도 주형될 수 있으며, chamber의 제조방법은 확산성을 증가 또는 감소시키기 위하여 수정될 수 있다. 또한 chamber는 胚發育을 도와 주게 하기 위하여 다양한 種 및 위치에 이식될 수 있다. 그리고 적절한 기간의 *in vivo* culture후에 chamber를 이식위치로부터 회수하여, 내용물을 胚의 culture medium으로 사용하거나, 성장인자들을 분리하여 구명할 수 있을 것으로 사료된다.

IV. 摘要

체외수정은 人醫臨床 및 動物繁殖에 상당한 중요성을 갖고 있는데, 그 성공률이 높지 않은 실정이다. 돼지에

서 polymerized 2-hydroxyethyl methacrylate로 만든 hydrogel chamber를 사용하여 난모세포의 수정 및 배양이 가능한가를 알아 보기 위하여, Waymouth's medium 및 T L HEPES medium으로 preincubation한 卵胞卵 및 수란관에서 채취한 oocytes와, M199 medium으로 전처리한 精液을 주입시킨 chamber를 mouse의 복강내에 이식하고, 84시간이 지난 후에 chamber를 회수하고 eggs를 관찰하였으며, 그 결과 chamber내에서 수정과 배양이 양호한 성적으로 일어나는 사실을 알 수 있었다.

V. 引用文獻

1. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R.L. Ax, B.D. Bavister and N.L. First. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod., 28: 717-725.
2. Boland, M.P. 1984. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. Theriogenology, 21: 126-137.
3. Bowen, R.A. 1977. Fertilization *in vitro* of feline ova by spermatozoa from the ductus deferens. Fertil. Steril., 17: 144-147.
4. Brackett, B.G., D. Bousquet, M.L. Boice, W.J. Donawick, J.F. Evans and M.A.

- Dressel. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biol. Reprod., 27: 147-158.
5. Briones, H. and R.A. Beatty. 1954. Interspecific transfers of rodent eggs. J. Exp. Zool., 125: 99-118.
 6. Caro, C.M. and A. Trounson. 1986. Successful fertilization, embryo development, and pregnancy in human *in vitro* fertilization (IVF) using a chemically defined culture medium containing no protein. J. *In Vitro* Fertil. Embr. Trans., 3: 215-217.
 7. Chang, M.C. 1959. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. Nature 184: 446-467.
 8. Cheng, W.T.K. 1985. *In vitro* fertilization of farm animal oocytes. Ph. D. Thesis. Council for Nation Academic Awards.
 9. Edwards, R.G., B.D. Ravister and P.C. Steptoe. 1969. Early stages of fertilization *in vitro* of human oocytes matured *in vitro*. Nature, 221: 632-635.
 10. Fawcett, D.W., G.B. Wislocki and C.M. Waldo. 1947. The development of mouse ova in the anterior chamber of the eye and in the abdominal cavity. Am. J. Anat., 81: 413-443.
 11. Iwamatusu, T. and M.C. Chang. 1969. *In vitro* fertilization of mouse eggs in the presence of bovine follicular fluid. Nature 224: 919-920.
 12. Kim, M.C. 1991. Fertilization and culture of rabbit oocytes in hydrogel chambers implanted in the peritoneal cavity of mouse recipients. Theriogenology, 36: 435-441.
 13. Lipshultz, L.I. 1982. Beyond routine semen analysis. Fertil. Steril., 38: 153-155.
 14. Mahi, C.A. and R. Yanagimachi. 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. J. Exp. Zool., 196: 189-196.
 15. Noske, I.G. 1972. *In vitro* fertilization of the Mongolian gerbil egg. Experientia 28: 1348-1350.
 16. Pickworth, S. and M.C. Chang. 1969. Fertilization of Chinese hamster eggs *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 19: 371-374.
 17. Pollard, J.W. 1987. Controlled *in vivo* culture of mammalian embryos and blastomeres. Master of Science Thesis. Iowa State University.
 18. Pollard, J.W. and M.H. Pineda. 1988. Culture of rabbit embryos and isolated blastomeres in hydrogel chambers implanted in the peritoneal cavity of intermediate mouse recipients. J. *In Vitro* Fertil. Embr. Trans., 5: 207-215.
 19. Ratner, B.D. 1981. Biomedical application of hydrogels: review and critical appraisal, Vol. II. In: Williams, D.F. (ed.), Biocompatibility of Clinical Implant Materials. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 145-175.
 20. Seidel, G.E., R.A. Bowen and M.T. Kane. 1976. *In vitro* fertilization, culture and transfer of rabbit ova. Fertil. Steril., 27: 861-870.
 21. Shea, B.F., J.P.A. Latour, K.N. Bedirian and R.D. Baker. 1976. Maturation *in vitro* and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes. J. Anim. Sci., 43: 809-815.
 22. Sreenan, J. 1970. *In vitro* maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes. J. Agr. Sci., 75: 393-396.
 23. Toyoda, Y. and M.C. Chang. 1974. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of the eggs following transfer. J. Reprod. Fertil., 36: 9-22.
 24. Yanagimachi, R. and M.C. Chang. 1963.

- Fertilization of hamster eggs *in vitro*.
Nature, 200 : 281-282.
25. Yanagimachi, R. and M.C. Chang. 1964.
In vitro fertilization of golden hamster ova.
J. Exp. Zool., 156 : 361-376.
26. Yoshida, M. 1987. *In vitro* fertilization of
pig oocytes matured *in vivo*. Jpn. J. Vet.
Sci., 49 : 711-718.
27. Yoshida, M. 1989. Improved viability of
two-cell stage pig embryos resulting from *in
vitro* fertilization of oocytes matured *in
vivo*. Japan. J. Anim. Reprod., 35 : 35-37.
28. 金明哲. 1989. 소 및 家兔에 있어서 Chamber 內
受精에 관한 研究. 한국수정란이식연구회지, 4 :
21-27.