

돼지 체외수정의 현황과 문제점

류 일 선

국립종축원 종축위생과

The Present Situation and Problems of *In Vitro* Fertilization in Swine

I. S. Ryu

Breeding Stock Health Division

National Animal Breeding Institute

SUMMARY

1. *In vitro* system, LH and FSH accelerated and facilitated meiotic progression, and LH selectively improved cytoplasmic maturation which is required to promote the formation of a male pronucleus.
2. Caffeine (2mM) in the fertilization medium was required not only for inducing zona penetrating ability of boar also for developing to the male pronucleus of the penetrating spermatozoa *in vitro*.
3. The germinal vesicle (GV)stage was observed for the first 17.6 hr;germinal vesicle break-down (GVBD)stage between 17.6~26.4 hr;metaphase I(M-I)from 26.4 - 30.9hr;anaphase I(A-I)ranged from 30.9~33.4hr;telophase I(T-I) at 33.4~34.4hr; and metaphase II(M-II) at 34.4~48hr.
4. The addition of 10%(v/v) pig follicular fluid (pFF) to maturation media significantly increased the rate of nuclear maturation of pig oocytes ($p<0.01$), whereas the rate of nuclear maturation of pig oocytes among three different media did not differ.
5. The presence of a primary culture of POEC promotes *in vitro* development of early cleavage stage pig embryos.

서 론

가축 난포란의 이용에 관한 연구는 Edward (1962)가 소와 돼지의 난자의 체외성숙을 시도한 이래 *in vivo* 에서 성숙된 난자를 체외수정을 시켜 정상자돈을 생산한 결과가 Cheng(1985), Yoshida (1987), Nagai등(1988)에 의해서, 도축장의 폐기되는 난소의 난포란을 체외에서 성숙, 수정, 배양을 하여 이식한 후 정상산자를 생산한 결과가 Mattioli 등 (1989)에 의하여 보고되었다.

돼지의 체외수정은 외래유전자의 도입(Hammer 등, 1985; Viza 등, 1988)에 필요한 전핵기 수정란 채취가 용이하고, 미성숙 암돼지의 난소란 이용 정액의 질의 검정 및 이용, 생식기를 필요치 않기 때문에 질병의 control 이 완전 가능하고, 번식효율의 증대에 공헌하는 수정생리의 정보를 제공한다는 측면에서 보다 활발히 연구되고 있다.

그러나, 그 성공 예는 적고 수태성이나 산자 발생율이 낮은 등 개선해야할 점이 많은 실정이다.

최근의 돼지 체외 수정기술을 살펴보면서 그 연

구의 현황과 문제점에 대해 서술코자 한다.

1. 난자의 채취와 체외배양

난포내 난자는 도축장에서 채취한 난소의 직경 2~5mm의 미성숙 난포로부터 채취하고 난구 세포층이 긴밀히 부착된 것만을 회수하였으며, 난소는 생리 식염수(100IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin 첨가)중에 넣어 35 $^{\circ}$ C로 보온된 마호병에 넣어서 실험실로 갖고 왔다.

도축장에서 실험실까지의 소요시간은 1 시간 이내로 하였다.

난자는 18gauge의 주사침이 부착된 5ml plastic syringe로 흡인 채취하였으며 38 $^{\circ}$ C로 조정된 가온판 위에 둔 멸균된 culture dish에 흡인된 난포액을 10~20분간 정치시킨 후 실험에는 McGaughey 등(1979)의 COCs(cumulus oocyte complexes) 즉 난구세포층이 팽윤화한 것만 선별해서 사용하였다.

선별된 난자는 mTCM-199 배지에 각각 3~4회 세정한 후 그 세정한 난을 10~15개를 한 군으로 하여 멸균 유동 파라핀으로 피복된 미소적 배지 0.2ml에 옮겨 5% CO₂, 95% in air incubator 39 $^{\circ}$ C에서 36 시간 체외 배양했다.

난자의 채취로부터 배양까지의 소요시간은 1 시간 이내로 하였으며 배양이 종료된 후 난자는 수정배지의 미소적 배지 0.2ml에 옮긴 후 실험에 성공했다.

일반적으로 포유동물은 출생 전후에 성숙분열을 유지해서, 그 이후 성숙분열의 재개는 배란 직전까지 일으키지 않는데, Pincus(1935) 등은 난포로부터 미성숙란을 채취하여 적당한 조건하에서 체외배양한다면, 성숙분열을 재개해서 제 2 성숙분열 중기에 도달한다고 보고했다.

도축장에서 용이하게 회수한 미성숙란은 체외성숙, 수정해서 정상 수정란의 생산이 가능하다면 발생, 생리학 연구에의 공급이 가능하고 실용면에서의 가능성이 더욱 높아진다.

Ishizaki(1988)는 체외 성숙난자는 높은 수정율을 가지나, 다정자 수정, 다난핵 수정 등의 이상수정의 비율이 높고 응성전핵 형성이 낮은 것을 그 문제점으로 지적하였으며, 그 요인으로서의 난자의

핵이나 세포질의 성숙이 불충분한 것으로 보고했다.

포유동물의 정자는 난에의 침입하기 전에 암컷 생식기내에 일정시간 머물러 생리, 생화학적 변화를 일으키는 수정능 획득(Austin, 1951; Chang, 1951) 및 형태학적 변화를 일으키는 선체반응(Austin과 Bishop; 1958)이 필요하다.

따라서 돈 사출정자의 수정능획득과 선체반응을 유기하는 하나의 방법으로서 적출암돈 생식기내에서 전배양(Imai 등, 1997, 1979; Iritani 등, 1978)한 방법은 정자의 성상이 일정하지 않고 안정되고 좋은 생식기 재료를 얻기 어려운 결점이 있는 반면에 Pavlok(1981)은 합성배지에서 체외배양한 돼지 사출정자의 ZP 제거한 hamster 및 돈난에의 침입을 처음으로 보고하였으며 정자의 전배양시간 및 전배양시의 정자농도가 침입능의 발현에 영향을 미친다고 지적하였다.

그 후 Cheng(1985)은 Pavlok법을 개량해서 체외배양된 사출정자를 이용한 돈 난자의 체외수정에 성공하였으며, Toyoda(1985)도 Ionophore A23187로 처리한 돈 사출정자의 돈 난자 침입을 보고하였다.

Garner(1983)는 정자의 세정방법으로 percoll을 이용한 밀도 경사원심분리법을 보고했는데 이는 원정자액을 거의 회석함이 없이 처리 가능한 잇점때문에 물리적인 충격을 배제하고 정장이나 기타 정자 이외의 물질에서 고율로 정자를 간단히 분리 가능한 방법이다.

정소상체 정자는 실온에서 1, 2일 밖에 보존할 수 없고 사출 정자는 채취하는 날에 따라 수정율이 다를 수가 있는 것이 문제점이다.

Table 1에서 보는 바와 같이 수정율에서는 모든 처리구에서 유의적인 차 ($p>0.05$)는 없었으나, 응성 전핵형성은 내 처리구가 다른 처리구보다도 유의적으로 높았다. ($p<0.01$)

2. 정자의 채취와 전처리

정액의 채취는 의빈대를 이용하여 수장압법(手掌壓法)으로 그중의 gauze을 씌운 멸균병에 교양물(膠樣物)을 제거하면서 농후부분을 채취한다.

원정액은 황산 kanamycin(100 μ g/ml)을 첨가해서 28~30 $^{\circ}$ C로 보온해서 실험실로 갖고 온 후, 미리

Table 1. Effect of LH and FSH on the formation of male pronucleus in pig oocytes *in vitro* fertilization

	Treat			
	LH	FSH	LH+FSH	CONTROL
Oocytes	131	163	93	171
Fertilization rate	85 %	71 %	77 %	77 %
Percentage of oocytes forming a male pronucleus	73 % ^a	44 % ^b	74 % ^a	48 % ^b

a, b) Different letters indicate significantly different values ($p < 0.01$) Mattioli M. et al (1991)

준비해 둔 정자보존액과 동량으로 희석한 다음 15℃의 항온실내에 보존했다. 정자의 전처리법은 다음순서에 의해 처리했다.

- 1) 90% percoll액, 45% percoll액, 정액순으로 각각 2ml동량을 조심스럽게 원심관에 주입한 후 2,100rpm 30분간 원심한다.
- 2) 원심관내의 상청을 멸균된 유두관 부착 pipette로 흡인 제거후 침사(沈査)에 정자세정액 10ml을 가해서 충분히 혼합한 후 2,100rpm 5분간 원심을 2~3회 반복한다.
- 3) 원심후 상청을 버린 후 침사(沈査)에 정자전배지액 10ml을 가해 희석후, 정자농도를 Toma형 혈구계산판에서 산정하고, 정자의 전진 운동성 (progressive motility)을 검사했다.
- 4) 정자농도가 21×10^8 정상정자/ml로 되도록 전배양 배지약으로써 희석한 후 그중 2~4ml을 멸균시험관에 옮긴 후 밀전(密栓)시킨 후 5% CO₂, 95% in air, 37℃에서 4시간 전배양을 하였다.

Table 2에서와 같이 정자희석시만의 caffeine (+)구에서는 수정율, 응성전핵 형성을 및 침입 정자수는 희석과 매정시 caffeine 첨가를 한 구보다도 유의적으로 낮았다

3. 배지와 배양조건

정자전배양 배지는 mTCM-199배지에 7.5% NaHCO₃ soln을 첨가 pH 7.8로 조정하였으며, 수정배지는 B.O. 배지에 무수 caffeine를 2mM을 첨가했다.

성숙배지는 M 199m 10% fetal calf serum (FCS), gonadotrophins (FSH: 10IU/ml; HCG 10IU/ml, 그리고 gucosarmine 0.53g mg/ml을 첨가된 것을 사용했으며 pH는 5% CO₂ 기상하에서 7.4로 평형시켰다.

난의 배양 및 체외수정은 39℃, 5%, CO₂, 95% in air의 기상하에서 행하였으며 난의 체외 조작은 38℃의 microgram plate위에서 실시하였다.

체외수정에 이용되는 배지는 크게 2개의 group으로 구분되는바 하나는 간단한 조성으로 이루어진

Table 2. Effect of caffeine in fertilization medium

Caffeine addition		No. of fertilization (%)	Forming a male pronuclei (%)	Sperm /egg ($\times \pm$ SEM)
dilution	fertilization			
+	-	65.2 ^a (45 / 69)	4.3 ^a (2 / 45)	1.7 \pm 0.9 ^a
+	+	100.0 ^b (62 / 62)	54.8 ^b (34 / 62)	10.0 \pm 5.1 ^b

Sperm concentration : 200ml (Yoshida, 1989)

a v s b : $p < 0.001$

평형 염류용액에 혈청 albumin이나 여러가지 기질을 첨가한 배지인 단순배지이며, 다른 하나는 Ham's F-10 또는 TCM-199와 같은 복합배지로 단백질 혹은 혈청이 첨가되는데 체외배양에 의해 성숙율이 낮은 이유로 성숙배양의 배지 및 배양시간이 연구자에 따라 각양각색으로 보편적인 것이 없는 등 그 검토의 여지가 많다.

4. 체외수정 및 체외발생

정자는 전배양종료후 최종 정자농도가 2×10^4 /ml로 조정된 다음 난이 있는 수정배지의 미소적대 0.2ml로 옮겨 체외 배양했다.

매정후 6~7시간에서 난은 발생배지에서 2회 매정한 후 10개를 한 군으로 하여 발생 배지의 미소적 0.1ml에 옮겨 체외 발생을 행하였다.

또한 이 매정조작시에는 난 투명내 주위의 잉여의 정자나 난구세포는 피펫팅(pipeting)에 의한 방법으로 제거하였다.

Menino 등(1982)과 Pavlok(1981)은 체외수정란의 난분할율은 체내수정란과 유사하였다고 보고하였다.

Davis(1985)는 4세포기 이전의 체란된 돼지 수정란의 대부분은 체외에서의 계속된 분할은 어렵다고 지적하였다.

5. 난의 성숙, 수정 및 발생상황의 검사

난의 성숙, 수정 및 발생상황은 도립현미경을 이용하여서 난의 생체관찰을 한 후, 난을 고정, 염색후 위상차 또는 미분간섭 현미경을 사용하여 검사했다.

- ① 난의 세정후 소량의 액과 같이 4각(角)에 (paraffin:vaselline = 1:9)를 slide glass의 중앙에 놓은 다음 cover glass을 덮어 whole

mount 표본을 작성했다.

- ② 초산 알코올 (초산:methanol = 1:3)으로 고정한 후 고정액중에 1~3일 보존한 후 1% 초산 orcein(45% acetic acid에 용해) 액으로 염색했다.

배란 직후의 난자의 핵성숙 상황은 Hunter와 Polge(1966)의 판정기준에 따라 ① 난 핵포기 (germinal vesicle;GV)란, ② 난 핵포붕괴기 (germinal vesicle break-down;GVBD, 제1성숙 분열중기에서 종기)란 ③ 제1극체를 동반한 제2성숙분열중기(Metaphase II; Met II)란으로 분류해서 판정했다.

체외수정후의 난의 성숙, 수정상황은 ① 제1극체를 방출한 난을 성숙란 ② 난세포질 내 미부를 동반한 난을 수정란 ③ 복수의 정자 두부나 응전핵을 가진 난을 다정자 수정란 ④ 미부를 수반하지 않고 복수의 전핵을 가진 난을 다난핵 수정란 ⑤ 제 1, 2극체 자(雌)성 전핵 및 미부를 동반한 응성전핵을 1개씩 가진 난을 정상수정란으로 판정했으며 체외수정후, 체외발생된 난은 난세포질이 분할한 것을 난할란으로 하여, 고정, 염색후 각 할구에 핵을 1개씩 가지고 제 1, 2극체가 관찰된 난을 정상난할란으로 판정했다.

Fig.1에서와 같이 Ocampo(1991)은 체외배양된 돼지난자의 제 1 차 감수분열 중에 염색체상(상)에서 난포기 (GV)평균 17.6 시간;난핵포 붕괴기 (GVBD)는17.6~26.4 시간; 중기 I(M-I)은 26.4~30.9시간; 후기(A-I)은 30.9~33.4시간, 종기 I(T-I)은 33.4~34.4시간;중기 II(M-II)는 34.4~48시간 이었다고 보고했다.

6. 난의 이식

수란돈의 발정동기화는 공란돈보다 발정이 0.

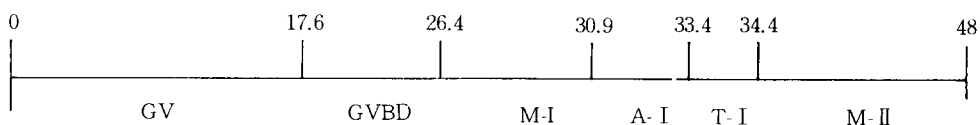


Fig. 1. The time sequence of various chromosome configuration during the 1st meiotic division is shown at the bottom of the graph. Each stage represents a fraction of 48 hr.

5~1일 늦게 발현되도록 조절하고 그 방법은 다음과 같다.

- ① 발정주기 제 19일에 HCG 500IU 근육주사
- ② 발정주기 제 15일에 PMSG 1,000IU 근육주사, 84시간후에 HCG 500 IU의 근육주사
- ③ Pursel(1985)등의 방법으로 발정주기 10~12일에 Altrenogest을 사료중혼합(20mg /일)하여 7~10일 수란돈에 경구투여하고 투여 종료의일에 PMSG 1,000 IU을 근육내 주사, 76~84시간에 HCG 500 IU을 근육주사

난 이식은 수란돈에의 HCG 투여후 54~60시간사이에 행한다.

Hermann 등 (1985)는 토끼난관에서 배양된 돼지 수정란의 재이식에서 배양시간의 경과에 따라 임신율과 배생존율이 감소한다고 보고하였다.

또한 Davis 와 Day(1978)는 돼지 수정란은 2~3일 이상동안 발육중 체외에서 24시간이상 보존후 이식시는 임신율은 감소한다고 지적하였다.

7. 공 배양 (CO-Culture)

Motilik 과 Fulka가 돈 난자에의 정자침입은 가능하나 정자 두부는 팽윤하지 않고 응성전핵 형성율이 낮았다고 지적한 바와 같이 이러한 문제점을 해결하기 위한 연구가 Mattioli 등 (1988)이 난포세포 (follicular cell), Naito 등 (1988), Yoshida 등 (1992)이 돈 난포액 (pig follicular fluid: PFF)에 의해 행해지고 있다.

Naito 등(1987)은 PFF에는 응성전핵능을 촉진하는 작용이 있다고 보고하였으며 그 작용은 FSH에 의해 증강된다고 하였다.

Table 4에서와 같이 성숙배지에 돈난포액 10%첨가는 난자의 핵성숙율이 유의적으로 증가한 반면 서로 다른 배지에서는 별 차가 없었다.

Table 4에서 POEC는 4 cell -block (POEC와 PEF-POEC에 배란된 난의 11%와 7%만이 4-cell block을 경과시 발육에 실패했다.)을 경과하는 돼지난분할에 필요한 요인들을 제공하고 탈출 배반포기에 도달하게 한다.

결 론

- 1) 수정율에서는 모든 처리구에서 유의적인 차 ($p > 0.05$)는 없었으나 응성전핵 형성은 LH 처리구가 다른 처리구보다도 유의적으로 높았다. ($p < 0.01$)
- 2) 정자 회석시만 caffeine (+) 구에서는 수정율, 응성정액 형성을 및 침입정자수는 회석과 매정시 caffeine 첨가를 한 구보다도 유의적으로 낮았다.
- 3) 체외배양된 돼지 난자의 제1차 감수분열 염색체상은 난포기가 (GV) 평균 17.6시간, 난액포 붕괴기(GVBD)가 17.6~26.4시간, 중기 I (M-I)이 26.4~30.9시간, 후기 I(A-I)은 30.9~33.4시간, 중기 I(T-I)은 33.4~34.4시간 :

Table 3. Effects of maturation media and pig follicular fluid (PFF) on nuclear maturation, penetration, and pronucleus formation in pig oocytes

Addition of pFF		No.(%) of oocytes		
		Nuclear maturation	Sperm penetration ^a	Male pronucleus formation ^b
mTCM-199	+	91/134 (68)*A	80/ 91 (88)	44/ 80 (55)*A
	+	120/130 (92)*B	104/120 (87)	65/104 (63)*A,C
Waymouth	-	86/134 (64)*A	81/ 86 (94)	70/ 81 (86)*B
	+	117/124 (94)*B	110/117 (94)	100/110 (91)*B
mTLP-PVA	+	106/152 (70)*A	92/106 (87)	41/ 92 (45)*A,D
	+	104/118 (88)*B	98/104 (94)	46/ 98 (47)*A,D

a. In matured oocytes.

b. In matured and penetrated oocytes.

* $p < 0.01$ for A vs. B within each column; $p < 0.05$ for C vs. D within each column.

Table 4. *In vitro* development of pig embryos after culture in various culture systems

Treatment	Initial stage				Stage of development	
	2	4	8	16	Blastocyst	Hatched blastocyst
PEF	12	14	13	21	16(27%) ^a	14(23%) ^a
POEC	13	14	14	22	44(70%) ^b	34(54%) ^b
PEF-POEC	12	15	12	22	41(67%) ^b	37(61%) ^b
DMEM	11	15	14	21	10(16%) ^a	1(2%) ^a

a. b. Data in columns with different superior are different ($p < 0.05$) Whight et al(1989)

POEC; porcine oviductal Epithelial cells

PEF; porcine fetal fibroblast monolayer

PEF-POEC; A combined POEC and PEF co-culture system

DMEM; Dulbecco's modified eagle medium

중기 II(m-II)는 23.4~48시간이었다.

- 4) 성숙배지에 돈난포액 10% 첨가는 돈난자의 핵성숙율의 유의적 ($p < 0.01$) 으로 증가한 반면 m TCM-199, Waymouth, mTLP-PVA 배지에서는 별차가 없었다.
- 5) POEC 는 4cell block(POEC와 PEF-POEC 에 배양된 난의 11%와 7%만이 4-cell을 경과 발육하는데 실패)은 경과로 돼지난분할에 필요한 요인을 제공하고 탈출 배반포에 도달하게 한다.

참고문헌

- Austin CR. 1951. Observation on the penetration of sperm into the mammalian egg, Aust, J, Sci, Res, (B) 4, 581-592.
- Austin CR and Bishop AWH. 1958. Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization, Proc. Royal Soc(Lond) Ser. B 147, 241-248
- Chang MC. 1951. The fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes, Nature(Lond) 168, 697-698.
- Cheng, WTK. 1985. *In vitro* fertilization of farm animal oocytes PH, D, Thesis, Council for Nation Academic Awards.
- Davis DL. 1985. Culture and storage of pig embryos, J. Reprod. Fertil.(suppl) 33:115-124.
- Davis DL. and Day BN. 1978. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*. J. Anim. Sci. 46 : 1043-1053.
- Edwards RG. 1962. Meiosis in ovarian oocytes in adult mammals. Nature, Lond. 196:446.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Jr Wall RJ, Bolt DJ, Ebert RM, Palmitier RD and Brinster RL.1985. Production of transgenic rabbits, sheep, and pigs by microinjection, Nature(Lond), 315, 680-683.
- Herrmann HH and Holtz W. 1985. Storage of pig embryos in the ligated rabbit oviduct and its effect on the viability after retransfer to synchronized gilts. Anim. Reprod. Sci. 8:159-170.
- Hunter RHF and Polge C. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophins.
- Imai H, Niwa K and Iritani A. 1977. Penetration *in vitro* of zona-free hamster eggs by ejaculated boar spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 51. 495-499.
- Imal H, Niwa K and Iritani A. 1979. Time requirement for capacitation of boar spermatozoa assessed by their ability to penetrate the zona-free hamster egg. J.

- Reprod. Fertil. 56: 489-492.
- Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penetration *in vitro* of pig follicular oocytes matured in culture. J. Reprod. Fertil. 54: 379-383.
- Ishizaki Y, Yoshida M, Kojima Y, Kawagishi H and Mizuo T. 1988. Meiosis promoting activity in porcine follicular fluid. J. Mamm. Ova. Res. Vol. 5, No.1 40-41.
- Mattioli M, Bacci M. L, Geleati G and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*, Theriogenology 31:1201-1207.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G and Seren E. 1991. Effect of LH and FSH on the maturation oocytes *in vitro*. Theriogenology 36: 95-105.
- Mattroli M, Galeati G, Seren E. 1988. Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on pig penetrating and male pronucleus formation, Gamete Res. 20:177-183.
- McGaughey RW, Montgomery DH and Richter JD, 1979. Germinal vesicle configurations and patterns of polypeptide synthesis of porcine oocytes from antral follicles of different size as related to their competency
- Menino AR and Wright RW, Jr. 1982. Development one-cell porcine embryos in two culture system, J. Anim. Sci. 54:583-587.
- Naito K, Fukuda Y and Toyoda T. 1988. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. Gamete Res 21:289-295.
- Naito K, Hamano S, Kaneda M, Ishizawa A, Suzuki M, Fukuda Y and Toyoda Y. 1987. The effect of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. J. Mamm. Ova. Res. Vol. 4 No. 1 59-60.
- Nagai T, Takahashi T, Masuda H, Shioyo Y, Kuiwayama M, Fukushima M, Iwasaki S and Hanada A. 1988. *In vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. I Reprod. Fert. 84 : 585-591.
- Ocampo MB, Ocampo LTC and Kamagawa H. 1991. Timing of sequential changes in chromosome configurations during the 1st meiotic division of pig oocytes cultured *in vitro*. Jpn. J. Vet. Res. 38. 127-137.
- Pavlok A. 1981. Penetration of hamster and pig zona-free eggs by boar ejaculated spermatozoa preincubated *in vitro*. Int. J. Fertil 21:101-106.
- Protein synthesis and nuclear envelope formation in pig oocytes matured *in vitro*. J. Mamm. Ova. Res. Vol. 4 No. 1 59-60.
- Pincus G and Enzmann, EV. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. J. Exp. Med. 62, 665-675.
- White KL, Hehnke K, Rickords LF, Southern, LL, Thompson DL, JR and Iwood TC. 1990. Early embryonic development *in vitro* by co-culture with oviductal epithelial cells in pigs, Biol. Reprod 41 425-430.
- Viza PD, Michalska AE, Ashman R, Llooyd B, Stone BA, Quinn P, Wells JRE and Seaman RF, 1988. Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth J. Cell. Sci. 90 295-300.
- Yoshida M. 1989. Studies on *in vitro* fertilization and *in vitro* maturation of pig follicular oocytes Ph D thesis.
- Yoshida M. 1987. *In vitro* Fertilization of pig oocytes matured *in vitro*, Jpn. J. Vet. Sci 49 (4):711-718.
- Yoshida M, Ishizaki K and Pursel VG. 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro* molecular Reprod. and Dev. 31:68-71.
- 豊田裕 1985 ふたにおける体外受精 - とくにイオノホアによる精子受精能獲得-家畜繁殖誌 31, 40-44.