

碩士學位論文

發情牛血清의 添加가 돼지 卵胞卵의
體外成熟에 미치는 影響

濟州大學校 大學院

畜産學科



1990年 12月

發情牛 血清의 添加가 돼지 卵胞卵의
體外成熟에 미치는 影響

指導教授 金 重 桂

金 瑩 勳

이 論文을 農學碩士學位 論文으로 提出함.

1990年 12月

金瑩勳의 農學碩士學位 論文을 認准함.

審査委員長

委 員

委 員

濟州大學校 大學院

1990年 12月

Effects of Estrus Cow Serum on in Vitro Maturation of Pig Follicular Oocytes

Young-Hoon, Kim
(Supervised by Professor Jung-Kye, Kim)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1990. 12

目 次

Summary	1
I. 結 論	3
II. 研 究 史	5
1. 培養液 添加劑	5
2. Follicular cell 共同培養	7
III. 材 料 및 方 法	9
1. 試驗期間 및 場所	9
2. 供試卵巢	9
3. 培養液	9
4. 試驗方法	11
IV. 結 果 및 考 察	14
1. 卵胞卵의 採取와 成熟段階	14
2. 培養液內 ECS의 添加效果	16
V. 摘 要	31
參 考 文 獻	33
謝 辭	41

Summary

Studies were done to determine the effect of estrous cow serum(ECS) in a culture medium on the development of pig follicular oocytes. Oocytes with various configuration of cumulus cell mass were collected from ovaries of mature gilts by aspirating with syringe equipped with needles of different gauges. They were cultured in TCM-199 medium containing ECS or FCS(fetal calf serum) for 30 - 48 hours in a incubator with air containing 5% CO₂ at 38.5°C.

Results are summarized as follows:

1. Recovery rates were 55.8, 55.5 and 34.4% when the cumulus-compacted oocytes were collected with 18-, 21-, 26-gauge needles of syringes, respectively.
2. Seventy nine percent of oocytes with compacted cumulus cells were at GV stage and most of the oocytes with partially denuded and denuded cumulus cells were at from GVBD to M-II stages .
3. Percentage of mature oocytes among those cultured in the medium containing ECS (55.7) was higher than that found with the medium containing FCS (36.5).

But the values found in oocytes with well expanded cumulus cells were similar in both groups when cultured for 36 hours.

4. Percentage of mature oocytes among those with a follicular diameter

- of 1-2mm, 3-6mm or over 6mm was 42.6, 53.2 or 60.8, respectively.
5. Percentage of mature oocytes among those with compacted, partially denuded or denuded was 60.5, 46.2 and 35.4, respectively.
 6. Percentage of mature oocytes among those cultured in a group of 7-8, 15, 21, or 30 oocytes was 58.7, 54.2, 54.8 and 56.7, respectively.
 7. Percentage of mature oocytes among those cultured in the medium containing 10, 15, 20 or 25% ECS was 55.5, 58.0, 54.7 or 66.3, respectively. The value obtained with the medium containing 25% ECS was significantly higher than the other.
 8. Percentage of mature oocytes among those cultured for 30, 36, 42 or 48 hours in the medium containing 25% ECS was 24.6, 36.2, 53.8 or 58.3, respectively. The higher value was found with 42-hour incubation than 36 hour.
 9. Percentage of mature oocytes among those co-cultured with monolayers of cumulus cells was higher (57.1) than that found with oocytes cultured alone (53.4).

I. 緒 論

一般的으로 哺乳動物의 卵子는 雌雄前核(female-male pronucleus)이 融合하여 受精卵의 性이 雌性으로 決定되면 原始生殖腺이 卵巢로 分化되고 胎兒期에 이미 原始卵母細胞가 形成되며, 出産後 第一減數分裂前期에서 發育이 중지된다. 性成熟이 가까워지면서 卵母細胞는 卵核胞(germinal vesicle)을 形成하게 되고 gonadotropins의 作用으로 第一減數分裂(成熟分裂)이 재개되어 第一極體의 放出과 더불어 排卵을 일으킨다. 排卵된 成熟卵子는 卵管膨大部에서 精子和 受精, 分割을 계속하면서 數日後에 子宮으로 下降하고 확장된 胚盤胞가 透明帶에서 脫出(孵化)되어 着床을 하게 된다.

이러한 體內繁殖機作的 進行過程을 體外(in vitro)에서 人爲的으로 正確히 實現시켜 産仔를 生産하는 技術의 適用은 發生工學的 측면에서 대단히 중요하며 이는 原始卵母細胞의 體外成熟, 受精 그리고 發生등으로 크게 分類할 수 있다. 그러나 正常的 發生能力을 가진 良好한 受精卵의 生産을 위해서는 諸要因이 存在하고 있는바 이를 把握하고 基礎的인 技術을 習得하여 應用하는 것은 필수적인 것이다.

이러한 哺乳動物 卵胞卵의 體外成熟培養은 Pincus와 Enzmann(1935)이 처음 家兔卵胞卵을 採取, 單純培養液(simple media)에서 培養하여 體內에서와 같은 結果를 報告하여 이의 可能性을 提示하였다. 그후 研究初期에는 卵胞卵의 發生生理를 究明하기위한 手段으로 實驗이 遂行되어져 왔지만, 體外成熟시킨 卵胞卵을 受精後 桑實胚나 胚盤胞까지 發育시켜 受卵畜(recipients)에 移植하여 産仔를 分娩시킴으로서(Goto 등, 1988) 이에 대한 關心이 高調되어 왔다. 앞으로 卵胞卵을 이용하여 正常的인 發生能力(developmental ability)을

가진 受精卵을 生産할 수 있는 技術開發이 이루어 진다면, 低廉한 價格으로 受精卵을 多量生産하여 家畜의 改良 및 效率性 向上을 할 수 있어 發生工學的 尖端技術의 研究와 應用에 큰 도움이 될 것이다. 現在에 이르러 소(Leibfried와 First, 1979; Shioya 등, 1988), 면양(Moor와 Trounson, 1977), mouse (Cross, 1973), rat(Bar-Ami와 Tsafiriri, 1981) 등에서 많은 研究가 遂行되어져 왔지만 體外受精卵의 發育이나 移植후 産仔의 分娩成績은 低調한 實情이다.

한편, 近來에 牛卵胞卵의 體外成熟培養時 蛋白質 供給源으로 一般的으로 많이 使用하는 牛胎兒血清(FCS)과 牛血清알부민(BSA) 대신 發情牛血清(ECS)을 添加하여 培養함으로써 體外受精 및 胚發生率에 良好한 效果가 얻어지고 있음이 報告되었다(Sanbuissho와 Threlfall, 1990). 그리고 發情牛血清의 使用은 商品화된 牛胎兒血清(FCS)이나 gonadotropins과 性 steroid hormone을 구입하여 使用하는 것보다 低廉한 價格으로 容易하게 이용할 수 있는 長點이 있다.

그러나 이에 관한 研究報告가 많지 않고 특히 돼지에 있어서는 一部 報告(金 등, 1990)가 있으나 明確하게 定立되지 못하고 있다. 그러므로 本 研究는 돼지 卵胞卵 體外成熟에 있어서 發情牛血清을 培養液內 添加하기 위한 適合한 條件을 究明하고 여기서 얻어진 成績을 基礎로 體外受精에 應用하는데 그 目的이 있다.

II. 研究史

哺乳動物의 卵胞卵 體外成熟에 關한 報告(Edward, 1965)가 있은후, 卵胞卵 體外培養에 대한 研究가 活潑히 進行되어, 家畜에서는 주로 돼지(McGaughey 와 Polge, 1972; Yoshida 등, 1989), 소(Leibfried와 First, 1979; Goto 등, 1988) 그리고 면양(Moor와 Crosby, 1985; Cheng 등, 1986) 등에서 持續的 研究發展이 이루어져 왔다.

Edward(1965)는 hormone과 血清成分이 添加되지 않은 單純 培養液(simple media)에서 卵核胞崩壞(Germinal vesicle breakdown)를 일으키는 自發的 成熟(spontaneous maturation)現狀을 報告하였는데, 體外成熟 卵胞卵을 體外受精에 共用하게 되면서 卵胞卵成熟(nuclear maturation)뿐만 아니라 受精후 體外發生率을 向上시키는데 重點을 두고 研究가 遂行되어져 왔다(Moor와 Trounson, 1977; Mattioli 등, 1989; Naito 등, 1989; Sanbuissho 와 Threlfall, 1989).



1. 培養液 添加劑

卵胞卵 體外成熟에서 血清成分은 卵胞卵 發育에 매우 重要的 蛋白質 供給源을 提供하게 되는데, 주로 牛血清알부민(BSA), 牛胎兒血清(FCS) 그리고 發情牛血清(ECS)등을 사용하고 있다. 研究 初期에는 주로 BSA를 사용하였으나 (McGaughey 와 Polge, 1972; Cross, 1973; Sato 등, 1978 a, b; Bae와 Foot, 1975), mouse(Cross와 Brinster, 1970)와 牛卵胞卵(Shea 등, 1976)에서 FCS 添加가 BSA 添加培養보다 成熟率이 良好하다고 報告된 후, Leibfried-Rutledge등 (1986)도 소와 햄스터의 卵胞卵成熟率 및 受精卵에 BSA(6mg/ml)添加보다 FCS

(10%)가 優秀하다고 하였다. 그리고 면양(Moor와Trounson,1977)과 소(Fuku i와 Ono,1989)에서 hormone을 添加하지 않고 FCS만을 添加하였을 때 體外成熟은 이루어지지만, 受精時 前核形成 및 胚發生率이 不良하다고 報告하였다.

卵胞卵에서 gonadotropin(FSH,LH)은 卵丘細胞를 刺戟하여 物質代謝를 變化시키고 卵丘細胞와 卵子 및 卵丘細胞 상호간 結合을 파괴시켜 卵胞液內에 있는 抑制物質의 移動을 차단하므로써 卵子的 成熟再開를 誘導하게 된다(Salsturi 등,1983).

Moor와 Trounson(1977)의 報告에 의하면 면양의 卵胞卵 培養에서 FSH와 LH를 添加하여 小卵胞와 大卵胞에서 各各 19%와 73%의 metaphase II 發生率을 보인 반면, 無添加區에서는 卵核胞期 단계에서 發育이 중지됨으로서 gonadotropin 이 卵胞卵 成熟에 效果的임을 發表하였다.

한편, 소에서 Suss 등(1988)은 FSH 添加로 卵胞卵 成熟率 向上을, Shioya 등(1988)은 LH와 estradiol-17 β 를 동시에 添加하여 높은 成熟率을 發表하였다.

Shalgi 등(1979)이 rat에서 LH의 添加로 卵胞卵의 成熟率 向上을 報告하였고, 돼지에 있어서 Yoshida 등(1989)은 PMSG 添加로 卵胞卵 體外成熟率이 向上되었지만, HCG 添加와의 協同作用은 없었다고 하였고,Takahashi와 Nagai(1990)도 去勢仔豚 血清에 LH(10 μ g/ml)와 estradiol-17 β (1 μ g/ml)를 添加하여 未經産豚과 經産豚卵胞卵에서 各各 77%와 89%의 成熟率을 報告하였다.

Estradiol-17 β 添加에 對해 McGaughey(1977)와 Yoshida 등(1989)은 돼지의 卵胞卵 成熟에 效果가 없다고 하였으나, Smith와 Tenney(1990)는

mouse卵胞卵에 estradiol-17 β 를 添加하여 成熟率을 向上시켰고, Moor와 Trounson(1977)도 卵胞卵의 核成熟 뿐만 아니라, 細胞質 成熟을 유기시켜 受精後 體外發生率을 높인다고 報告하였다. 그리고 Bae와 Foot(1975)는 家兎의 卵胞卵 培養에 progesterone을 添加하여 成熟이 促進되었다고 하였다.

최근, 卵胞卵 成熟培養에 이용되어 成績이 비교적 良好한 發情牛 血清(ECS)은 胎兒血清에 缺乏된 hormone과 immunoglobulin이 含有되어 있고 (Sanbuissho와 Threlfall, 1990), 非發情期에 비하여 높은 수준의 FSH, LH 및 estradiol이 含有되어 있다고 提示한 바 있다(Kaneko등, 1989).

Sanbuissho와 Threlfall(1985)이 發情牛 血清을 添加하여 牛卵胞卵을 培養, 卵胞卵成熟에 效果가 있음을 報告한 후, Xu등(1987)은 ECS를 添加하여 成熟시킨 卵胞卵을 이용한 송아지 分娩을 發表하였다.

한편, Sanbuissho와 Threlfall(1989)은 發情牛血清을 排卵前과 排卵時 그리고 排卵 24시간 後에 採取한 血清을 添加하였을때 卵丘細胞 擴散率이 51.6%-53.4%였지만, 體外受精後 初期胚 發生率은 排卵前 採取한 血清의 添加 區에서 33.9%의 비교적 良好한 體外發生率(2-cell)을 얻었다고 하였다.

그러나 Fukui와 Ono(1989)는 소에서 ECS 添加 培養時 體外成熟率이 FCS와 類似하다고 하였으며, 돼지에서 金 등(1990)은 發情豚血清(ECS)을 添加하여 44.8%-58.7%의 成熟率을 報告하였다.

2. Follicular cell 共同培養

卵胞卵 培養에서 顆粒膜細胞의 共同培養은 哺乳動物 卵胞卵의 成熟完了에 效果的이라고 Thibault 등(1977)이 報告한 후, 家兎(Motlik와 Fulka, 1981), 면양(Staigmiller 와 Moor, 1984) 및 돼지(Fulka 와 Motlik, 1980)등에서도

研究報告되었다.

소에 있어서 顆粒膜細胞를 添加 培養함으로써 FCS와 ECS添加區 모두 體外受精率에는 效果가 없었으나 受精後 胚發生率을 높인다고 報告 하였으며(Fukui와 Ono, 1989), Sirard와 Bilodeau(1990)는 TCM-199 培養液에서 顆粒膜細胞 無添加, 採取直後 培養液에 添加 그리고 單層培養에서 각각 81%, 83% 및 82%로 成熟率에 상호 차이가 없다고 報告하였다.

페이지에서 Yoshida 등(1990)이 FSH, LH 그리고 estradiol-17 β 를 添加시킨 顆粒膜細胞와 共同培養하여 體外成熟 및 發生에 有效하다고 하였으며,朴 등(1990)은 大卵胞에서 採取한 顆粒膜細胞 共同培養이 小卵胞 顆粒膜細胞 添加보다 높은 成熟率 보였다. 그리고 Fukui 와 Ono(1990)는 血清과 顆粒膜細胞를 添加한 培養에서 높은 成熟과 發生成績을 얻은 것은 顆粒膜細胞 單層의 效果라고 報告한 바 있다. 顆粒膜細胞 添加濃度는 면양에서 Moor와 Crosby(1985)는 5×10^6 cells/ml, 소에서 Crister 등(1986)은 1×10^6 cells/ml을 添加하여 卵胞卵 成熟에 有效함을 얻었다고 報告하였다.



Ⅲ. 材料 및 方法

1. 試驗期間 및 場所

本 試驗은 1990年 4月부터 同年 9月까지 濟州大學校 農科大學 畜産學科 家畜繁殖學實驗室에서 實施하였다.

2. 供試卵巢 및 精巢

供試卵巢는 濟州畜協 畜産物處理場(한림읍 옹포리 소재)에서 屠殺된 未經産 雌豚(體重:70-100kg)에서 屠殺後 20分 以內에 採取하여 滅菌生理食鹽水(0.9% NaCl, penicillin GK:0.075g/l, streptomycin sulfate:0.05g/l.)가 들어 있는 보온병(30℃-37℃)에 옮겨 1.0 - 1.5時間內에 實驗室로 운반하여 試驗에 供試하였다.

3. 培養液



1) 卵胞卵 成熟 培養液

本 試驗에 사용된 培養液은 TCM-199(GIBCO, Chem. Co, USA, Cat No. 400-1100)에 25mM HEPES를 添加한 것을 基礎培養液(Table 1.)으로 하고 卵子回收 및 洗滌用 培養液에는 3mg/ml의 BSA(Sigma Chem. Co, No: A-7906)를 添加하고, 成熟培養液에는 상품화된 牛胎兒血清(FCS)과 發情牛血清(ECS)을 10-25% 添加하였다. 培養液에 添加된 發情牛血清은 濟州大學校 動物飼育場에서 飼育中인 經産 Holstein에서 發情發現日에 血液을 採取, 정치하여 - 원심분리(1000rpm: 10min, 2500rpm:10min, 3000rpm:10min) - 비동화(56℃, 30-60min)시

킨후 millipore filter(pore size:0.2 μ m,Gelman Sci.)로 濾過하여 -20℃에 凍結保存하면서 제조시 필요량을 融解하여 사용하였다. 그리고 供試發情牛 血清은 製造日로부터 2個月 以內에 使用하였다. 培養液의 pH는 7.2 - 7.4, osmolity는 270 - 290mOsmol/Kg로 調整하였다.

Table 1. Basic compositions of culture media.

Components	Oocyte maturation(mg/l)
NaCl	-
KCl	300
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-
NaHCO ₃	2,200
MgCl ₂ ·6H ₂ O	-
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-
Glucose	-
Na-Pyruvate	55
Ca-lactate	254.8
Penicilline GK	75
Streptomycin	50
Phenol red	-
HEPES	5,958
TCM-199(powder)	9,900

4. 試驗方法

本 研究遂行 節次는 Figure 1에 圖示된 바와 같으며 細部項目별 試驗方法은 다음과 같다.

1) 卵胞卵 採取

卵胞卵 採取는 積출된 卵巢를 滅菌生理食鹽水로 3回 洗滌後 滅菌된 濾過紙로 卵巢의 血液과 水分을 除去한 다음 18-26 gauge 주사바늘이 부착된 10ml 주사기를 사용하였다. 卵胞는 직경에 따라 卵胞液과 卵胞卵을 吸引하여 glass test tube에 옮겨 5 - 10분간 정치후 tube의 하층에 가라앉은 卵胞卵과 卵胞細胞物質을 spoid가 달린 pasteur pipette로 吸引하여 3ml 基礎培養液이 들어있는 watch glass에 옮겨 實體顯微鏡(서울광학, 15 - 30X)하에서 卵胞卵을 回收하였다. 이때 卵丘細胞의 附着狀態에 따라 卵子를 分類하고, 일부 卵子는 0.1% hyaluronidase로 卵丘細胞를 除去하고 固定과 染色을 하여 卵子를 觀察하였고, 採取된 卵子中 退化된 卵子는 實驗에서 除外시켰다.

2) 卵胞卵 培養

卵胞卵은 滅菌된 培養液에서 洗滌(基礎培養液:2회, 成熟培養液:1회)하여 60mm petridish(Corning. Labatory Sci,Co.No:25011-60)에 paraffine oil(Sigma chem Co:Cat No:M-3516)로 피복하여 12시간 CO₂培養器內(99%humidity, 5%CO₂, 38.5℃)에서 平衡시킨 0.2ml培養液小滴에 卵胞의 크기, 卵丘附着狀態, ECS添加水準에 따라 30 - 48時間 培養하였다. 卵丘細胞 共同培養은 48시간 培養한 培養小滴에서 卵子만 pipetting하여 平衡시킨 신

선 培養液과 함께 卵子を 10 -15개씩 넣어 培養하였다.

3) 卵胞卵 發育段階의 判定

卵胞卵 培養後 卵丘細胞의 expansion을 조사하고 fine narrow pasture pipette로 卵子の 卵丘細胞를 除去한 다음 slide glass로 옮겨 cover glass를 덮고 가볍게 눌러 slide의 가운데 보정시키고 acetic-alcohol(ethyl alcohol 3 : acetic acid 1)을 흘려보내 透明帶를 除去한 다음 acetic alcohol溶液에 3-7일간 固定시켰다. Ethyl alcohol(99.5%)로 脫水시켜 2.5% aceto-orcein으로 染色을 실시하고 manicure로 封印하여 두었다가 위상차 현미경하(400×)에서 卵子の 核狀을 判定하였다.

卵胞卵의 核狀 判定은 Hunter 와 Polge(1966)의 方法에 따라서 실시하였으며 metaphase II인것을 成熟된 卵胞卵으로 判定하였다(Plate 2 참조).



Culture of oocytes

Collection of cumulus-oocyte
complexes from follicles(1-7mm)

Washing(3-times)

Culture in CO₂ incubator
at 38.5°C for 30 - 48h

TCM-199 medium containing
ECS(10,15,20 and 25%)

TCM-199 medium containing
FCS(25%)



Fixation

Staining

Examination

Fig.1. The experimental procedure of oocyte maturation.

IV. 結果 및 考察

1. 卵胞卵의 採取와 成熟段階

卵胞卵의 採取는 摘出된 卵巢로부터 1- 7mm인 卵胞들을 18, 21, 26 gauge의 주사바늘이 부착된 주사기를 이용하여 吸入 蒐集하였으며, 蒐集된 卵胞卵은 卵子에 부착된 卵丘細胞의 附着狀態에 따라 密集(compact), 分散(partial) 및 裸化(denuded)卵胞卵으로 분류하여 調査한 結果는 Table 2.에 提示된 바와 같다.

Table 2. Configuration of cumulus cell mass of pig follicular oocytes collected with different gauges needle at recovery.

Gauges of needle	No. of oocytes examined	Configuration of cumulus cell mass		
		Compacted(%)	Partial(%)	Denuded(%)
18	222	124(55.8)	70(31.5)	28(12.6)
21	209	116(55.5)	61(28.8)	32(15.4)
26	215	74(34.4)	114(53.0)	27(12.6)
Total	646	314(48.6)	245(37.9)	87(13.5)

회수된 總 卵胞卵數는 646개였으며 18, 21, 26 gauge 주사바늘로부터 各各 222, 209, 215개의 卵胞卵을 採取하였다.

회수된 卵胞卵中 密集(compacted)卵丘細胞를 갖는 卵子數는 18, 21, 26 gauge별로 各各 採取된 總 卵子數에 대하여 124/222(55.8%), 116/209(55.5%), 74/215(34.4%)로 나타 났으며, 分散된(partial)卵胞卵은 18, 21, 26gauge의 주사바늘에서 各各 31.5%, 28.8%, 53.0%로 26 gauge로부터 회수된 것에서 가장 높았고 裸化된(denuded)卵胞卵은 各各 12.6%, 15.4%, 12.6%로 3개 處理 區間 類似한 傾向値를 보였다.

이러한 結果는 Leibfried와 First(1979)가 20gauge 주사바늘을 사용해서 직 경 3mm인 소卵胞卵을 採取하였을때 회수된 卵胞卵 대부분이 顆粒膜細胞를 가지고 있었다는 報告와 거의 一致했고, Bae와 Channing(1985)이 18gauge로 3- 5mm 卵胞에서 돼지의 卵胞卵을 採取하였을때 密集卵丘細胞가 있는 卵胞卵의 比率이 30 - 50% 였다는 報告와도 類似한 傾向이었지만, Sato등(1990)이 소에서 18gauge로 採取했을때 卵胞卵의 대부분이 密集卵丘細胞卵子였다는 結果보다는 낮았다.

卵胞卵 採取時 卵丘細胞 附着狀態에 따른 核狀은 Table 3.에 나타나있는 바와 같이 卵丘細胞가 密集된 卵胞卵에서는 대부분이 卵核胞(GV)段階이고 分散과 裸化 卵胞卵에서는 대부분이 卵核胞 崩壞(GVBD)段階이상 發育되었으며 M-II(mataphage-II)까지 發育된 卵子の 比率도 分散卵胞卵이 14.3%, 裸化 卵胞卵이 16.2%로 觀察 되었다.

이것은 Sato 등(1990)이 採取된 소의 密集卵丘細胞 및 裸化卵丘細胞 卵胞卵에서 卵核胞(GV)段階가 各各 90%와 84%라는 報告와는 다르게 나타났다. 이 상의 結果를 綜合하여 볼때 卵丘細胞가 密集하게 附着되어 있는 卵胞卵을 採

Table 3. Developmental stages of pig follicular oocytes with different configuration of cumulus cell mass at recovery.

Configuration of cumulus cell mass	No. of oocytes examined	Nuclear stages				
		GV(%)	GVBD(%)	M- I (%)	N-C(%)	M- II (%)
Compacted	124	98(79.0)	16(12.9)	8(6.5)	2(1.6)	-
Partial	112	2(1.8)	7(6.3)	9(8.0)	78(69.6)	16(14.3)
Denuded	117	10(8.5)	12(10.3)	17(14.5)	59(50.4)	19(16.2)

GV:Germinal vesicle, GVBD:Germinal vesicle breakdown, M- I:Metaphase I
N-C:Nuclear condensation, M- II:Metaphase II.



取하기 위해서는 18 or 21gauge 주사바늘을 사용하는것이 적절하고 密集된 卵胞卵에서는 대부분이 卵核胞崩壞前 段階였다.

2. 培養液內 ECS의 添加效果

卵胞卵에 20% ECS와 FCS를 添加하여 培養한 後 卵胞卵成熟率에 대한 結果는 Table 4에 提示되었다. ECS添加區가 總 61개의 卵胞卵中 34개(55.5%)가 metaphase II까지 發育하여, 總 52개 卵胞卵中 19개(36.5%)가 metaphase II까지 發育한 FCS添加區보다 높은 成績을 보여주고 있다.

한편, 培養 後 卵核胞期에서 發育이 中止된 卵胞卵數는 FCS添加區에서 3개 였고 退化된 卵子數는 FCS와 ECS添加區에서 各各 4個와 2個로 卵核胞期 卵胞卵 比率과 退化 卵胞卵 比率은 FCS添加區에서 약간 높은 傾向을 나타내어 주 었다.

Table 4. Comparison of FCS and ECS on the maturation of the pig follicular oocytes in culture.

Types of serum	No. of oocytes examined	Nuclear stages							Maturation rate(%)
		GV	GVBD	M- I	A- I	T- I	M- II	DG	
FCS	52	3	8	14	3	1	19	4	36.5
ECS	61	-	4	16	3	2	34	2	55.7

GV: Germinal vesicle, GVBD: Germinal vesicle breakdown, M- I: Metaphase I, A- I: Anaphase I, T- I: Telophase I, M- II: Metaphase II, DG: Degenerated.

이러한 成績은 Fukui와 Ono(1989)의 FCS添加區에서 59.3%, ECS添加區에서 66.7%의 成熟率을 보인것 보다는 낮았으며, Schellander 등(1990)이 FCS가 62.8% ECS가 56.0%로 ECS添加가 FCS添加에 비하여 卵胞卵 成熟率이 낮았다는 보고와는 상반된 結果를 보인 반면, Willis 등(1990)은 말의 卵胞卵培養에서 FCS添加보다 ECS添加가 높은 成熟率을 報告하였다.

卵胞卵의 卵丘細胞 擴散 程度를 조사하기 위하여 FCS와 ECS를 添加해서 密集卵丘細胞 卵胞卵을 培養하였는데, 培養 30시간부터 6시간 간격으로 48시간 까지 well expanded, partially expanded 및 unexpanded로 구분(Plate 1 참조

Table 5. Comparison of FCS and ECS on the timing of cumulus cell expansion of pig follicular oocytes in culture.

Types of serum	Culture periods (hr)	No. of oocytes examined	No. of cumulus-oocytes complexes			percentage (Well/Total)
			Unexpanded	Partial	Well	
FCS	30	44	31	13	-	-
	36	44	10	25	9	22.5
	42	44	4	14	26	59.0
	48	44	1	19	34	77.3
ECS	30	40	18	22	-	-
	36	40	4	25	11	27.5
	42	40	1	9	30	75.0
	48	40	1	3	36	90.0

Unexpanded:Unexpanded cumulus cell mass. Partial:Partially-expanded cumulus cell mass. Well:Well expanded cumulus cell mass.

)하여 調査한 結果는 Table 5에 나타나 있다.

培養 30시간에 FCS 와 ECS添加區에서 well-expanded cumulus cell을 가진 卵胞卵은 觀察할 수가 없었고, 36시간에 FCS添加區에서 22.5%, ECS添加區에

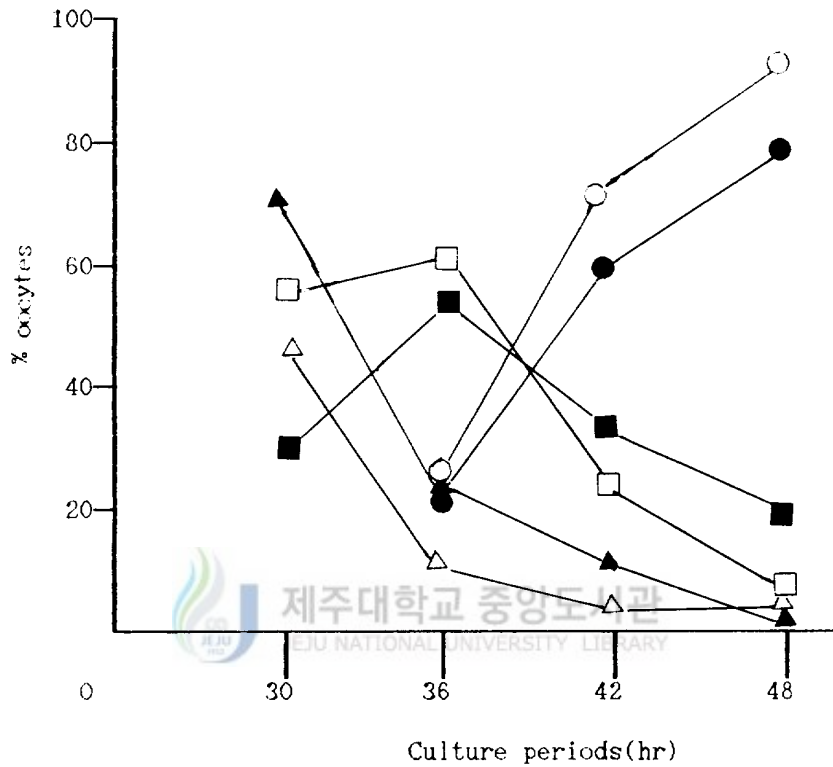


Fig 2. Comparison of FCS and ECS on the timing of cumulus cell expansion of pig follicular oocytes in culture.

Cumulus-oocyte complexes were cultured for 30, 36, 42 and 48 hours in TCM-199 media with sera(FCS or ECS).

FCS(▲:unexpanded, ■:partially expanded, ●:well expanded)

ECS(△:unexpanded, □:partially expanded, ○:well expanded).

서 27.5%로 서로 類似한 傾向値를 보였다. 그리고 培養 42시간후에는 FCS와 ECS區에서 各各 59.0%(20/44)와 75.0%(30/40)의 成績을 보였고, 48시간후에는 77.3%(34/40)와 90.0%(36/40)로 ECS添加區가 良好한 卵丘擴散率을 보였다.

한편 이것을 圖表로 나타내었을때 Fig.2에서 보여주는 바와 같이 卵丘細胞가 unexpanded인 卵子の 比率는 30時間 이후에, 그리고 partially expanded는 36時間 이후에 減少되었고 well expanded는 培養時間이 길어질수록 점차 增加하는 傾向을 보였다.

이러한 結果는 Sanbuissho와 Threlfal(1989)가 소의 卵胞卵을 培養하여 51.9% - 53.4%의 成績과 Willis등(1990)의 發情馬血清을 卵胞卵에 添加培養하였을때 最高 80%의 卵丘擴散率을 보인것보다 약간 높은 成績을 보여주고 있지만, Yoshida등(1989)이 TCM-199에 10% FCS와 GTH(PMSG와 HCG) 및 estradiol(E₂)를 添加하여 36시간에 78.2%의 卵丘擴散을 報告한 結果와는 다소 差異를 보였다.

이상의 結果로 미루어 보아 ECS를 添加培養한 것은 FCS만을 添加 培養하였을 때보다 卵胞卵成熟이 良好하다는 것을 알 수 있었다.

卵胞 直徑에 따른 卵胞卵의 發育能力을 調査하기위해 卵胞卵의 크기를 1-2mm, 3 - 5mm, 6mm이상으로 區分하고 ECS添加培養하여 metaphase-II 段階까지 調査한 成熟率은 Table 6와 같다. 卵胞卵成熟率은 1 - 2mm, 3 - 5mm, 6mm 이상에서 各各 42.6%(29/68), 53.2%(36/67) 및 60.8%(31/52)로 6mm이상에서 成熟率이 가장 良好하였으며 다음은 3-5mm, 1-2mm 순으로 卵胞卵 크기가 적을수록 成熟率이 낮게 나타났다.

이것은 Bae와 Foot(1975)가 家兎의 小卵胞 또는 中卵胞에서 採取한 卵子

Table 6. Maturation rate in the pig follicular oocytes with different diameter of follicles cultured in the TCM-199 medium with ECS.

Follicular diameter (mm)	No. of oocytes examined	Nuclear stages							Maturations rate(%)
		GV	GVBD	M- I	A- I	T- I	M- II	DG	
1-2mm	68	1	8	23	3	4	29	1	42.6
3-5mm	67	1	6	16	3	3	36	2	53.2
> 6mm	52	1	5	10	4	1	31	2	60.8

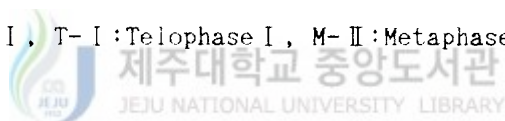
GV:Germinal vesicle, GVBD:Germinal vesicle breakdown, M- I :Metaphase I
A- I :Anaphase I, T- I :Telophase I, M- II :Metaphase II, DG:Degenerated.

제주대학교 중앙도서관
보다 大卵胞에서 採取된 卵子가 成熟率이 有意하게 높다는 報告와 一致하며, mouse(Erickson와 Sorensen,1981)와 사람(Tsuji등,1985) 그리고 소 (Leibfried와 First,1979)의 卵胞卵 培養成績과도 같은 傾向이었다. 또한 Motlik 등(1984)이 1.7 - 2.2mm 및 3 - 7mm 돼지의 卵胞卵에서 各各 49± 4.2%와 76±2.5%였다고 報告한 것보다는 낮은 結果이나, 金 등(1990)의 報告에서 1 - 2mm와 3 - 5mm卵胞에서 各各 59.4%, 61.3%의 成熟率을 보인것과는 類似한 成績을 보였다. 이러한 結果들을 綜合하여 볼 때 卵胞卵의 크기에 따라 發育 潛在力 (develpomental potential)이 다르다는 것은 Motlik 등 (1984)의 報告와도 一致하였다.

Table 7. Maturation of pig follicular oocytes with different configuration of cumulus cell mass in culture with ECS added to TCM-199.

Configuration of cumulus cell mass	No. of oocytes examined	Nuclear stages							Maturation rate(%)
		GV	GVBD	M-I	A-I	T-I	M-II	DG	
Compacted	48	-	3	12	2	1	29	1	60.4
Partial	63	1	6	16	3	4	29	4	46.0
Denuded	74	5	10	15	5	3	28	10	35.4

GV: Germinal vesicle, GVBD: Germinal vesicle breakdown, M-I: Metaphase I, A-I: Anaphase I, T-I: Telophase I, M-II: Metaphase II, DG: Degenerated.



卵胞卵의 卵丘細胞狀態를 卵丘密集, 分散 및 裸化로 區分하여 培養後 卵胞卵 成熟率을 調査한 바 Table 7에 提示되어 있듯이 各各 60.4%(29/40), 40.0%(29/63), 35.4%(28/74)로 卵丘細胞가 密集한 卵胞卵의 成熟率이 가장 良好하였고, 卵丘密集 卵胞卵에 比하여 分散 및 裸化 卵胞卵區에서 退化卵子數가 增加하였다.

Leibfried와 First(1979)는 소에 있어서 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵 (compacted, partial, expended)間에는 큰 差異가 없는 반면 裸化된 卵子는 이들 卵子에 比하여 成熟率이 현저히 떨어지는 傾向이 있다고 보고한 바 있

으며, Fleming 등(1985)은 rat 卵胞卵에서 卵丘附着 程度가 卵胞卵의 成熟에 影響을 주지 않는다고 發表한 바도 있다.

반면, 牛卵胞卵에서 Shioya 등(1988)은 FCS와 hormone을 添加培養하여 卵丘細胞密集, 分散, 裸化에서 各各 97.4%, 89.8%와 52.9%의 成熟率을 報告하였고, Zhiming 등(1990)은 山羊卵胞卵을 TALP培養液에서 compacted, thin cumulus, nude로 區分하였을때 56.7%(17/30), 44.4%(24/54) 및 33.3%(17/51)의 成熟率을 報告하였다. 이들의 結果와 本 研究結果를 綜合하여 볼 때 卵丘

Table 8. Percentage of nuclear maturation for pig follicular oocytes cultured in different number of oocytes per 0.2ml medium-drops (TCM-199) with ECS.

No. of oocytes per drop	No. of oocytes examined	Nuclear stages							Maturations rate(%)
		GV	GVBD	M-I	A-I	T-I	M-II	DG	
7 - 8	46	1	6	6	3	1	27	2	58.7
15	59	1	5	12	4	2	32	3	54.2
21	42	·	4	10	3	1	23	2	54.8
30	60	·	2	13	4	2	34	5	56.7

GV: Germinal vesicle, GVBD: Germinal vesicle breakdown, M-I: Metaphase I, A-I: Anaphase I, T-I: Telophase I, M-II: Metaphase II, DG: Degenerated.

細胞의 附着程度와 附着有無 與否는 卵胞卵 成熟에 影響을 미치며 卵丘細胞
· 密集된 卵子の 成熟率이 良好할 것으로 思料되었다.

卵胞卵을 培養할때 一定量(0.2ml)의 培養液小滴에 들어 있는 卵胞卵數가 成熟率에 影響을 주는지의 與否를 알아보기 위하여 7-30個씩 卵子を 넣어 培養을 實施한 結果 7-8, 15, 21, 30個를 添加한 群에서 各各 58.7%(27/46), 54.2%(22/59), 54.8%(23/42) 및 56.7%(34/60)로 일정한 傾向値를 보여주지 못했다.(Table 8). Yoshida 등(1990)은 돼지에서 0.2ml당 10-15개 卵胞卵을 培養하여 87%의 卵丘細胞擴散率을 報告 하였으며, Goto 등(1988)은 2.5ml 培養液에 60-100個의 소 卵胞卵을 培養하여 90%의 成熟率을 얻었다. 그리고 Fukui 등(1982)은 0.2ml 小滴당 5-10개 卵胞卵을 培養하여 68.8%의 卵胞卵 成熟率을 報告하였다. 한편, Leibfried-Rutledge 등(1989)은 소 卵胞卵에서 50 μ l당 10, 20, 30, 40個 卵子を 添加하여 各各 81%, 71%, 49%, 32%의 成熟率을 發表하였으며, 小滴당 卵子數가 적을수록 成熟率이 높음을 報告한 바 있다.

ECS添加水準에 따른 卵胞卵 成熟率은 Table 9에 나타나 있듯이 25%ECS를 添加하였을때 가장 良好한 成績을 보였고, 10%, 15%, 20%添加區에서 各各 55.5%(30/54), 58.0%(29/50), 54.7%(47/86)의 成熟率을 나타내었다.

培養後 卵核胞期 狀態로 남아 發育이 이루어지지 않은 卵胞卵이 10%, 15%, 25% 添加에서 觀察되었고 退化 卵胞卵은 15%와 20% 添加區에서 各各 1개와 3개가 確認되었지만 處理區間에 큰差異는 없는 것으로 調査되었다. 金 등(1990)은 돼지 卵胞卵에서 mKRB液에 ESS(estrus sow serum)를 5%, 10%, 20% 添加하여 各各 58.3%, 47.8% 그리고 42.9%의 成熟率을 報告하였는데 本 實驗에서의 結果와 相異한 傾向을 보인 반면, Sanbuissho와 Threlfall

(1989), Schellander 등(1990)은 소에서 20%ECS를 添加하여 各各 66.7%와 72.3%로 本 實驗結果보다 높은 成績을 얻었고, Sanbuissho와 Threlfall (1990)은 10% 添加로 56.0%의 成熟率을 얻어 本 實驗과 類似한 結果였다.

Table 9. Effects of concentration of ECS on the maturation of pig follicular oocytes cultured in the TCM-199.

Concentra- tions of ECS (%)	No. of oocytes examined	Nuclear stages							Maturations rate(%)
		GV	GVBD	M- I	A- I	T- I	M- II	DG	
10	54	3	9	10	2	1	30	·	55.5
15	50	2	8	11	2	3	29	1	58.0
20	86	·	12	28	6	8	47	3	54.7
25	80	2	11	21	5	2	53	·	66.3

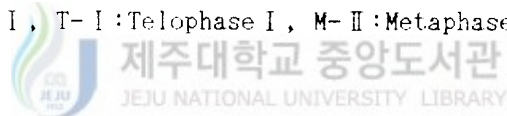
GV: Germinal vesicle, GVBD: Germinal vesicle breakdown, M- I: Metaphase I, A- I: Anaphase I, T- I: Telophase I, M- II: Metaphase II, DG: Degenerated.

또한 Willis 등(1990)은 말 卵胞卵에서 15%發情馬血清을 添加하여 63-67% 成績을 報告하였다. 그래서 本 研究 結果는 Tsafiriri와 Channing(1975)의 medium-size follicle에서 FCS를 50%로 增加시켰을때 卵胞卵 成熟率이 向上 되었다는 報告와 일치하고 있음을 알 수 있었다.

Table 10. The nuclear maturation of pig follicular oocytes with the time sequence in culture used TCM-199 with ECS.

Culture periods (hr)	No. of oocytes examined	Nuclear stages							Maturations rate(%)
		GV	GVBD	M- I	A- I	T- I	M- II	DG	
30	65	2	8	24	12	4	16	·	24.6
36	47	2	9	11	5	2	17	1	36.2
42	63	1	5	13	3	1	37	3	53.8
48	60	·	4	10	5	2	35	4	58.3

GV:Germinal vesicle, GVBD:Germinal vesicle breakdown, M- I:Metaphase I, A- I:Anaphase I, T- I:Telophase I, M- II:Metaphase II, DG:Degenerated.



ECS 添加後 培養時間(30-48시간)에따라 Metaphase II까지의 成熟率을 調査한 結果가 Table.10에 提示되어 있다. 培養始作 後 30시간에서는 24.6%(16/65)가 metaphase II까지 發育하였고 36시간에서는 36.2%(17/47), 42시간과 48시간은 各各 53.8%(37/63), 58.3%(35/60)의 成熟率을 보여 30 및 36시간 培養보다는 42시간, 48시간 培養에서 높은 成熟率을 보였다. 그리고 培養時間이 길어짐에따라 卵核胞期卵자는 줄어들지만 退化卵자의 比率은 多少 增加하는 傾向을 보였다.

이러한 결과는 Sato 등(1978b)이 39시간에 가장 높은 成熟率을 보인 것보다는 發育이 遲延되었고, Hunter와 Polge(1966)가 HCG 投與 後 in-vivo에서 35-37시간후 metaphase II 卵子 比率이 현저히 增加한다는 報告(McGaughey, 1977)보다는 本 實驗結果가 6시간 정도 지연 되었으나, McGaughey와 Polge (1972)의 報告와는 本 研究 結果와 類似한 傾向을 보여 주었다. 한편 研究者에 따라서 體外受精에 이용할 卵胞卵培養을 36시간 實施한 報告(Yoshida 등, 1989)도 있는 반면, Hamano와 Toyoda(1986)는 43-50시간까지 培養을 實施하므로써 實驗者마다 差異를 보이고 있고 本 研究 結果에 의하면 48시간 培養이 적절한 것으로 思料된다.

卵丘細胞가 密集한 卵胞卵을 48시간까지 培養접시 바닥에 形成된 單層(monolayer)에서 培養한 成績과 培養液만 添加된 小滴에서의 卵胞卵成熟率을 비교한 結果는 Table 11에 提示되었다. 卵丘細胞 單層에서 總 63개의 卵胞卵中 57.1%(36개)의 成熟率을 보인 반면, 卵丘細胞層이 없는 培養液에서는 53.4%(3/58)의 成熟率을 보여 두 處理區間 有意差는 없지만 卵丘細胞 單層培養이 多少 良好한 것으로 나타났다.

한편, Fukui와 Ono(1989)가 顆粒膜細胞(granulosa cells)와 共同培養하여 ECS를 添加하였을때 顆粒膜細胞 無添加區와 같은 66.7%의 成績을 보였고, FCS를 添加하였을때 添加區와 無添加區에서 各各 71.3%와 59.3%로 顆粒膜細胞 共同培養이 有效함을 報告하였다.

그리고 돼지 卵胞卵 培養에서는 ECS의 添加가 有效하였지만 앞으로 본 시험에 이어 卵胞卵 成熟에 ECS의 添加와 co-culture에 따른 體外受精 및 胚發生에 미치는 影響에 대한 研究가 계속 수행되어야 할 것으로 사료된다.

Table 11. Effects of cumulus cell on the maturation of pig follicular oocytes cultured in TCM-199 with ECS.

Culture systems	No. of oocytes examined	Nuclear stages							Maturation rate(%)
		GV	GVBD	M- I	A- I	T- I	M- II	DG	
With cumulus cell	63	4	8	10	3	1	36	1	57.1
Without cumulus cell	58	4	10	11	2	.	31	.	53.4



GV: Germinal vesicle, GVBD: Germinal vesicle breakdown, M- I : Metaphase I
A- I : Anaphase I , T- I : Telophase I , M- II : Metaphase II , DG: Degenerated.

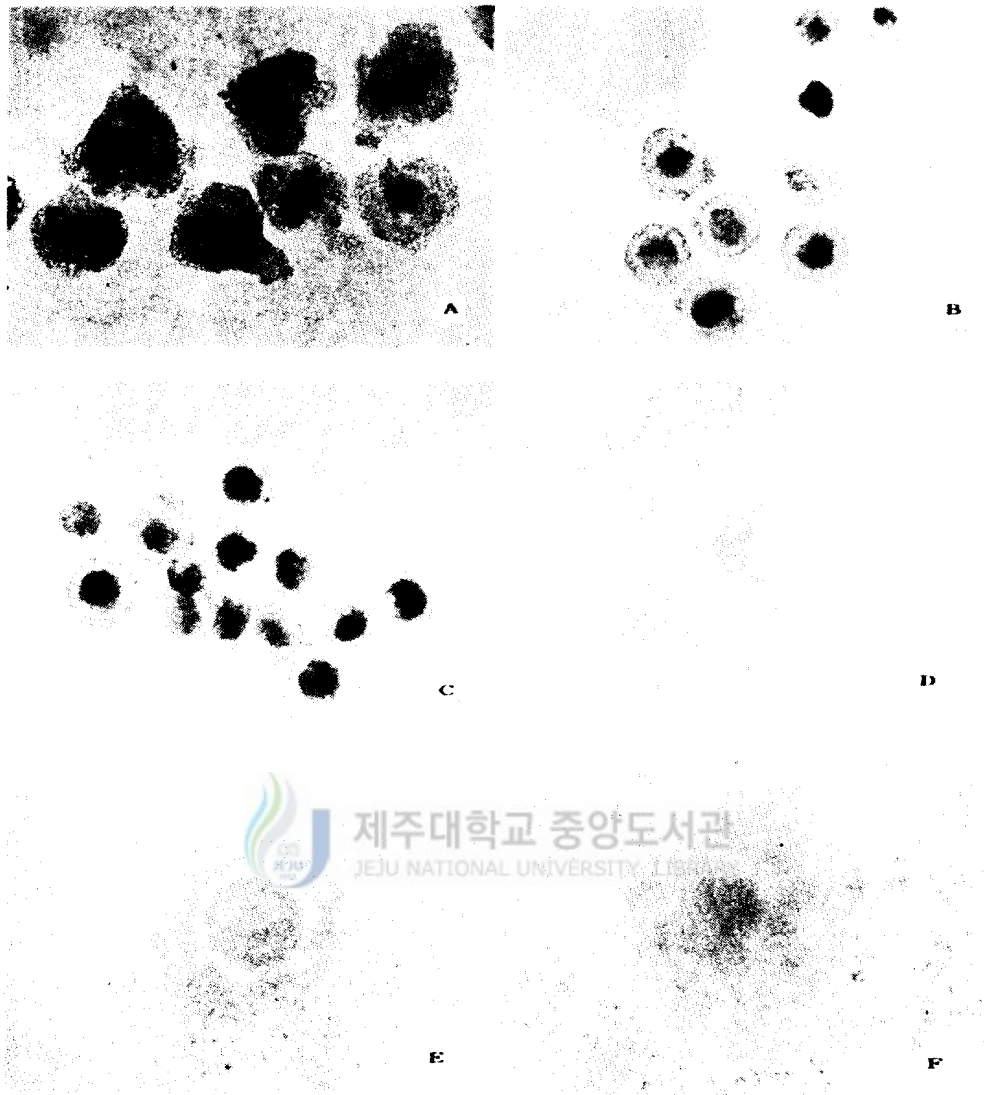


Plate 1. Pig follicular oocytes with compacted(A), partially-denuded(B) and denuded(C) cumulus cell at recovery. Pig follicular oocytes with well-expanded(D), partially-expanded(E) and unexpanded(F) cumulus cell in culture for 48 hours(× 200).

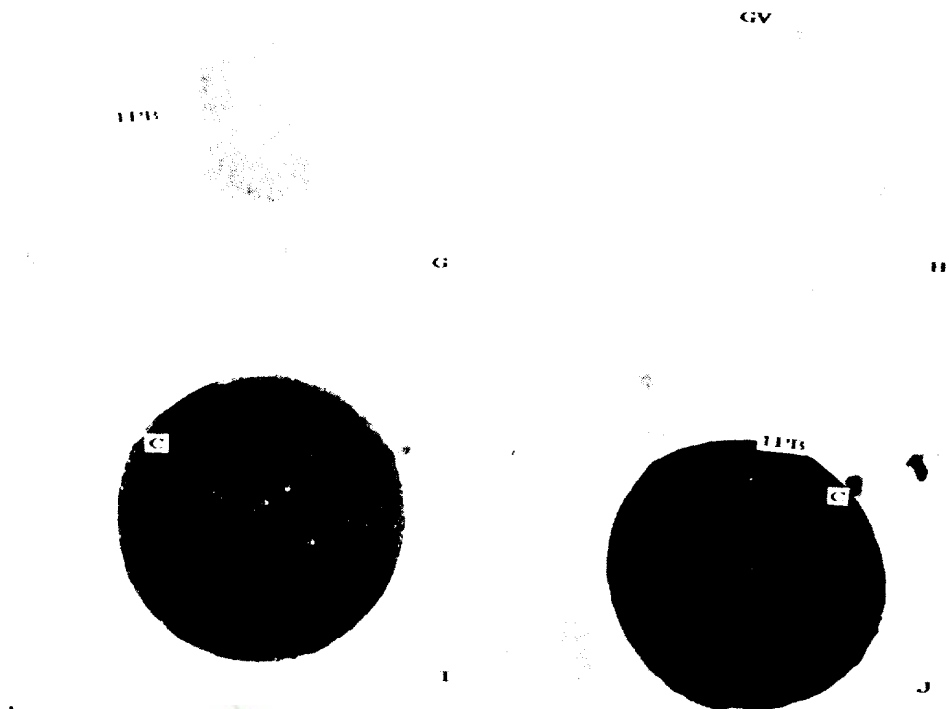


Plate 2. Pig follicular oocytes with 1st polar body(G), germinal vesicle (H), metaphase I (I) and metaphase II stage(J) in culture for 48 hours(× 400). GV:Germinal vesicle, C:Chromosome, 1PB:First polar body.

V. 摘 要

本 研究는 發情牛血清이 돼지卵胞卵의 體外成熟에 미치는 影響을 調査하기 위하여 實施되었다.

卵胞卵은 도살된 成熟豚의 卵巢에서 卵胞를 주사기로 흡인하여 採取하였다. 採取된 卵胞卵의 培養은 ECS 혹은 FCS가 添加된 TCM-199 培養液에서 30-48時間, 5% CO₂와 38.5°C 條件의 培養器내에서 實施하였으며 實驗結果를 要約하면 아래와 같다.

1. 주사기에 附着된 바늘의 크기에 따라 卵丘細胞密集 卵胞卵 回收率은 18, 21 및 26 guage에서 各各 55.8%, 55.5% 그리고 34.4%였다.
2. 回收된 卵胞卵중 卵丘細胞가 密集된 卵胞卵의 대부분은 卵核胞期(GV stage)의 發育段階를 보였고, 卵丘細胞가 부분적(partial)으로 密集된 것과 裸化(denuded)된 卵胞卵은 GVBD에서 MII까지 發育段階를 보였다.
3. 培養液에 25% ECS를 添加하였을때 55.7%의 成熟率을 보인 反面, FCS를 添加하였을때는 36.5%로 ECS添加區가 優秀한 成熟率을 보였다. 한편 두 處理區間 卵丘細胞 擴散率은 36시간까지는 類似하였으나, 42, 48시간에는 ECS 添加區가 良好하였다.
4. 卵胞直徑에 따른 卵胞卵 成熟率은 1-2mm, 3-6mm 및 6mm 이상 區에서 各各 42.6, 53.2 및 60.8% 였다.
5. 卵丘細胞 密集, 分散 및 裸化된 卵胞卵의 成熟率은 各各 60.5, 46.2 및 35.4%로 卵丘細胞 密集 卵胞卵이 가장 良好하였다.
6. 培養液 小滴당 7-8, 15, 21 및 30個의 卵子を 培養하였을때 成熟率은 各各

58.7, 54.2, 54.8 및 56.7% 였다.

7. 培養液에 10, 15, 20 그리고 25%의 ECS를 添加하였을때 各各 55.5, 58.0, 54.7 및 66.3%로 25% ECS 添加區가 다른 處理區 보다 良好한 成熟率을 보였다.

8. 25% ECS를 添加하여 30, 36, 42 및 48시간 培養하였을때 各各 24.6, 36.2, 53.8 및 58.3%의 成熟率을 보였으며 36시간 培養보다 42와 48시간 培養區에서 높은 成熟率을 보였다.

9. 卵丘細胞 單層에서 培養한 卵胞卵(57.1%)이 培養液에서 培養한 卵胞卵(53.4%)보다 높은 成熟率을 보였다.



參 考 文 獻

1. Bae, I.H. and R.H. Foote. 1975. Effects of hormone on the maturation of rabbit oocytes recovered from follicles of various size. *J. Reprod.Fert.*,12:357-360.
2. Bae,I.H. and C.P. Channing. 1985. Effect of calcium ion on the maturation of cumulus-enclosed pig follicular oocytes isolated from medium-sized Graffian follicles.*Biol. Reprod.*,33:79-87.
3. Bar-Ami, S. and A. Tsafiriri. 1981. Acquisition of meiotic competence in the rat:role of gonadotropin and estrogen. *Gamete Res*,4:463-472.
4. Cheng,W.T.K., R.M. Moor and C. Polge. 1986. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. *Theriogenology*,25:146(Abstr).
5. Cross, P.C. and R.L. Brinster,1970. In vitro development of mouse oocytes. *Biol.Reprod.*,3:298-307.
6. Cross, P.G.1973.The role of cumulus cells and serum in mouse oocyte matured in vitro. *J. Reprod. Fert.*,34:241-245.
7. Edward, R.G.1965. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature,London.*, 203:349-351.
8. Erickson, G.F. and R.A. Sorensen.1974. In vitro maturation of mouse oocytes isolated from late, middle, and preantral graffian

- follicles. *J. Exp. Zool.*, 190:123-127.
- 9 Fleming, A.D., G. Evans, E.A. Walton and D.T. Armstrong. 1985. Developmental capability of rat oocytes matured in vitro in defined medium. *Gamete Res.*, 12:255-263.
 10. Fulka, J. and J. Motlik. 1980. In vitro maturation. *Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I.*, vol. II, pp.55-62.
 11. Fukui, Y., A. Miyamoto and H. Ono. 1982. In vitro maturation of bovine follicular oocytes stored at various temperatures before culture. *Jap J. Fertil.Steril.*, 27:514-519.
 12. Fukui, Y. and H. Ono.1989. Effects of sera, hormone and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization,cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.*,86:501-506.
 13. Goto, K., Y. Kajihara, S. Koba, Y. Nakanish, K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. *J. Reprod. fert.*,83:753-758.
 14. Hamano, S. and Y. Toyoda.1986. In vitro fertilization of pig eggs with ejaculated spermatozoa preincubated at high sperm concentration. *Jpn. J. Anim. Reprod.*,32:177-183.
 15. Hoopes, P.C. 1976. Glucose requirement for mouse sperm capacitation in vitro. *Biol. Reprod.*, 15:39-45.
 16. Hunter, R.H.F.and C. Polge.1966. Maturation of follicular oocytes

- in the pig after injection of human chronic gonadotropin. *J. Reprod. Fert.*, 12:525-531.
17. Kaneko, H., T. Terada, K. Goto, T. Nakashima, K. Ogata, M. Komdoh, K. Taya and S. Sasamoto. 1989. Suppression of the preovulatory surge of FSH in superovulating cattle pretreated with porcine FSH. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35:7-13.
 18. 김 창근, 정 영채, 이 명식, 윤 종택, 방 명걸, 정 길생. 1990. 돼지 난포난의 체외성숙에 관한 연구. *한국가축번식학회보*, 14:84-91.
 19. Leibfried, L. and N.L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocyte and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.*, 48:76-86.
 20. Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Crister and N.L. First. 1986. Effect of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocytes complexes. *Biol. Reprod.* 35:850-857.
 21. Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Crister, J.J. Parrish and N.L. First. 1989. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 31:61-72.
 22. Mattioli, M., M.L. Bacci, G. Galeati and E. Seren. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, 31:1201-1207.
 23. McGaughey, R.W. and C. Polge. 1972. Cytogenetic analysis of pig oocytes matured in vitro. *J. Exp. Zool.*, 176:383-396.

24. McGaughey, R.W. 1977. The maturation of porcine oocytes in the minimal, defined culture media with varied macromolecular supplements and varied osmolality. *Exp. Cell. Res.*, 109:25-30.
25. Moor, R.M. and A.O. Trounson. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fert.*, 49:101-109.
26. Moor, R.M. and I.M. Crosby. 1985. Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fert.*, 72:323-328.
27. Motlik, J. and J. Fulka. 1981. Fertilization rabbit oocytes co-cultured with granulosa cells. *J. Reprod. Fert.*, 63:425-429.
28. Motlik, J., N. Crozet and J. Fulka. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fert.*, 72:323-328.
29. Naito, K., Y. Fukuda and I. Ishibashi. 1989. Developmental ability of porcine ova matured in porcine follicular in vitro and fertilized in vitro. *Theriogenology*, 31:1049-1056.
30. 박 수봉, 박 향균, 入谷明, 1990. 체외배양시 과립막세포와 공배양된 돼지난포난의 성숙과 수정. *한축지.*, 32:15-19.
31. Pincus, G. and E.V. Enzmann. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro, I. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.*, 62:665-675.
32. Salustri, A. G. Siracusa. 1983. Metabolic coupling, cumulus expans-

- ion and meiotic resumption in mouse cumuli oophori cultured in vitro in the presence of FSH or dcAMP, or stimulated in vivo by hCG. *J. Reprod. Fert.*,68:335-341.
33. Sanbuissho, A. and W.R. Threlfall.1985. The effects of estrus cow serum on the maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte in vitro.*Theriogenology*,23:226(Abstr).
34. Sanbuissho, A. and W.R.Threlfall.1989. The effects of estrus cow serum on the maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte in vitro.*Theriogenology*,31:693-699.
35. Sanbuissho, A. and W.R. Threlfall. 1990. The influence of serum and gonadotropins on in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*,34:341-348.
36. Sato, E., A. Iritani, and Y. Nishikawa. 1978a. Maturation and activation of cattle follicular oocytes cultured in vitro. *Jap. J. Zotech. Sci.*, 49:236-242.
37. Sato, E.,A. Iritani and Y. Nishikawa. 1978b. Rate of maturation division of pig follicula oocytes cultured in vitro *Jap. J. Zotech. Sci.*, 49:400-405.
38. Sato, E., M. Matsuo and H. Miyamoto. 1990. Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro:improvement of meiotic competence by dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. *J. Anim. Sci.*,68: 1182-1187.
39. Schellander, K., T. Fuhrer, B.G. Brackett, H. Korb and W.Schleger.

1990. In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrus cow serum. *Theriogenology*, 33: 477-485.
40. Shalgi, R., N. Dekel and P.F. Kraicer. 1979. The effect of LH on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 55:429-435.
41. Shea, B.F., J.P.A. Laour, K.N. Bedrin and R.D. Baker. 1976. Maturation in vitro and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes. *A. Anim. Sci.*, 43:809-815.
42. Shioya, Y., M. Kuwayama, M. Fukushima, S. Iwasaki and A. Hanada. 1988. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology*, 30:489-496.
43. Sirard, M.A. and S. Bilodeau. 1990. Effects of granulosa cell co-culture on in vitro meiotic resumption of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 89:459-465.
44. Smith, D.M. and D.Y. Tenny. 1980. Effects of steroids on mouse oocyte maturation in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 60:331-338.
45. Suss, I., K. Wuthrick and G. Stranzinger. 1988. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. *Biol. Reprod.*, 38:871-880.
46. Staigmiller, R.B. and R.M. Moor. 1984. Effect of follicles cells on the maturation and developmental competence of bovine oocytes

- matured outside the follicle. Gamete Res.,9:221-229.
47. Takahashi, Y. and A. Hanada.1986.Penetration of zona-free hamster eggs in vitro by ejaculated bull spermatozoa after treatment with ionophore A23187.Jpn. J. Anim. Reprod.,30:30-38.
48. Thibault, C. 1977. Are follicular maturation and oocyte maturation independent process? J. Reprod. Fert.,51:1-15.
49. Tsafiriri,A. and C.P. Channing. 1975. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro. Endocrinology,96:922-927.
50. Tsuji, K., M.Sowa and R. Nakano. 1985. Relationship between human oocyte maturation and different follicular sizes. Biol. reprod., 32:413-417.
51. Willis, P., R.A.Fayrer-Hosken and A. B, Caudle. 1990. Effect of serum on in vitro maturation of equine oocytes. Threigenology, 33:345(abstr).
52. Xu, K.P., T. Greve, H. Callesen and P. Hyttel.1987.Pergnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro.J. Reprod. Fert.,81:501-504.
53. Yoshida,M., K. Bamba and Y. Kojima.1989. Effects of gonadotropins andestradiol-17 on the timing of nuclear maturation and cumulus mass expansion in pig oocytes cultured in vitro. Jap. J. Anim. Reprod., 35:86-91.
54. Yoshida, M., Y. Ishizaki and H. Kawagishi. 1990.Blastocyst format-

-
- ion by pig embryos resulting from in vitro fertilization of oocytes
matured in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 88:1-8.
55. Zhiming, H., W. Jianchen and Q. Jufen. 1990. In vitro maturation of
follicular oocytes from the mouse and dairy goat. *Theriogenology*, 33:
364(abstr).



謝

辭

本 試驗의 遂行과 論文을 提出하기까지 實驗遂行에 不足함이 없도록 與件 造成에 心血을 기울여 주시고 不足함이 많은 저를 끝까지 仔詳하게 指導하여 주신 金 重桂 博士님께 眞心으로 感謝를 드립니다.

그리고 未洽한 本 論文을 일일이 校訂하여주시며 審査해 주신 康 珉秀 博士님, 梁 榮勳 博士님을 비롯한 畜産學科 여러 教授님께 깊은 感謝를 드립니다.

또한 實驗遂行과 資料蒐集에 많은 도움을 주신 朴 欽大 博士님, 朴 世必 先輩님과 文 哲成 先輩님, 濟州試驗場 金 熙錫 博士님, 吳 雲龍 研究士님, 家畜衛生試驗所의 獸醫士님 그리고 農科大學 共同機器室의 高 정은, 양 상호 선생님께도 感謝를 드립니다.

바쁜 일과중에도 實驗遂行과 原稿整理에 도움을 준 家畜繁殖學 實驗室 高 敬來, 康 承聿, 李 宰文 學兄과 張 德支 先生님 그리고 文 星豪 兄님을 비롯한 畜産學科 모든 院友와 親友에게 感謝드립니다. 그리고 어려운 與件에서도 사랑과 慈悲로 저를 지켜보아주신 父母님께 이 기쁨을 드리오며, 사랑하는 동생 은자, 은정, 종훈, 지훈과 이 작은 기쁨을 나누고자 합니다.