

소 卵胞卵의 體外成熟과 受精에 관한 研究

金相根 · 朴恒均*

忠南大學校 農科大學

Studies on the *In Vitro* Maturation and Fertilization Rate of Bovine Follicular Oocytes

Kim, S.K., Park, H.K.*

College of Agriculture, Chungnam National University

Summary

These studies were conducted to investigate the effects of culture temperature and time on the in vitro maturation and semen type and media on the in vitro fertilization of bovine follicular oocytes, and to assess in vitro fertilization rate of oocytes cultured by extrafollicular method following fertilization in vitro, or transfer into the pseudopregnant rabbit oviduct or uterus. The bovine oocytes recovered from follicles were cultured for 18 hrs or 72 hrs at 38°C with 5% CO₂ in moist air. Fresh-diluted (2 folds) and frozen-thawed semen in 0.5 ml straw from a fertile bull were used. In order to obtain capacitation of spermatozoa were treated with bovine follicular fluids (BFF) and Inophore A (IA).

The results obtained were summarized as follows:

1. The oocytes were classified as "A, B, C, D and Degenerative" depending morphological integrity and those were 62.0%, 12.0%, 17.2%, 5.9% and 3.0% of the total oocytes harvested, respectively.
2. The oocytes matured to metaphase II were significantly increased between 24-48 hrs of incubation and at 37°-39°C with 5% CO₂ in moist air.
3. The in vivo fertilization rate following transferred into rabbit oviduct or uterus with bull semen and in vitro matured oocytes were higher ligation than non-ligation of oviduct or uterus.
4. The in vitro fertilization rate of oocytes matured in vitro were higher neat than frozen semen and treatment of IA than BFF on the capacitation of spermatozoa.
5. The effects of semen types and media on in vitro fertilization of oocytes matured in vitro were higher fertilization rate of neat than frozen semen, and media was not significant.

I. 緒 論

受精卵 移植分野의 産業的 利用이 가능해짐에 따라 體外受精 分野의 研究도 활발해져 最近에는 體外에서 受精한 小受精卵의 移植에 의한 송아지의

出産이 報告(Brackett 등, 1982, 1984; Sirard와 Lambert, 1986) 되었다. 이러한 體外受精이 성립되기 위해서는 卵子の 成熟, 精子의 受精能 獲得과 尖體反應 및 卵管内 환경과 동일한 培養條件등이 필요하다.

*慶北大學校 農科大學(College of Agriculture, Kyung Book National University)

"이 論文은 1987年度 韓國科學財團 研究費 支援에 의하여 研究되었음."

1965年 Edwards에 의해 소 卵胞卵에 대한 體外成熟이 처음 報告된 이후, 이 分野에 관한 많은 研究들이 수행되었는데, 이들의 研究들을 살펴보면, 體外에서 受精能 獲得을 시킨 精子와의 體外受精(Fulka 등, 1982; Ball 등, 1983; Lenz 등, 1983; Leibfried-Rutledge 등, 1985; Hensleigh와 Hunter, 1985; Fukushima와 Fukui, 1985; Parrish 등, 1986)과 體 내에서 受精能 獲得을 시킨 精子와의 體外受精(Iritani와 Niwa, 1977; Iritani 등, 1984) 및 體外에서 成熟시킨 卵자의 生殖道內 移植에 의한 體內受精 등으로 區分할 수가 있다. 그러나 卵胞卵의 體外成熟과 受精에는 培養溫도와 時間, 培養液의 條件 및 受精能 獲得 處理方法 등의 要因에 따라 體外成熟률과 受精率에 差異가 있다(Shalgi 등, 1979; Leibfried와 First, 1980; Ball 등, 1981; Fukui 등, 1982; Dooley, 1984; 金 등, 1988).

이에, 本 研究는 소 卵胞卵을 體外에서 培養하면서 形態의 分類를 실시한 후 培養溫도와 時間에 따른 成熟率과, 體內外 受精時의 受精率과 아울러 體外受精에 미치는 培養液 및 精液의 影響을 比較 調査하였다.

II. 材料 및 方法

1. 卵胞卵의 採取

屠殺牛의 卵巢로부터 卵胞를 採取하여 卵胞表面의 血液과 脂肪組織을 除去한 후 38°C의 PBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco Laboratories, 美國) 1 ml를 吸引한 주사기에 의해 卵胞液과 함께 卵子를 채취하였다. 이를 時計皿에 옮겨 實體顯微鏡(×20)하에서 鏡檢하여 形態의 分類를 한 후, 정상적인 卵子를 PBS와 培養液으로 각각 1회씩 씻어서 培養하였다.

2. 培養液 및 培養方法

培養液은 Ham F-10+20% (v/v) FCS(Fetal Calf Serum, Gibco Laboratories, 美國)와 BMOC-3+20% (v/v) FCS액에 각각 penicillin 100IU/ml, streptomycin 50μg/ml를 첨가후 pH를 7.2~7.4로, 滲透壓은 290~300 mOsm로 조정하였으며, LH(Niamod-oLH-24, NIH Co, 美國) 10μg/ml를 가하여 여과(0.20μm, DISMIC-25 Toyo Co., 日本), 멸균

한 후 培養에 사용하였다.

培養方法은 petri dish내에 0.5ml의 배양액을 넣고 paraffin으로 피복한 후, 각 dish에 卵子를 넣어 38°C의 CO₂培養器(5% CO₂, 95% air)에서 배양하였으며, 卵의 回收는 dish내를 PBS로 씻어내려 回收하였으며 PBS+20% (v/v) FCS液내에 보존하면서 시험에 이용하였다.

3. 精子의 受精能 獲得

1) 소 卵胞液 培養法

소 卵胞液은 정상 卵胞로부터 채취하여 heparin 5 IU/ml를 첨가하고 600rpm으로 10분간 遠心分離한 후, 上層液을 4°C에서 24시간 보존한 것을 사용하였으며, 사용직전에 非働化處理를 한후, pH를 7.2~7.4로 조정하여 여과한 액에 정자를 6~7시간 培養하는 방법에 의해 受精能을 獲得케 하여 媒精에 이용하였다(Fukui 등, 1982).

2) IA(Inophore A)處理法

卵子를 20mg BSA/ml를 첨가한 BO액 50μl에 10개씩 배분하고, 液狀精液에 10mM caffeine을 첨가한 BO액을 첨가하여 원심분리에 의해 精子를 2~3회 洗淨한후, 精子濃度를 25~30×10⁶/ml로 조정한 精子浮遊液 1ml에 IA(Inophore A 23187, Sigma Chemical Co., 美國) 50μl를 1분간 처리하여 卵子를 넣은 배지에 옮겨 媒精시켰다(花田, 1985).

4. 體外受精

소 卵胞液 培養法과 IA 處理法에 의해 體外受精能 獲得을 한 精子濃度를 25~30×10⁶/ml가 되도록 조정하여 시험관에 1ml씩 分注한 후, 卵子를 각각 10개씩 넣어 38°C의 CO₂培養器내의 시험관대에 약 60° 각도로 경사지게 세워 6~7시간 媒精시켰다. 媒精이 끝난후 卵子를 회수하여 PBS액으로 洗淨한 후, CO₂培養器내에서 Ham F-10+20% (v/v) FCS와 BMOC-3+20% (v/v) FCS 培養液으로 培養하였다.

5. 體內受精

體內受精을 위해 토끼(Japanese White種)는 手術 12시간전, HCG 500IU를 정맥주사하여 僞妊娠 상태로 한 후 2% xylocaine에 의해 局所麻醉하여 正中線 切開法에 의해 開腹하여 子宮卵管 接합부와 子宮角基部를 結紮 또는 非結紮하여 卵管彩로부터

터 동시에 한쪽 난관내에 30개의 卵子와 受精能獲得 處理 精子浮遊液 30 μ l를 주입하였다. 卵子의 回收는 48시간제에 子宮과 卵管을 적출하여 38 $^{\circ}$ C의 PBS가 들어있는 dish에 옮겨 3회 洗淨한 후, 卵管子宮을 가능한 한 일직선이 되도록 하여 PBS액으로 灌流하여 回收하였다.

6. 卵의 檢査

回收한 卵子는 16~30시간 배양후 0.1% hyaluronidase (270NF Unit, Sigma Chemical Co., 美國)에 의해 卵丘細胞를 除去한 후 slide glass에 滴下하여 固定液 (acetic-alcohol=1:3)으로 24~48시간 고정 한 다음 1% acetic-orcein액으로 염색하여 위상차 현미경하에서 鏡檢하였다. 이때 成熟정도의 判定은 成熟分裂 시기를 제 1 성숙분열의 中期 (metaphase I), 後期 (anaphase I), 終期 (telophase I) 및 제 2 성숙분열의 中期 (metaphase II)로 구분하여 성숙정도를 判定하는 Shea 등 (1976)과 Ball 등 (1983)의 방법에 준하였으며, 受精의 判定은 前核形成, 卵割 卵子, 精子의 侵入, 附着狀態 및 極體의 有無등으로 判定하였다.

III. 結果 및 考察

1. 卵胞卵의 形態의 分類

소의 卵巢 卵胞로부터 채란한 卵子의 형태적 分類를 실시하였는바, 그 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

卵子의 형태적 分類는 透明帶에 부착한 卵丘細胞層의 유무와 성장에 따라 卵丘細胞層이 卵子를 조밀하게 둘러싸고 있는 卵을 A型, A型과는 形態적으로 유사하지만 卵丘細胞層의 일부가 박리된 부분적 裸化卵子를 B型, 완전히 裸化한 卵子를 C型, 卵丘細胞層이 雲霧狀으로 透明帶 부착이 원만치 못한 卵子를 D型으로 分類하는 花田 (1985)의 방법에 준하여 分類하였을때, 總採取卵 1,660卵중 A型卵

은 62.0%, B型卵은 12.0%, C型卵은 17.2% 및 D型卵은 5.9%였다. 한편, 屠殺牛 212頭에 대한 개체별 採卵數는 1頭當 평균 7.83개의 卵胞卵이 採卵되었다.

이러한 결과는 屠殺牛로부터 채취한 A, B, C, D型의 卵의 비율이 각각 57.2%, 9.6%, 25.7% 및 7.5%이며, 頭當 정상 採卵數는 평균 8.0개라고 한 花田 (1985)의 報告와 거의 유사한 결과였다. 한편, Kruip와 Dieleman (1982)은 형태학적으로 정상인 卵胞卵이라면 成熟率도 정상이라고 하였으나, Hay 등 (1976)은 형태학적으로 정상인 卵胞에서도 顆粒膜細胞중에 變成한 卵細胞가 있을때 그것이 卵子의 성숙에 악영향을 줄 가능성이 크다고 하였다. 이로 미루어 볼때, 未熟卵胞卵은 형태적 分類를 통해 선별하여 배양하는 것이 體外受精과 成熟率의 向上面에서 바람직한 것으로 思料된다.

2. 培養溫度에 따른 卵胞卵의 體外成熟率

소 卵胞卵의 배양온도에 따른 體外成熟率을 조사하기 위하여 Ham F-10+20% (v/v) FCS 배양액으로 33~40 $^{\circ}$ C의 CO₂ 培養器에서 48시간 배양하였을때의 體外成熟率을 Table 2와 같다.

培養溫度에 따른 M II (metaphase II)에 도달한 卵胞卵의 培養卵胞卵에 대한 비율은 33 $^{\circ}$ C의 배양에서 35.9%, 35 $^{\circ}$ C의 배양에서 75.4%, 39 $^{\circ}$ C의 배양에서 72.7% 및 40 $^{\circ}$ C의 배양에서 37.9%로, 37~39 $^{\circ}$ C에서 배양한 卵子의 體外成熟率은 우수하였으나, 33~35 $^{\circ}$ C 및 40 $^{\circ}$ C 배양의 體外成熟率은 약간 저조한 성적이었다.

이러한 결과는 38~39 $^{\circ}$ C 배양에 있어서의 體外成熟率은 차이가 없다고 한 Lenz 등 (1983) 및 Katska와 Smorag (1985)의 보고와 일치하였으나, Iritani 등 (1984)의 80%, Fulka 등 (1982)의 84% 및 花田 (1985)의 85~90%의 體外成熟率에 비해 다소 떨어지는 성적이었다.

3. 培養時間에 따른 卵胞卵의 體外成熟率

Table 1. Morphological classification of bovine oocytes recovered from an ovarian follicle

Culture method	No. of oocytes	Morphological classification				Degenerative
		A	B	C	D	
Extra-follicle method	1660	1029	199	285	98	49
	(100.0)	(62.0)	(12.0)	(17.2)	(5.9)	(3.0)

Table 2. The *in vitro* maturation rate of bovine oocytes in relation to culture temperature

Culture temp (°C)	No. of oocytes	Maturation stage				Degenerative
		Metaphase I	Anaphase I	Telophase I	Metaphase II	
33	64	15 (23.4)	9 (14.1)	6 (9.4)	23 (35.9)	9 (14.1)
35	124	15 (12.1)	11 (8.9)	21 (16.9)	72 (58.1)	5 (4.0)
37	152	13 (8.6)	8 (5.3)	19 (12.5)	108 (71.1)	4 (2.6)
38	114	12 (10.5)	5 (4.4)	8 (7.0)	86 (75.4)	3 (2.6)
39	128	12 (9.4)	7 (5.5)	12 (9.4)	93 (72.7)	4 (3.1)
40	58	14 (24.1)	9 (15.5)	6 (10.3)	22 (37.9)	7 (12.1)

Table 3. The *in vitro* maturation rate of bovine oocytes in relation to culture time

Culture time (hr.)	No. of oocytes	Maturation stage				Degenerative
		Metaphase I	Anaphase I	Telophase I	Metaphase II	
18	32	7 (21.9)	9 (28.1)	7 (21.9)	5 (15.6)	4 (12.5)
20	44	5 (11.4)	10 (22.7)	7 (15.9)	20 (45.5)	2 (4.6)
22	36	5 (13.9)	6 (16.7)	2 (5.6)	22 (61.1)	1 (2.8)
24	38	4 (10.5)	0 (0.0)	5 (13.2)	30 (79.0)	0 (0.0)
48	34	2 (5.9)	1 (2.9)	4 (11.8)	25 (73.5)	2 (5.9)
72	33	3 (9.1)	3 (9.1)	4 (12.1)	19 (57.6)	4 (12.1)

Table 4. The *in vivo* fertilization of bovine oocytes cultured by extra-follicle method and transferred into rabbit oviduct

Culture method	Semen	Transfer	No. of oocytes			
			Transferred	Recovered (%) ^{a)}	Fertilized (%) ^{b)}	Cleaved (%) ^{c)}
Extra-follicle method	Neat	Ligated	76	51 (67.1)	32 (62.8)	26 (51.0)
		Non-ligated	74	48 (64.9)	28 (58.3)	24 (50.0)
	Frozen	Ligated	66	39 (59.1)	22 (56.4)	19 (48.7)
		Non-ligated	72	42 (58.3)	22 (52.4)	20 (47.6)

a): No. of oocytes recovered/No. of oocytes transferred

b): No. of oocytes fertilized/No. of oocytes recovered

c): No. of oocytes cleaved/No. of oocytes recovered

소 卵胞卵의 배양시간에 따른 體外成熟率을 조사하기 위하여 Ham F-10+20% (v/v) FCS 배양액으로 38°C의 CO₂ 培養器내에서 18~72시간 배양하였을 때의 體外成熟率은 Table 3 과 같다.

培養時間에 따른 M II 에 도달한 卵胞卵의 培養全體卵胞卵에 대한 비율은, 18, 20, 22, 24, 48시간 및 72시간 배양에 있어서 각각 15.6%, 45.5%, 61.1%, 79.0%, 73.5% 및 57.6%로서, 24~48시간 배

양은 體外成熟率에 있어 큰 차가 없이 양호한 성적이었으나, 18~20시간 및 72시간 배양의 경우는 저조한 成熟率을 나타냈다.

대체로, 소 卵胞卵의 體外培養은 24~48시간 배양이 주로 이용되고 있으며, 成熟率도 양호하다고 보고하고 있다(花田, 1985; Fulka 등, 1982). 그러나 體外培養法이 확립되더라도 생체로부터 채취한 桑實胚 이후의 受精卵에서도 3일 이상의 體外培養은

移植의 경우 受胎成績이 불량하게 되므로 卵胞卵의 體外培養의 경우 培養時間은 24~48시간이 적합한 것으로 思料된다.

4. 體內受精에 있어서의 受精率

體內受精에 따른 受精率을 조사하기 위하여 子宮 卵管接合部나 子宮角基底部를 각각 結紮 또는 非結紮한 토끼의 卵管내에 소의 정액을 희석한 希釋精液과 凍結精液을 각각 體外成熟 卵胞卵과 함께 주입한후, 48시간째에 回收한 卵胞卵의 受精率은 Table 4와 같다.

子宮卵管接合部나 子宮角基底部를 각각 結紮 또는 非結紮한 卵管내에 希釋精液을 주입후 48시간째에 回收한 卵胞卵의 受精率은 각각 62.8%, 58.3%, 分割率은 51.0%, 50.0%였으며, 凍結精液을 이용하였을 때의 受精率은 56.4%, 52.4%, 分割率은 48.7%, 47.6%였다. 希釋精液을 이용한 편이 凍結精液을 이용한 경우보다, 또한 子宮卵管 接合部나 子宮角基底部의 結紮이 非結紮보다 受精率과 分割率이 높게 나타났다.

Iritani와 Niwa(1977)는 토끼의 子宮내에서 12~14시간, Trounson등(1977)은 토끼의 生殖器道내에서 0~4시간 精子와의 前培養에서 受精率에 差는 없었다고 하며, 토끼의 卵管内 배양은 주입하는 卵割卵의 stage에 따라 달라서 2세포기때의 受精率은 3.2%인데 비해, 4~8세포기의 受精率은 31.5%였다고 보고하였다. 體內受精에 관여하는 요인은 주입하는 卵子の stage, 卵管内 培養時間, 結紮部位 및 卵子の 活性등에 따라 受精率이 결정되는 것

으로 思料된다.

5. 體外受精에 있어서의 受精率

體外受精에 따른 受精率을 조사하기 위해 希釋精液과 凍結精液을 소 卵胞液 및 IA處理에 의해 受精能을 획득한 精子의 농도를 20~30×10.6/ml가 되도록 조정하여 시험관에 1ml씩 분주한후, 體外成熟 卵子を 각각 10개씩 넣어 CO₂培養器내에서 약 7시간 媒精시킨후 48시간째에 回收하여 배양한 卵子の 受精率은 Table5에서 보는바와 같이, 希釋精液을 이용한 소 卵胞液 및 IA 처리시의 受精率은 60.0%, 63.4%였으며, 凍結精液을 이용한 소 卵胞液 및 IA 처리시의 受精率은 52.4%, 56.4%였다. 이때 希釋精液과 凍結精液을 이용한 소 卵胞液 및 IA 처리시의 분할율은 각각 48.0%, 52.3% 및 42.7%, 46.2%였다. 精液의 형태에 있어서는 希釋精液이 凍結精液에 비해, 受精能獲得處理에 있어서는 IA處理法이 소 卵胞液處理法에 비해 受精率과 分割率에 있어 다소 우수함이 인정되었다.

이러한 결과는 媒精後 26시간 이후에 2세포기, 38시간 이후에 4세포기의 分割卵이 출현하며, 均等分割卵은 25.6~55%까지 얻을 수 있었다고 한 花田(1985)의 결과에 비해 다소 높은 성적이었다. 精子의 受精能獲得處理法에 있어 IA處理法은 배지내 Ca⁺⁺을 세포내로 운반하여 화학적으로 尖體反應을 일으켜 卵子에의 精子侵入을 용이하게 하는 것으로 이경우 Ca⁺⁺량이 과잉이 되면 精子는 급속히 사멸하고 과소의 경우에는 多精子侵入卵이 되기 쉽다. 한편 소 卵胞液處理法은 간편하고 용이하나

Table 5. The *in vitro* fertilization of bovine oocytes cultured extra-follicle methods

Culture method	Semen	Capacitation	No. of oocytes		
			Cultured	Fertilized(%) ^{a)}	Cleaved(%) ^{b)}
Extra-follicle method	Neat	IA*	86	52 (63.4)	45 (52.3)
		BFF**	75	45 (60.0)	36 (48.0)
		IA	78	44 (56.4)	36 (46.2)
	Frozen	BFF	82	43 (52.4)	32 (42.7)

*:Inophore A 23187

** :Bovine follicular fluid

a):No. of oocytes fertilized/No. of oocyte cultured

b):No. of oocytes cleaved/No. of oocyte fertilized

Table 6. Effects of culture methods, semen types and media on *in-vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro*

Culture method	Semen	Media	No. of oocytes		
			Cultured	Fertilized ^{a)}	Cleaved ^{b)}
Extra-follicle method	Neat	BMOC-3	42	27 (64.3)	21 (50.0)
		Ham F-10	52	33 (63.5)	25 (48.1)
		BMOC-3	48	25 (52.1)	17 (35.4)
	Frozen	Ham F-10	52	27 (51.9)	18 (34.6)

a): No. of oocytes fertilized/No. of oocytes cultured

b): No. of oocytes cleaved/No. of oocytes fertilized

수정율면에서 IA 處理法에 비해 떨어지므로 이러한 점을 개선한다면 보다 향상된 體外受精 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

6. 體外受精時 精液 및 培養液의 影響

소 卵胞卵의 體外受精時 精液의 형태 및 배양액이 미치는 영향을 조사하고자 실시하였는바, 그 결과는 Table 6에서 보는 바와 같이, BMOC-3+20% (v/v) FCS액 및 Ham F-10+20% (v/v) FCS액으로 각각 배양하여 體外成熟후 希釋精液으로 體外受精시켰을 때의 受精率은 각각 64.3%, 63.5%였으며, BMOC-3+20% (v/v) FCS액 및 Ham F-10+20% (v/v) FCS액으로 각각 배양하여 凍結精液으로 體外受精시켰을 때의 受精率은 각각 52.1%, 51.9%였다. 培養液에 따른 受精率의 차는 없었으나 希釋精液이 凍結精液에 비해 受精率面에서 높게 나타났다.

이러한 결과는 배양액에 따른 受精率의 차이는 인정되지 않았으나 精液의 형태에 따라서는 受精率의 차이가 인정되었다. 그러나 배양액에 LH와 estradiol을 첨가하였을 때 좋은 成熟率과 受精率을 나타냈다는 Fukui 등(1983)과, FSH, progesterone 및 FCS 등을 첨가한 배양액에서 성숙시킨 난자의 受精率이 25%였다는 金 등(1988)의 보고를 고려할 때, 앞으로 높은 體外成熟率과 受精率을 가져올 수 있는 培養液과 培養法의 確立이 필요하다고 하겠다.

IV. 摘要

本 研究는 소 卵胞卵을 採卵하여 배양을 통해 形

態의 분류를 한 후, 培養溫度 및 時間에 따른 成熟率과 體內 및 體外受精에 있어서의 精子의 受精能獲得 處理方法, 精液의 형태 및 培養液에 따른 受精率을 조사하기 위해 실시하였다.

1. 소 卵胞卵을 採卵하여 배양을 통해 형태적 분류를 하였을 때 A型卵은 62.2%, B型卵은 12.0%, C型卵은 17.2%, D型卵은 5.9%였으며 發生中止 또는 退化卵은 3.0%였다.

2. 소 卵胞卵의 培養溫度 및 時間에 따른 體外成熟率은 각각 37~39℃ 및 24~48시간 배양에서 우수하게 나타났다.

3. 소 卵胞卵의 토끼 卵管내에서의 體內受精에 따른 受精率은 子宮卵管 接合部 또는 子宮角基底部の 結紮이 非結紮보다 높게 나타났다.

4. 소 卵胞卵의 體外受精時의 受精率은 精子의 受精能獲得 處理에 있어 IA 처리법이 소 卵胞液 처리법에 비해 높게 나타났다.

5. 體外受精에 따른 精液의 형태 및 培養液이 受精率에 미치는 영향은 希釋精液을 이용한 편이 凍結精液에 비해 높게 나타났으나, 培養液의 영향은 인정되지 않았다.

V. 引用文獻

- Ball, G.D., M.E. Bellin, R.L. Ax and N.L. First. 1981. Glycosaminoglycans in individual preovulatory and cystic bovine ovarian follicles. J. Anim. Sci., 53 (Suppl 1): 285.
- Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.L. Ax and

- N.L. First. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro. *J. Dairy Sci.*, 67: 2775-2785.
3. 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.
 4. Brackett, B.G., L.L. Keefer, L.G. Troop, W.J. Donawick and K.A. Bennett. 1984. Bovine twins resulting from in vitro fertilization. *Theriogenology*, 21: 224.
 5. Dooley, V.D. 1984. Follicular oocyte maturation for use in bovine exogenous and in vitro. *Metabolism*, 26: 413.
 6. Edwards, R.G. 1965. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208: 349.
 7. Fukui, Y., M. Fukushima and H. Ono. 1983. Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tract after maturation in vitro. *J. Exp. Zool.*, 226: 137-142.
 8. Fukushima, M. and Y. Fukui. 1985. Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes cultured in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, 9: 232-242.
 9. Fulka, J. Jr., A. Pavlock and J. Fulka. 1982. In-vitro fertilization of zona-free bovine oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.*, 64: 495-499.
 10. Hay, M.F., D.G. Cran and R.M. Moor. 1976. Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. *Cell. Tiss. Res.*, 169: 515-519.
 11. Hensleigh, H.C. and A.G. Hunter. 1985. In vitro maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent in vitro fertilization and cleavage. *J. Dairy Sci.* 68: 1456-1462.
 12. Iritani, A., M. Kasai, K. Niwa and H.B. Song. 1984. Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *J. Reprod. Fertil.*, 70: 487-492.
 13. Irigani, A. and K. Niwa. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.*, 50: 119-121.
 14. Kataska, L. and Z. Smorag. 1985. The influence of culture temperature on in vitro maturation of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 9: 205-212.
 15. Kruip, A.M. and S.J. Dielman. 1982. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod. Nutr. Develop.*, 22: 465-473.
 16. Leibfried, L. and N.L. First. 1980. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. *Biol. Reprod.*, 23: 705.
 17. Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Critser and N.L. First. 1985. Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle. *Theriogenology*, 23: 753-759.
 18. Lenz, R.W., G.D. Ball, M.L. Leibfried, R.L. Ax and N.L. First. 1983. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-development processes. *Biol. Reprod.*, 29: 173-179.
 19. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, M.L. Leibfried-Rutledge, E.S. Critser, W.H. Eyestone and N.L. First. 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25: 591-600.
 20. Shalgi, R., N. Dekel and P.F. Kracer, 1979. The effect of LH on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 55:

- 429.
21. Shea, B.F., J.P.A. Latour, K.N. Bedrin and R.D. Baker. 1976. Maturation in vitro and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes. *J. Anim. Sci.*, 43: 809-815.
 22. Sirard, M.A. and R.D. Lambert. 1986. Birth of calves after in vitro fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet. Rec.*, 119: 167-169.
 23. Trounson, A.O., S.M. Willadsen and L.E.A. Rowson. 1977. Fertilization and development capability of bovine follicular oocytes matured in vitro and in vivo and transferred to the oviduct of rabbit and cows. *J. Reprod. Fertil.*, 51: 321-327.
 24. 花田 章. 1985. 牛 卵胞内 未熟卵子からの受精卵生産. *臨床獣醫* 3(9): 71~75.
 25. 金昌根, 鄭英彩, 朴在元, 宋海範. 1988. 소 卵胞卵의 體外成熟과 受精能力에 關한 研究. *韓畜誌* 30(4): 224~232.