

# 卵胞의 크기, 호르몬의 添加, 精液의 形態 및 受精能獲得 方法 등이 소 卵胞卵의 體外成熟 및 體外受精率에 미치는 影響에 관한 研究

金相根·李晚徽·李鳳求·朴恒均\*

忠南大學校 農科大學

## Studies on the Effects of the Follicle Size, Hormone Supplementation, Semen Type and Capacitation Method on *In Vitro* Maturation and Fertilization Rate of Bovine Follicular Oocytes

Kim, S.K., M.H. Lee, B.K. Lee and H.K. Park

College of Agriculture, Chungnam National University

### SUMMARY

These studies were carried out to investigate the effects of the follicles size, hormone supplementation, semen types and capacitation methods on *in vitro* maturation and fertilization of bovine follicular oocytes.

The ovaries were obtained from slaughtered Korean Native cows. The follicular oocytes surrounded with cumulus cells were recovered by aspirating follicular fluid from the visible follicles of diameter 3~5mm.

The follicular oocytes were cultured in TCM-199 medium containing hormones, FCS, ECS, BFF and MCC for 24~48hrs. in a incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5°C and then matured oocytes were again cultured for 18~20hrs. with motile capacitated sperm in the TCF(Tyrode calcium-free) solution containing 200μg/ml of heparin.

The results obtained in these experiments were summarized as follows :

1. The oocytes classified as "A, B, C, D and Degenerative" depending morphological integrity and those were 61.4%, 12.1%, 19.2%, 4.2% and 3.0% of the total oocytes recovered, respectively. The maturation and fertilization rate of the A, B, C class follicular oocytes, cultured in the TCM-199 medium supplemented with 10% FCS were 89.1%, 78.0%, 52.6% and 78.1%, 66.1%, 33.3%, respectively.
2. The average number of the follicular oocytes recovered from follicles size, 1~2mm, 3~5mm and above 5mm in diameter were 67, 98 and 63, respectively. The maturation and fertilization rate of the follicular oocytes, cultured in the TCM-199 medium were 56.7%, 82.5%, 46.0% and 44.8%, 71.4%, 28.6%, respectively.
3. The maturation and fertilization rate of follicular oocytes, cultured in the TCM-199 medium supplemented with 5%, 10%, 15%, 20% FCS and hCG, HCG,  $\beta$ -estradiol were 76.0%~82.3% and 26.2%~70.0%, and those values were higher the supplementation of the hormone than

the non-supplementation.

4. The fertilization and cleavage rate of the follicular oocytes, inseminated with spermatozoas of epididymis cauda, neat and frozen semen were 63.3%, 73.3%, 70.0% and 32.7%, 37.8%, 38.3, respectively.
5. The fertilization and cleavage rate of follicular oocytes, fertilized with capacitated spermatozoas by heparin, BFF and HIS methods were 70.0%, 53.8%, 34.2% and 38.3%, 23.1%, 17.1%, respectively. And the fertilization and cleavage rate were higher method of heparin than other methods.

## I. 緒 論

近年에는 受精卵 移植分野의 産業的 利用이 가능해짐에 따라 體外受精 분야의 研究도 활발해져 體外에서 受精한 소 受精卵의 이식에 의한 송아지의 출산이 報告되었다. 그러나 이러한 體外受精이 성공적으로 이루어지기 위해서는 卵자의 성숙, 精子의 受精能獲得과 尖體反應 및 卵管내 환경과 동일한 培養條件등의 기술이 필요하나, 現在로서는 완벽한 體外受精의 기술이 확립되어 있지 못한 實情이다.

지금까지의 研究報告를 살펴보면, 소 卵胞卵의 體外成熟率 및 體外受精率에 미치는 阻害要因이 많이 있음이 알려져 있다. 소 卵胞卵의 體外成熟 및 體外受精率에는 卵자의 形態, 培養方法 및 培養條件에 따라 차이가 있으며(Ball 등, 1981; Fukushima와 Fukui, 1985; Dooley, 1984; Leibfried와 First, 1980; Shalgi 등, 1979; 金과 朴, 1988; 金 등, 1988; 尹 등, 1989), 채란된 卵巢 卵胞의 크기와 形態에 따라 차이가 있음이 報告되었으나(Leibfried-Rutledge 등, 1985; Shea 등, 1976) 그러나 卵胞卵의 크기에 따른 體外成熟率의 차이가 없다는 報告도 있다(Fulka 등, 1982; Leibfried와 First, 1980).

최근의 研究는 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 여러가지의 기초적 연구가 수행되고 있는데 이들 研究는 卵胞卵의 體外成熟率과 受精率 및 雄性前核 형성능력을 향상시킬 목적으로 體外成熟 培養液에 각종 호르몬(Ball 등, 1981; Hensleigh와 Hunter, 1985; Leibfried-Rutledge 등, 1985; Dooley, 1984; Leibfried와 First, 1980; Fukui 등, 1982)과 血清(金 등, 1988; Fukui 등, 1983; Sanbuisho와 Threlfall, 1985)등을 첨가하여 培養液의 造成과 培養條件의 변화를 시도하여 體外成熟率과 受精率의 증가를

가져오고 있다.

또한 體外受精에 있어 精子의 形態 및 受精能獲得 處理法의 개선을 시도하는 研究(Parrish 등, 1986; Iritani와 Niwa, 1977; Shalgi 등, 1979; Brackett 등, 1982; Fukui 등, 1983)와 非動化한 卵胞液과 난구세포등 여러가지 물질을 培養液에 첨가하여 높은 體外成熟率과 體外受精率을 얻어려고 하고 있다(Hensleigh와 Hunter, 1985). 그러나, 卵胞卵의 완벽한 體外成熟을 위해서는 호르몬의 種類와 적절한 添加量 및 호르몬간의 併合의 作用에 대해서도 不明한 상태이며, 아울러 적절한 혈정의 種類 및 卵胞液과 卵丘細胞의 添加水準에 대해서도 不明한 상태이다. 또한, 이와 관련된 研究報告에 있어서도 研究者間에 論旨가 일치하지 않을 뿐만 아니라, 短篇의인 연구가 대부분인 실정이다.

이에, 本 研究는 소 卵胞卵의 體外成熟과 體外受精에 미치는 要因 즉 卵胞卵의 形態와 크기, 호르몬의 添加, 精液의 形態 및 受精能獲得 처리법 등이 體外成熟 및 體外受精率에 미치는 영향을 究明하고자 수행하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材 料

#### 1) 卵胞卵의 回收

正常生殖器를 가진 屠殺 直後의 雌畜 韓牛(比重 270~500kg)의 卵巢를 摘出하여, 100IU/ml의 penicillin G와, 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate를 添加한 38 $^{\circ}$ C의 生理食鹽水에 浸漬하여 2時間 이내에 實驗室로 옮겨, 卵巢표면을 洗滌하고 濾過紙로 卵巢표면의 습기를 제거한 다음 18 gauge 注射器로 卵胞液을 흡입하여 時計皿에 채취한 후 實體顯微鏡(20~40 $\times$ )하에서 卵胞卵을 回收하여 培養液으로 3回 洗滌하였다.

## 2) 培養液

卵胞卵의 體外成熟 및 體外受精을 위한 基本培養液은 10% (v/v)의 FCS와 1 $\mu$ g/ml의 FSH(Sigma, USA), 2IU/ml의 hCG, 1 $\mu$ g/ml의  $\beta$ -estradiol (Sigma, USA), 100IU/ml의 penicillin G 및 100  $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate가 添加된 TCM-199(Whittaker, M.A., Bioproducts Co. USA) 培養液을 이용하였으며, 사용전 0.2 $\mu$ m millipore filter로 濾過 滅菌후 사용하였다.

## 2. 方法

### 1) 卵胞卵의 體外成熟

卵胞卵의 體外培養은 體外成熟用 培養液 10 $\mu$ l 小滴을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 培養 2~3時間前에 CO<sub>2</sub>培養器내(5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 38.5°C)에서 5~6시간 平衡시킨 후 小滴當 5개의 卵胞卵을 浸漬하여 24時間 培養하였다.

### 2) 精子的 受精能獲得

#### (1) Heparin 處理法

凍結精液을 38°C의 恒溫水槽에 약 1시간 浸漬하여 融解한 후, 受精能獲得 培養液 TCF(Tyrode calcium-free) 1ml에 融解한 精液 0.2ml를 實驗管내에서 혼합하여 CO<sub>2</sub> 培養器에서 swim-up 처리후, 上層液을 受精用 培養液으로 2,000rpm, 10분간 2回 遠心分離하여 세정하고 精子塊를 同量의 100 $\mu$ g/ml의 heparin (Sigma, USA)과 稀釋하여 15분간 CO<sub>2</sub> 培養器에서 受精能獲得을 誘起하였다.

#### (2) 소 卵胞液 處理法

10~20mm의 卵胞로부터 채취한 卵胞液을 600rpm으로 10분간 遠心分離한 다음 上層液을 56°C에서 30분간 非動化처리후 濾過 滅菌하여, 여기서 融解精液을

1:15의 비율로 稀釋한 다음 CO<sub>2</sub> 培養器에서 4시간 前 培養하여 受精能獲得을 誘起하였다.

#### (3) HIS(high ionic strength)處理法

2ml의 HIS액(Brackett, 1982)에 0.1ml의 精液을 稀釋하여 5분간 培養한 다음 330rpm으로 5분간 遠心分離후 精子塊를 1ml의 BO(Brockett와 Olyphant, 1975)液에 稀釋하여 4시간 前培養하였다.

#### 3) 體外受精

體外受精은 成熟培養한 卵胞卵을 受精用 培養液으로 3回 세정 후, 주위의 卵丘細胞를 pipetting에 의하여 일부 제거한 다음 mineral oil로 피복한 45 $\mu$ l의 受精用 培養液 小滴에 5개의 卵胞卵을 주입한 후, 受精能獲得을 誘起시킨 精子 浮遊液 2 $\mu$ l(1.5 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml)로 媒精하였다.

#### 4) 體外成熟 및 受精의 判定

卵胞卵의 體外成熟 및 受精의 判定은, 回收한 卵胞卵을 24時間 培養후 0.1% hyaluronidase(Sigma, USA)에 의해 卵丘細胞를 제거한 후 slide glass에 滴下하여 25% acetic acid에 24~48시간 固定한 다음 1% acetic-orcein으로 染色하여 Shea 등(1976)과 Ball 등(1984)의 判定基準에 준하여 成熟度와 受精與否를 判定하였다.

## III. 結果 및 考察

### 1. 卵胞卵의 形態의 分類에 따른 體外成熟率과 體外受精率

소의 卵巢 卵胞로부터 채취한 卵胞卵의 形態의 分類를 실시한 후, TCM-199 培養液에서 배양했을 때의 體外成熟率 및 體外受精率은 Table 1 및 2에 나타난

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

No. of oocytes examined(%)	Morphological classification of oocytes				
	A	B	C	D	Degenerative
126 (100)	772 (61.4)	152 (12.1)	241 (19.2)	53 (4.2)	38 (3.0)

A : Oocytes with compact, dense cumulus cells

B : Partially naked oocytes with thin cumulus layer

C : Oocytes with foggy cumulus cell and incompletely attached zona pellucida

D : Naked oocytes

Table 2. *In vitro* maturation and fertilization rate of bovine oocytes classified by cumulus cells

Grade of oocytes	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured (%)*	No. of oocytes fertilized (%)**
A	64	57(89.1)	50(78.1)
B	59	46(78.0)	39(66.1)
C	57	30(52.6)	19(33.3)

\* : The number of oocytes matured to the second metaphase

\*\* : The number of oocytes fertilized

바와 같다.

卵胞卵의 形態의 分類는 透明帶에 부착한 卵丘細胞層의 有無와 成長에 따라 분류하는 花田(1985)의 방법에 준하여 分類하였을 때, 總 採取卵 1,256卵중 A型卵은 61.5%, B型卵은 12.1%, C型卵은 19.2% 및 D型卵은 4.2%였다. 이러한 결과는, A, B, C 및 D型卵의 비율이 각각 57.2%, 9.6%, 25.7% 및 7.5%였다고 보고한 花田(1985)의 結果와 대체로 유사한 결과였다.

또한, 形態의 分類에 의해 분류된 A, B, C型卵을 培養液에 培養했을 때, 體外成熟率은 각각 89.1%, 78.0%, 52.6%였으며, 體外受精시의 受精率은 각각 78.1%, 66.1%, 33.3%로 나타났다. 이로 미루어 볼 때, 未熟卵胞卵은 形態의 分類를 통해 선별한 후 培養하는 것이 우수한 體外成熟率 및 體外受精率을 얻을 수 있는 것으로 思料된다.

## 2. 卵胞의 크기에 따른 體外成熟率 및 體外受精率

소 卵胞의 크기를 1~2mm, 3~5mm 및 5mm 이상의 등급으로 分類하여 회수한 난포란을 TCM-199 培養液에서 培養했을 때의 體外成熟率 및 體外受精率은 Table 3에서 보는 바와 같다.

1~2mm, 3~5mm 및 5mm 이상의 卵胞로부터 채취한 卵胞卵의 數는 228個로서 각각 67개, 98개 및 63개로 나타났다. 또한, 이때의 體外成熟率 및 體外受精率은 각각 56.7%, 82.5%, 46.0% 및 44.8%, 71.4%, 28.6%로서 3~5mm 크기의 卵胞에서 회수한 난포란의 有意的은 아니나 가장 높은 體外成熟率과 體外受精率을 나타냈다.

以上の 結果는, 卵胞卵의 크기에 따른 體外成熟率과 體外受精率은 3~6mm에서 가장 높았으나 有意性이 認定되지 않았다는 Leibfried와 First(1980), Leibfried-Rutledge 등(1985) 및 Fukui 등(1982)의 결과와 일치하였다.

## 3. 호르몬의 添加에 따른 體外成熟率과 受精率

소 卵胞卵의 體外成熟과 受精에 있어서 각 농도의 牛胎兒血清과 호르몬(1 $\mu$ g/ml의 FSH, 2IU/ml의 hCG, 1Ug/ml의  $\beta$ -estradiol)을 添加한 TCM-199 培養液에서 培養했을 때의 體外成熟率과 體外受精率은 Table 4와 같다.

基本培養液에 각 농도별 牛胎兒血清과 호르몬의 添加하지 않았을 때와 添加했을 때의 體外成熟率은 각각 77.8%~80.6%와 76.0%~82.3%로서 큰 차이가 없

Table 3. Effects of follicles size on *in vitro* maturation and fertilization rate of bovine oocytes

Size of follicles	No. of oocytes cultured	No. of oocytes matured (%)*	No. of oocytes fertilized (%)**
1~2mm	67	38(56.7)	30(44.8)
3~5mm	98	81(82.5)	71(71.4)
>5mm	63	29(46.0)	18(28.6)

\* : The number of oocytes matured to the second metaphase

\*\* : The number of oocytes fertilized

Table 4. Effects of hormones added to culture media on *in vitro* maturation and fertilization rate of bovine follicular oocytes

Concent. of serum	Hormones*	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%)**	No. of oocytes fertilized(%)***
	-	45	35(77.8)	13(28.9)
5% FCS	+	54	41(76.0)	11(26.2)
	-	42	33(78.6)	11(26.2)
10% FCS	+	60	49(81.6)	42(70.0)
	-	47	38(80.6)	14(29.8)
15% FCS	+	45	37(82.2)	30(66.7)
	-	50	37(74.0)	15(30.0)
20% FCS	+	51	42(82.3)	35(68.6)

\* : FSH : 1 $\mu$ g/ml HCG : 2IU/ml,  $\beta$ -estradiol : 1 $\mu$ g/ml

\*\* : The number of oocytes matured to the second metaphase

\*\*\* : The number of oocytes fertilized

었으나, 體外受精率에 있어서는 각각 26.2%~30.0%와 26.6%~70.0%로서 牛胎兒血清과 호르몬의 無添加에 비해 添加했을 때가 높은 성적을 나타냈다. 특히, 15%와 20%의 牛胎兒血清과 호르몬의 添加했을 때 각각 66.7%와 68.6%로서 높은 體外受精率을 나타냈다.

이러한 결과는, 牛胎兒血清과 FSH 및 hCG의 첨가가 受精率의 增加를 가져왔다는 Shalgi(1979), Ball 등(1983) 및 Hensleigh와 Hunter(1985) 등의 報告와 일치되는 결과였다. 그러나, 體外成熟率에 있어서는 FSH와 hCG를 첨가하였을 때 成熟率의 증가를 가져왔다는 Ball 등(1983)과 Henleigh와 Hunter(1983)의 報告와는 類似한 결과였으나, FSH나 hCG가 成熟에 절대적이 아니라는 Fukui 등(1983)의 報告와는 차이가 있었다.

#### 4. 精液의 形態에 따른 體外受精率 및 分割率

소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 精液의 形態에 따른 體外受精率과 分割率은 Table 5에서 보는 바와 같이, 精巢上體 尾部 精子를 이용하여 媒精하였을 때의 體外受精率과 分割率은 63.3%와 32.7%였으며, 稀釋精液과 凍結精液으로 媒精하였을 때의 體外受精率과 分割率은 각각 73.3%와 37.8%, 70.0%와 38.3%였다.

精巢上體 尾部 精子를 이용하였을 때 受精能獲得 방법은 다르지만, Ball 등(1983)의 受精率 71.0%보다는 다소 떨어지는 성적이었으나, Bondioli와 Wright(1983)의 凍結精液을 이용한 體外受精率 44.0%보다는 우수한 成績이었으며, 精液의 形態에 따른 體外受精率은 有意的 수준이 아니었다는 성적과는 일치되는 결과였다.

Table 5. Effects of semen types on *in vitro* fertilization rate of bovine oocytes matured *in vitro*

Types of semen	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized(%)*	No. of oocytes cleaved(%)**
SEC	49	31(63.3)	16(32.7)
Neat	45	33(73.3)	17(37.8)
Frozen	60	42(70.0)	23(38.3)

\* : No. of oocytes fertilized/No. of oocytes cultured

\*\* : No. of oocytes cleaved/No. of oocytes fertilized

SEC : sperms of epididymal cauda

Table 6. Effects of capacitation method of sperms on in vitro maturation and fertilization rate of bovine oocytes

Capacitation method of sperms	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized(%)*	No. of oocytes cleaved(%)**
Heparin method	60	42(70.0)	23(38.3)
BFF method	39	21(53.8)	9(23.1)
HIS method	35	12(34.2)	6(17.1)

\* : No. of oocytes fertilized/No. of oocytes cultured

\*\* : No. of oocytes cleaved/No. of oocytes fertilized

BFF : Bovine follicular fluids

HIS : High ionic strength

### 5. 受精能獲得 方法에 따른 體外受精率 및 分割率

소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 受精能獲得 方法에 따른 體外受精率과 分割率은 Table 6에서 보는 바와 같이, heparin 處理法은 70.0%의 受精率과 38.3%의 分割率을 나타냈으며, BFF 處理法과 HIS 處理法의 體外受精率과 分割率은 각각 53.8%와 23.1%, 34.2%와 17.1%였으며 受精能獲得 處理法중 Heparin 處理法이 가장 높은 體外受精率과 分割率을 나타냈다.

이러한 結果는, Parrish 등(1986)이 報告한 heparin 處理시의 受精率 79.0%와, Brackett 등(1982)의 HIS 處理에 의한 受精率 40.0%보다 다소 떨어지는 成績이었으나, Fukui 등(1983)의 BFF 處理에 의한 46.2%보다 다소 높은 成績이었다.

生體내 卵胞液과 子宮液에 존재하는 heparin 과 hyaluronic acid 를 함유하는 Glycosaminoglycans (GAG)는 尖體反應을 촉진시키며, 또한 heparin 과 BSA 를 동시에 첨가했을 때보다 강력한 受精能獲得 작용을 가지고 있어 heparin 處理에 의한 受精能獲得 방법은 높은 體外受精率을 얻을 수 있는 것으로 사료된다 (Ball 등, 1981; Bondioli 와 Wright, 1983; Niwa 와 Ohgoda, 1988).

## IV. 摘要

본 研究는 소의 卵胞卵의 體外成熟과 體外受精에 미치는 阻害要因을 究明하기 위하여 未熟卵胞卵을 채취하여 形態의 分類를 통해 우수한 卵을 供試한 후 卵胞의 형태와 크기, 호르몬의 添加 및 精液의 形態, 受精能獲得 方法 등이 體外成熟率과 體外受精率에 미치는 影響

을 調査하였는 바, 그 結果는 다음과 같다.

1. 소 卵胞卵을 채취하여 培養을 통해 形態의 分類를 했을 때 A 型卵은 61.4%, B 型卵은 12.1%, C 型卵은 19.2%, D 型卵은 4.2%였으며 發生中止 또는 退化卵은 3.0%였다. 또한 A, B, C 型卵을 10% FCS 첨가 TCM-199 培養液에서 배양했을 때 卵胞卵의 體外成熟率은 각각 89.1%, 78.0%, 52.6%였으며, 受精率은 각각 78.1%, 66.1%, 33.3%였다.
2. 소 卵胞의 크기를 1~2mm, 3~5mm 및 5mm 以上으로 分類하여 채취한 卵胞卵의 수는 각각 67개, 98개, 63개였으며, 이를 TCM-199 培養液에서 培養했을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 56.7%, 82.5%, 46.0%와 44.8%, 71.4%, 28.6%였다.
3. 소 卵胞卵의 體外成熟과 受精에 있어서 각 농도의 牛胎兒血清과 FSH, hCG,  $\beta$ -estradiol 을 첨가한 TCM-199 培養液에서 培養했을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 76.0%~82.3% 와 26.2%~70.0%로서 無添加에 비해 添加가 높았다.
4. 소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 精巢上體 尾部精子, 原精液 및 凍結精液을 이용하여 媒精하였을 때 體外受精率과 分割率은 각각 63.3%, 73.3%, 70.0%와 32.7%, 37.8%, 38.3%였다.
5. 소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 heparin 處理法, BFF 處理法, HIS 處理法으로 각각 受精能獲得을 유기하였을 때 體外受精率과 分割率은 각각 70.0%, 53.8%, 34.2%와 38.3%, 23.1%, 17.1%로서 heparin 處理法이 가장 높았다.

## V. 引用文献

1. 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.
2. 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.
3. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R.L. Ax and N.L. First. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 67 : 2775-2785.
4. Bondioli, K.R. and R.W. Wright, Jr. 1983. *In vitro* fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 57(4) : 1001-1005.
5. 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.
6. Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 12 : 260-274.
7. Dooley, V.D. 1984. Follicular oocytes maturation for use in bovine exogenous and *in vitro*. *Metabolism.*, 26 : 413.
8. Fukui, Y., M. Fukushima and H. Ono. 1983. Fertilization *in vitro* of bovine oocytes after various sperm procedure. *Theriogenology.*, 20(6) : 651-660.
9. Fukui, Y., Y. Terawaki and O. Ono. 1982. Effects of gonadotropins on the *in vitro* maturation of bovine follicular oocytes. *Jap. J. Fertil. Steril.*, 27 : 179-187.
10. 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.
11. Fulka, J. Jr, J.A. Pavlok and J. Fulka. 1982. *In vitro* fertilization of zona free bovine oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 64 : 495-499.
12. 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 : 1456-1562.
13. Iritani, A. and K. Niwa. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 50 : 119-121.
14. Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Crister and N.L. First. 1985. Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle. *Theriogenology.*, 23 : 753-759.
15. Leibfried, L. and N. L. First. 1980. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. *Biol. Reprod.* 23 : 705.
16. Niwa, K. and O. Ohgoda. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology.*, 30(4) : 733-741.
17. Parrish, J. J., J. L. Susko-Parrish, M. L. Leibfried-Rutledge, E. S. Crister, W. H. Eyestone and N. L. First. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology.*, 25 : 591-560.
18. Sanbuissho, A. and W.R. Threfall. 1985. The effects of estrous cow serum on the maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte *in vitro*. *Theriogenology.*, 23 : 226 (abstract).
19. Shalgi, R., N. Dekel and P.F. Kraicer. 1979. The effects of LH on the fertilizability and subsequent developmental capacity of rat oocytes matured *in vitro*. *J.*

- Reprod. Fert., 55 : 429-435.
20. Shea, B.F. J.P.A. Latour, K.N. Berdin and R.D. Baker. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. J.Anim. Sci., 43 : 809-815.
  21. 花田 章. 1985. 牛 卵胞内 未熟卵子からの受精卵生産. 臨床獸醫., 3(9) : 71-75.
  22. 金相根, 朴恒均. 1988. 소 卵胞卵의 體外成熟과 受精에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌., 12(2) : 112-119.
  23. 金昌根, 鄭英彩, 朴在元, 宋海範. 1988. 소 卵胞 鱗의 體外成熟과 受精能力에 관한 研究. 韓國畜産學會誌., 30(4) : 224-232.
  24. 尹山鉉, 朴世必, 朴泰均, 高大煥, 鄭吉生. 1989. 牛 卵胞卵의 體外成熟에 관한 研究. II. 發情牛 血清, 牛卵胞液 및 卵丘細胞가 卵胞卵의 體外成熟과 體外受精에 미치는 影響. 韓國酪農學會誌., 11(3) : 139-146.