

韓牛에 있어서 體外受精된 卵胞卵의 胚發生에 關한 研究

徐泰光·朴恒均

慶北大學校 農科大學

Study on Development *in vitro* of Follicular Oocytes fertilized *in vitro* in Korean Native Cattle

Suh, T.K. and H.K. Park

College of Agriculture, Kyungpook National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the factors affecting development *in vitro* of follicular oocytes fertilized *in vitro* in Korean Native Cattle.

The bovine ovaries were obtained at a slaughter house and the follicular oocytes were recovered by aspirating the follicular fluid from the visible follicles of 3~6mm. The bovine oocytes were matured *in vitro* for 20~24 hours in TCM-199 containing 10% FCS and hormones (0.02AU/ml FSH, 10 μ g/ml LH, 1 μ g/ml estradiol-17 β). The matured oocytes were fertilized *in vitro* using Percoll-separated frozen-thawed spermatozoa in BO solution containing caffeine(5 mM) and heparin(10 μ g/ml). Twenty-four hours after insemination, the oocytes were cultured *in vitro* and then the effects of cumulus cell layer, co-culture with cumulus cells, bovine oviduct epithelial cells from ampulla or isthmus on development of ova, were studied.

The results obtained are summarized as follows:

1. The *in vitro* development degree of oocytes attached with compact and dense layered cumulus cells was higher than that with 3~4 layered cumulus cells to be 9~16cells($P<0.01$).
2. When the *in vitro* fertilized oocytes were co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or cumulus cells, the development rate to be morula was 20.2% and 12.7%, respectively and the rates were higher than that of control, 2.1% ($P<0.05$).
3. The development rate to be morula was 15.8% and 23.8%, respectively when the *in vitro* fertilized oocytes were co-cultured with bovine oviduct epithelial cells from ampulla or isthmus, and the rates were higher than that of control, 0% ($P<0.05$).

I. 緒 論

多量の受精卵을 일시에 供給할 수 있는 體外受精技術은 현재 産業의 利用이 이루어지고 있는 受精卵移植技術의 效率性を 增進시킬 수 있는 한 方法으로서 활발한 研究가 進行되고 있다. 이러한 體外受精技術의 確立을 위해서는 卵子の 成熟, 精子의 受精能獲得과 尖體反

應 및 體外受精卵의 發生을 위한 培養條件 등 여러 要因의 定立이 필요하다(金과 朴, 1988).

한편 體外受精卵의 胚 發生과 移植後 産仔 성적은 저조한 실정인데, 특히 胚 發生에 있어서 體內에서 成熟後 體外受精된 卵子에 비해 體外에서 成熟後 體外受精된 卵子の 胚 發生이 더 저조하다(Leibfried-Rutledg 등, 1987; Sanbuissho와 Threlfall, 1989).

Kajihara 등(1988)은 體外培養된 體外受精卵의 染色體異常을 報告하였으며, Iwasaki와 Nakahara(1990)는 體外에서 成熟後 受精된 卵자는 體內에서 成熟後 受精된 卵자에 비해 胚 發生에 있어서 割球數가 적음으로 인해 移植後 受胎率이 낮다고 보고하였다.

이러한 體外 成熟卵자의 胚發生이 저조한 것은 卵胞卵의 核 成熟 및 細胞質 成熟이 體內狀態에서의 成熟과 같이 정상적으로 일어나지 않을 뿐 아니라 受精 및 胚 發生의 條件이 적합하지 않은데 있으며(Sanbuissho와 Threlfall, 1989; Iwasaki와 Nakahara, 1990), Schellander 등(1990)은 卵胞卵을 體外培養시 核 成熟은 정상적으로 일어나 제2成熟分裂 中期에 도달하나, 細胞質 成熟이 정상적으로 일어나지 않아 이것이 그후의 受精 및 胚 發生에 영향을 미치기 때문이라고 報告하였다.

Sato 등(1977)은 卵자를 둘러싸고 있는 卵丘細胞는 卵자와의 gap junction를 통해 成熟에 필요한 물질은 運搬하는 通路로서 중요하며, Fukui(1990)는 卵胞卵의 體外受精에 있어서 卵丘細胞는 精子의 尖體反應 誘起와 受精, 卵자의 分割 및 胚盤胞로의 發生增進에 중요한 역할을 하며, Brackett 등(1989)은 卵丘細胞가 受精率과 그 후의 發生率을 增進시킨다고 報告하였는데, 현재에는 卵丘細胞가 치밀하고 두텁게 부착된 卵胞卵이 높은 發生能을 가진다고 알려져 있다(Yang과 Lu, 1990).

體外培養된 소 卵胞卵의 發生은 block stage라고 알려진 8-16細胞期에서 일반적으로 發生이 정지한다(Camous 등, 1984). 이 block 현상은 初期胚를 卵丘細胞 또는 卵管上皮細胞와 共培養함으로써 극복할 수 있으며(Eyestone 등, 1987; Kajihara 등, 1987; Eyestone과 First, 1989), Goto 등(1988)은 卵丘細胞와 共培養하여 胚盤胞까지 發生된 受精卵을 移植함으로써 産仔에 成功하였으며, 또한 初期胚와 卵丘細胞의 共培養은 胚發生을 향상시킨다고 하였다.

Nakao와 Nakatsuji(1990)는 이러한 共培養의 효과가 卵丘細胞로부터 分泌된 水溶性 要因에 의한 것인지 또는 어떤 종류의 細胞間 接觸에 의한 것인지는 명확하지 않다고 報告하였다.

Eyestone과 First(1989)는 1-8細胞期 胚를 卵管上皮細胞와 共培養했을 때 桑質胚期 이상으로의 發達率이 共培養하지 않은 對照區에 비해 높다고 報告하였다. 卵管 單層細胞가 初期胚의 體外發生을 增進시키는 기전은

명확히 알려져 있지는 않으나 培養液내로 卵管 單層細胞에 의한 發生刺戟因子가 分泌되거나 또는 培養液내의 發生抑制物質을 除去함으로써 그 效果를 나타내는 것으로 알려져 있다(Eyestone과 First, 1989).

Roberts 등(1975)은 卵管 分泌蛋白質이 소 卵管에서 分泌됨을 報告하였으며, Gandolfi와 Moor(1987)는 卵管 單層細胞가 분비한 물질에 의해 胚 發生이 촉진된다고 報告하였다. 그러나 많은 研究者들은 이러한 卵管 單層細胞의 분비물질이 初期胚의 發生을 조절하는 것으로 제시하고 있으나 實驗적으로 증명되지는 않았다.

이에, 본 研究는 體外受精된 韓牛 卵胞卵의 胚發生을 增進시킬 수 있는 要因을 찾고자 體外成熟된 韓牛 卵胞卵을 caffeine과 heparin添加에 의해 受精能獲得이 유리된 凍結融解精子로 受精하여 胚發生을 誘導함으로써 卵胞卵의 卵丘細胞 附着狀態 및 卵丘細胞 또는 卵管上皮細胞와의 共培養이 胚發生에 미치는 影響을 調査하였다.

II. 材料 및 方法

1. 卵胞卵의 回收

本 시험에 공시된 卵胞卵은 屠畜場에서 도살되는 정상生殖器를 가진 韓牛 암소의 卵巢卵胞(3~9mm)로부터 回收하였으며, 18G 주사침이 부착된 주사기를 이용하여 回收된 卵胞卵은 미리 유동 paraffin oil로 피복한 후 CO₂培養器에서 8~12시간 평형시킨 20 μ l 培養液 小滴에 넣고 50~80배의 實體顯微鏡下에서 卵丘細胞가 치밀하고 두텁게 부착된 것(good)과 3~4층으로 부착된 것(fair)으로 선별하여 培養液으로 2~3회 洗滌후 시험에 이용하였다(Fig. 1).

2. 培養液

卵胞卵의 體外成熟 및 發生을 위한 基礎培養液은, 10% FCS(GIBCO, USA), 0.02AU/ml FSH(Toshiba Pharm. Co., Japan), 10 μ g/ml LH(Sigma, USA), 1 μ g/ml estradiol-17 β (Sigma, USA), 11 μ g/ml sodium pyruvate(Sigma, USA), 100 IU/ml penicillin G(Sigma, USA) 및 50 μ g/ml streptomycin sulfate(Sigma, USA)가 첨가된 TCM-199(Earle's salt, Sigma, No. M5017, USA)를 이용하였고 精子處理를 위한 基礎培養液은 glucose를 첨가하지 않은 BO액(Brackett와 Oliphant, 1975)을 이용하였으며 使用前 0.2 μ m milli-

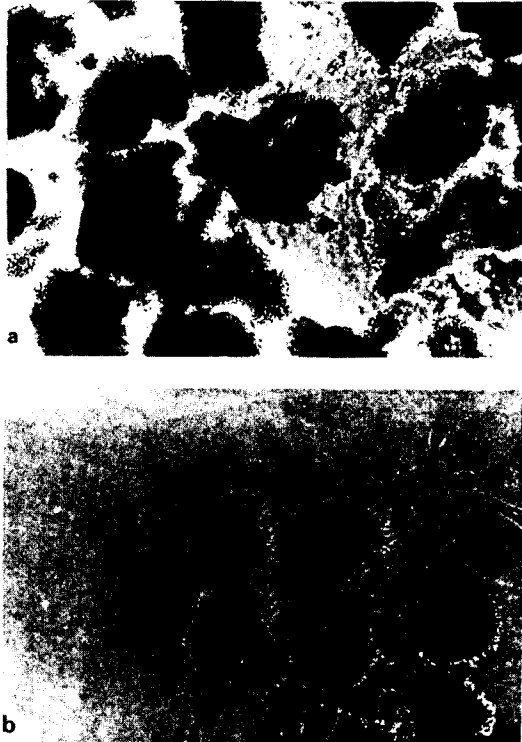


Fig. 1. Cattle follicular oocytes with cumulus cells of different condition, which were selected just after collection
 a) Cattle follicular oocytes with compact and dense cumulus cells (Good)
 b) Cattle follicular oocytes with 3~4 layers of cumulus cells(Fair)

pore filter(Gelman Sci., USA)로 濾過, 滅菌 하였다.

3. 卵자의 培養

供試된 卵胞卵은 紗-레에 200 μ l의 小滴을 만들고 paraffin oil로 피복하여 CO₂培養器내에서 8~12시간 평형시킨 培養液 小滴내에서 20~24시간 成功培養하였다.

體外受精後 24시간에 卵子는 신선한 TCM-199培養液으로 2~3회 洗滌하여 周위의 精子 및 卵丘細胞를 유리시킨 후 200 μ l 培養液 小滴에 넣고 38.5°C, 5% CO₂ 培養器에서 7일간 培養하였으며, 培養液은 36~48시간마다 교환하였다.

4. 精子의 受精能獲得

韓牛 凍結精液은 36~37°C의 恒溫水槽에 약 20초간 浸漬하여 融解한 후, 각 2ml의 30% 및 40% Percoll (Sigma, USA)이중층에 넣고 원심분리(500g, 10분) 후 上層液은 제거하고 시험관 하층에 남은 活力이 좋은 精子를 이용하였다. Percoll에 의해 분리된 精子는 10 mM caffeine이 첨가된 BO액에 부유시킨 후, 20 mg/ml BSA 및 20 μ g/ml heparin이 첨가된 BO액에 同量으로 희석하여 受精能獲得을 誘起하였다(Niwa와 Ohgoda, 1988).

5. 體外受精

體外에서 20~24시간 배양으로 成功이 이루어진 卵胞卵은 BO액으로 2회 洗滌後 20mg/ml BSA 및 20 μ g/ml heparin이 첨가된 100 μ l 수정용 BO액 小滴에 넣고 10mM caffeine으로 희석된 精子를 1:1동량으로 주입하여 媒精하였으며 媒精濃度는 1.4~1.8 \times 10⁷cells/ml 농도로 조정하였다.

6. 共培養

卵管上皮細胞는 卵管을 卵管全體 또는 卵管采 2~3 cm 부위의 膨大部와 子宮卵管接合部 4~5cm 부위의 峽部로 분리한 후 縱으로 切開하여 上皮細胞들을 각각 回收하였다. 회수된 上皮細胞는 發生用 培養液으로 3회 遠心(300g, 5분)洗滌後 부유시켜 1 \times 10⁶cells/ml 농도로 난자와 共培養하였다. 卵丘細胞와의 共培養은 媒精 후 24시간에 卵子를 배양액으로 2~3회 가볍게 세정한 다음, 發生培地로 옮겨 72시간 배양후 卵子 周위의 卵丘細胞를 제거하였다. 이때 배양용 紗-레 바닥에 형성된 卵丘細胞層위에 卵子를 넣어 卵丘細胞와 共培養하였다(Goto 등, 1988).

7. 胚發生의 判定

胚發生의 判定은 體外受精卵을 培養후 12~24시간 간격으로 割球數 또는 形態學的 관찰로써 判定하였다.

III. 結果 및 考察

1. 卵胞卵의 卵丘細胞 附着狀態

卵胞卵의 卵丘細胞 부착상태가 수정후 桑實胚이상으로의 胚發生에 미치는 영향을 조사하기 위하여 卵胞卵을 卵丘細胞가 치밀하고 두텁게 부착된 것과 3~4층으로 부착된 것으로 분류하여, 體外成熟시킨 후 媒精하여

Table 1. Effect of cumulus cell layer attached to oocytes on development of *in vitro* fertilized oocytes*

Cumulus cell layer**	No. of oocytes	No. of oocytes developed to			
		2-4cell	5-8cell	9-16cell	Morula(%)
Good	74	2	12	18 ^b	3(4.1)
Fair	44	3	16	0 ^a	1(2.3)

*Oocytes were cultured for 20~24 hours, and sperm were inseminated without preincubation at concentration of $1.4\sim 1.8\times 10^7$ cells/ml in BO solution containing 5mM caffeine and $10\mu\text{g/ml}$ heparin.

**Good means oocytes with compact and dense cumulus cell layers.

Fair means oocytes with three to four layers of cumulus cells.

^{a,b} Different letters within the same column mean significantly different ($P<0.01$).

TCM-199배양액에서 7일간 배양했을 때의 胚 發生率은 Table 1과 같다.

卵丘細胞가 치밀하고 두텁게 부착된 卵胞卵은 體外受精 후 2~4세포기, 5~8세포기, 9~16세포기 및 桑實胚 이상으로 발달한 것이 74개 卵子中 각각 2, 12, 18 및 3개로서 桑實胚 이상으로의 발달율은 4.1%였다. 卵丘細胞가 3~4층으로 부착된 卵胞卵은 體外受精 후 44개의 난자중 2~4세포기, 5~8세포기, 9~16세포기 및 桑實胚 이상으로 발달한 것이 각각 3, 16, 0 및 1개로서 桑實胚 이상으로의 發生率은 2.3%였으며, 卵丘細胞가 치밀하고 두텁게 부착된 卵胞卵의 9~16세포기로의 胚 發生率이 높았다 ($P<0.01$).

Yang 과 Lu(1990)는 卵胞卵을 卵丘細胞의 부착상태에 따라 裸化, 2~3층, 4~5층 및 치밀하고 완전한 卵丘細胞로 분류하여 體外成熟 유기후 受精을 실시하였을 때 發生率은 각각 48.8, 70.9, 84.2 및 82.1%였으며, 胚盤胞로의 發生率은 각각 0, 12.6, 27.1 및 45.1%로서 裸化된 卵胞卵에 비해 卵丘細胞가 많이 부착된 卵胞卵의 發生率이 유의적으로 높았고 또한 胚盤胞의 發生率은 2~3층의 卵丘細胞가 부착된 卵胞卵에 비해 치밀하고 완전하게 부착된 卵胞卵의 發生率이 유의적으로 높다고 報告하였다. 이러한 결과는 3~4층의 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵에 비해 發生率에는 差異가 없으나, 9~16세포기로의 발달은 치밀하고 두텁게 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵이 유의적으로 높게 나타난 본 研究結果와 一致되는 傾向이었다. 그러나, 본 試驗成績이 이들에 비해 저조한 것은 顆粒膜細胞와 共培養을 하지 않은 점과 培養條件 및 添加物등의 차이에 기인된

것으로 생각된다.

Jones 와 First(1990)는 卵丘細胞가 치밀하게 부착된 卵胞卵을 體外受精 후 10% FCS+TCM-199배양액에서 배양했을 때 9~16세포기 및 16세포기 이상으로의 發生率은 각각 8.3%와 12.5%였으며, Kim 등(1990)은 分割率 및 桑實胚 이상으로의 發生率이 각각 53%와 2.0%였고, Eyestone 등(1990)은 實胚 이상으로의 發生率이 6.0%였다고 報告하였다. 또한 Fukui(1990)는 卵胞卵을 體外成熟後 裸化, 放射冠 閉鎖 및 卵丘閉鎖卵으로 분류하여 수정 후 胚發生을 유기하였을 때 2~8세포기로의 發生은 각각 3.7, 5.8 및 34.3%, 桑實胚 이상으로의 發生은 각각 0, 0 및 1.2%로서 發生率 및 胚發生을 향상시키기 위하여는 卵丘細胞가 필요하다고 하였으며, Yang 과 Lu(1990)도 受精과 胚發生의 向上에 있어서 卵丘細胞의 중요성을 報告하였다.

本 研究結果에서도 卵丘細胞는 cell block 단계 이후의 胚發生에 영향을 미치므로 卵丘細胞가 치밀하고 두텁게 부착된 卵胞卵을 이용하여 배양하는 것이 9~16세포기 이상으로의 胚發生率을 크게 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다.

2. 卵管上皮細胞 및 卵丘細胞와의 共培養

媒精 후 24시간에 卵胞卵을 10% FCS가 첨가된 TCM-199배양액에서 1×10^6 cells/ml 농도의 卵管上皮細胞와 共培養하거나 또는 卵丘細胞와 7일간 共培養하였을 때 胚發生率은 Table 2와 같다.

體外成熟 후 媒精한 104개의 卵胞卵을 卵管上皮細胞와 共培養했을 때 2~4세포기, 5~8세포기, 9~16세포

기 및 桑實胚期 이상으로 발달한 胚의 數는 각각 10, 6, 13 및 24개였으며, 媒精후 158개의 卵胞卵을 卵丘細胞와 共培養했을 때는 각각 16, 19, 25 및 20개가 발달하였다. 桑實胚期 이상으로의 발달율은 卵管上皮細胞 및 卵丘細胞와 共培養하였을 때 각각 20.2%와 12.7%로서 대조구의 2.1%에 비해 유의적으로 높았으며 ($P < 0.05$), 卵管上皮細胞와 卵丘細胞의 共培養간에는 유의적인 차이가 없었으나 卵管上皮細胞와의 共培養이 胚發生率을 더 증가시키는 傾向이었다.

Fukui(1990)는 卵胞卵을 體外受精후 TCM-199배양액에서 卵管上皮細胞와 共培養하였을 때 2~8세포기 및 桑實胚期 이상으로의 發生率은 각각 59.8%와 10.4%, 高等(1990)은 39.7%, Olson 등(1990)은 27%가 桑實胚期 이상으로 발달했다고 報告하였으며, Aoyagi 등(1989)은 卵管上皮細胞와 共培養 또는 共培養하지 않았을 때 胚盤胞期로의 發生率은 각각 39.0%와 1.9%라 하였는데 이들 모두가 卵管上皮細胞와의 共培養은 胚盤胞期로의 發生을 向上시킨다고 보고하였다.

Wang 등(1990)은 體外受精된 卵胞卵을 卵管上皮細胞와 共培養 또는 TCM-199배양액에서 배양했을 때 桑實胚期 이상으로의 發生率은 각각 28.2%와 15.9%로서 卵管上皮細胞의 共培養이 대조구에 비해 유의적으로 높았다고 報告하였으며, Rexroad(1989)는 卵管上皮細胞가 胚發生에 필요한 未知의 成分을 分泌한다고 하였다.

高等(1990)은 受精初期胚를 卵管上皮細胞와 共培養함으로써 胚發生 刺戟因子에 의해 體外發育能이 30~40%수준으로 회복될 수 있다고 보고하였으며, 本研究에서도 胚發生에 有効적으로 작용하는 成分을 究明하지는 못하였으나 卵管上皮細胞가 胚發生率 向上에 効果적으로 작용함을 確認하였다.

한편, Goto 등(1988)은 體外受精된 卵胞卵을 卵丘細胞와 共培養했을 때 桑實胚 및 胚盤胞로의 發生率이 각각 21.1%와 15.1%였으며 朴 등(1990)은 桑實胚로의 발달율이 22.7%, Nakao와 Nakatsuji(1990)는 2~8세포기, 桑實胚 및 胚盤胞로의 발달이 각각 32.8%, 17.2% 및 7.5%였다고 보고하였는데 이는 體外受精시킨 卵胞卵과 卵丘細胞를 共培養했을 때의 本研究結果와 類似한 성적이었다.

Goto 등(1989)과 Kajihara 등(1990)은 體外受精된 난자를 卵丘細胞와 共培養하였을 때 각각 12.6% 및 25.9%의 胚盤胞 發生率을 보고하였으며, Shi 등(1990)은 受精 및 胚發生에 있어서 사용되는 정자를 제공한 寸소의 個體差가 크다고 하였으나, Goto 등(1989)은 體外受精에 精巢上體精子를 사용함으로써 受精 및 胚發生에 있어서 정자를 제공한 寸소의 개체차는 거의 없다고 보고하였다.

또한 朴 등(1990)은 8세포 이후로의 胚 발달은 卵丘細胞와 共培養했을 때 대조구에 비해 유의하게 높았으며 이는 胚發生이 진행됨에 卵丘細胞와의 共培養효과가 크게 나타났기 때문이라고 보고하였다. Kajihara 등(1987)은 胚盤胞로의 발생에 卵丘細胞가 필수적이라고 하였으나 Fukuda 등(1990)은 受精後 96시간 이후에는 그 존재가 필수적이지 아니며 卵丘細胞가 初期胚發生에 필요한 因子를 생산한다고 하였고, Nakao와 Nakatsuji(1990)는 이러한 共培養효과가 卵丘細胞에서 분비된 水溶性 因子에 의한 것인지 또는 어떤 細胞間接觸에 의한 것인지는 밝혀져 있지 않다고 보고하였다.

本研究에서 體外受精卵을 卵管上皮細胞 또는 卵丘細胞와 共培養함으로써 대조구에 비해 胚發生이 향상되었는데 이러한 增進效果의 원인 究明과 이들 細胞가 分泌하는 것으로 알려진 發生刺戟因子의 生化학적 분리동정

Table 2. Effect of co-culture with bovine oviduct epithelial cells or cumulus cells on development of in vitro fertilized oocytes

Co-culture	No. of oocytes	No. of oocytes developed to			
		2-4cell	5-8cell	9-16cell	Morula (%)
Control	140	4	21	39	3(2.1) ^a
Epithelial cells	104	10	6	13	21(20.2) ^b
Cumulus cells	158	16	19	25	20(12.7) ^b

^{a, b} Percentage followed by different letters within the same column differ significantly ($P < 0.01$).

Table 3. Effect of co-culture with bovine oviduct epithelial cells from ampulla or isthmus on development of *in vitro* fertilized oocytes

Co-culture*	No. of oocytes	No. of oocytes developed to			
		2-4cell	5-8cell	9-16cell	Morula(%)
Control	74	2	12	21	0(0.0) ^a
Ampulla	57	3	15	10	9(15.8) ^b
Isthmus	80	8	2	15	19(23.8) ^b

*Bovine oviduct epithelial cells from ampulla or isthmus were added at concentration of 1×10^6 cells/ml.

^{a,b} Percentage followed by different letters within the same column differ significantly ($P < 0.01$).

에 대하여는 앞으로 究明되어야 할 과제로 思料된다.

3. 卵管膨大部 및 峽部の 上皮細胞와의 共培養

體外受精한 卵胞卵을 10% FCS가 첨가된 TCM-199배양액에서 卵管膨大部 또는 峽部로부터 회수된 1×10^6 cells/ml의 上皮細胞와 共培養했을 때의 胚發生 結果는 Table 3과 같다.

媒精한 57개의 卵胞卵을 膨大部로부터 회수한 卵管上皮細胞와 共培養했을 때 2~4세포기, 5~8세포기, 9~16세포기 및 桑實胚期이상으로 발달한 胚의 數는 각각 3, 15, 10, 9개였고, 媒精한 80개의 卵胞卵을 峽部로부터 회수한 卵管上皮細胞와 共培養했을 때 2~4세포기, 5~8세포기, 9~16세포기 및 桑實胚期이상으로 발달한 胚의 數는 각각 8, 2, 15, 19개였으며, 대조구에서는 媒精한 74개의 卵胞卵중 2~4세포기, 5~8세포기, 9~16세포기 및 桑實胚期 이상으로 발달한 胚의 數는 각각 2, 12, 21, 0개였다.

9~16세포기로의 발달에 있어서는 上皮細胞의 共培養 效果가 보이지 않았으나, 桑實胚이상으로의 발달에 있어서는 膨大部 및 峽部로부터 회수된 上皮細胞와 共培養했을 때 각각 15.8%와 23.8%로서 대조구의 0%에 비해 유의적으로 높았고 ($P < 0.05$), 膨大部와 峽部로부터 회수된 卵管上皮細胞와의 共培養간에는 胚發生의 차이는 없었으나 峽部에서 회수된 上皮細胞와 共培養했을 때 발생율이 약간 增加하는 傾向을 나타냈다.

生體內에서 卵管部位에 따른 소 卵子の 통과시간은 수정후 卵管膨大部는 빨리 통과하나 峽部에서는 停滯하며 發情이 끝난 후 약 96시간인 8~16세포기때 卵管을 통과하여 子宮에 도달하게 되는 卵管 통과중의 胚는 자신이 가지고 있는 卵黃物質과 卵管液으로부터 배 발달에 필요한 營養物質을 얻는다(朴과 金, 1986). 이러한

점에서 볼 때 本 研究에서 9~16세포기로의 발달이 대조구와 共培養區간에 별 差異가 나지 않은 것은 cell block 단계이전의 소 卵子是 培養液으로 부터 營養을 공급받아 發生하기 때문이라 생각된다.

한편, Roblero 등(1976)은 卵管膨大部와 峽部에서 분비되는 卵管液의 이온조성이 다르다고 하였으며, Hunter(1988)는 난관내의 纖毛細胞는 대개 卵管膨大部에 많고 卵管上皮細胞의 分泌機能은 峽部에서 더 현저하다고 하였고, Wang 등(1990)은 체외에서 배양한 卵管上皮細胞에서는 배발생에 필요한 未知의 因子를 분비할 것이라고 보고하였다.

本 研究에서 대조구의 卵子是 9~16세포기까지는 발달하였으나 桑實胚로는 발달하지 못하였고, 卵管上皮細胞와 共培養한 난자는 桑實胚 이상으로 발달하였는데 이는 9~16세포기 이후로의 胚 發達에 卵管上皮細胞에서 分泌되는 어떤 成分이 작용한다는 것을 시사한다. 또한 卵管上皮細胞의 共培養에 있어서 膨大部 上皮細胞와 峽部 上皮細胞간에 差異가 있는 것은 共培養한 卵管上皮細胞의 分泌能의 差異에 기인된 것으로 생각된다. 따라서 本 연구결과로 미루어 볼 때 胚 發生의 향상을 위한 體外受精卵과의 共培養에 이용되는 卵管上皮細胞는 膨大部보다 峽部の 上皮細胞와 共培養하는 것이 胚 發生率의 향상을 가져올 수 있다고 思料된다.

IV. 摘 要

本 研究은 體外受精된 韓牛 卵胞卵의 胚發生 增進에 影響을 미치는 要因을 찾고자 實施하였다. 屠殺牛의 卵巢卵胞(3~6mm)로부터 회수한 卵胞卵은 호르몬(0.02 AU/ml FSH, 10 μ g/ml LH, 1 μ g/ml estradiol-17

β)과 10% FCS가 첨가된 TCM-199배양액에서 배양한 후 caffeine과 heparin 처리 精子로 體外受精하였다.

體外受精후 卵胞卵을 배양하여 卵丘細胞 附着狀態, 卵管上皮細胞와 卵丘細胞, 卵管膨大部 및 峽部 上皮細胞의 共培養에 의한 體外發生能을 調査하였던 바 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 卵胞卵을 卵丘細胞가 치밀하고 두텁게 부착된 것과 3~4층으로 부착된 것으로 분류하여 體外成熟후 수정했을 때 9~16세포기 이상으로의 發生率은 卵丘細胞가 치밀하고 두텁게 부착된 卵胞卵이 높았다 ($P < 0.01$).
2. 體外受精한 卵胞卵을 卵管上皮細胞 또는 卵丘細胞와 共培養했을 때 桑實胚 이상으로의 發生率은 대조구의 2.1%에 비해 각각 20.2%와 12.7%로서 높았다 ($P < 0.01$).
3. 體外受精한 卵胞卵을 卵管膨大部 및 峽部로부터 회수한 上皮細胞와 共培養했을 때 桑實胚 이상으로의 胚 發生率은 각각 15.8% 및 23.8%로서 共培養하지 않은 대조구의 0%에 비해 높았다 ($P < 0.05$).

V. 引用文獻

1. Aoyagi, Y., Y. Fukui, Y. Iwazumi, M. Urakawa, Y. Minegishi and H. Ono. 1989. Effects of culture system on development of *in vitro*-fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology*, 31: 68(abstract).
2. Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 12: 260-274.
3. Brackett, B.G.,¹ A.I. Younis and R.A. Fayrerhosken. 1989. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentration of luteinizing hormone. *Fert. Steril.*, 52: 319-324.
4. Camous, S., Y. Heyman, W. Meziou and Y. Menezo. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.*, 72: 479-785.
5. Eyestone, W.H., J. Vignieri and N.L. First. 1987. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. *Theriogenology*, 27: 228(abstract).
6. Eyestone, W.H. and N.L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85: 715-720.
7. Fukuda, Y., M. Ichikawa, K. Naito and Y. Toyada. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 42: 114-119.
8. Fukui, Y. 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Molecular Reprod. Dev.*, 26: 40-46.
9. Gandolfi, F. and R.M. Moor. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 81: 23-28.
10. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and 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.
11. Goto, K., Y. Kajihara, M. Koba, S. Kosaka, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1989. *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes. *J. Anim. Sci.*, 67: 2181-2185.
12. Hunter, R.H.F.. 1988. The fallopian tubes - Their role in fertility and infertility, Springer-Verlag, Berlin. pp.12-29.
13. Iwasaki, S. and T. Nakahara. 1990. Cell number and incidence of chromosomal

- anomalies in bovine blastocysts fertilized *in vitro* followed by culture *in vitro* or *in vivo* in rabbit oviducts. *Theriogenology*, 33: 669-675.
14. Jones, J. M. and N. L. First. 1990. Effect of transcriptional inhibition on bovine embryo development. *Biol. Reprod.*, 42(suppl.1): 57.
 15. Kajihara, Y., K. Goto, M. Tokumaru, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Number of blastomeres and chromosome abnormalities of bovine blastocysts obtained from *in vitro* matured, fertilized and cultured follicular oocytes. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 34: 191-198.
 16. Kajihara, Y., K. Goto, S. Kosaka, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1987. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts *in vitro*. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 33: 173-180.
 17. Kajihara, Y., N. Kometani, S. Kobayashi, Y. Shitanaka, Y. Koshihara, K. Hishiyama, K. Shiraiwa and K. Goto. 1990. Pregnancy rates and births after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *Theriogenology*, 33: 264(Abstract).
 18. Kim, C.I., J.E. Ellington and R.H. Foote. 1990. Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM 199 and a simple defined medium with co-culture. *Theriogenology*, 33: 433-440.
 19. Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Critser, W.H. Eyestone, D.L. Northey and N.L. First. 1987. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 36: 376-383.
 20. Nakao, H. and N. Nakatsuji. 1990. Effects of co-culture, medium components and gas phase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, 33: 591-600.
 21. Niwa, K. and O. Ohgoda. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*, 30: 733-741.
 22. Olson, S.E., A. Romero, W.K. Thomas and G.E. Seidel, Jr. 1990. Effects of FSH and heparin on *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 33: 293(Abstract).
 23. Rexroad, C.E. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 31: 105-112.
 24. Roberts, G.P., J.M. Paker and H.W. Symonds. 1975. Proteins from the luminal fluid of the oviduct. *J. Reprod. Fert.*, 45: 301-313.
 25. Roblero, L., J.D. Biggers and C.P. Lechene. 1976. Electron probe analysis of elemental microenvironment of oviductal mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 46: 431-434.
 26. Sanbisscho, A. and W.R. Threlfall. 1989. The effects of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocytes. *Theriogenology*, 31: 693-699.
 27. Sato, E., A. Iritani and Y. Nishikawa. 1977. Factors involved in maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured *in vitro*. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 23: 12-18.
 28. Schellander, K., F. Fuhrer, B.G. Brackett, H. Korb and W. Schleger. 1990. *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology*, 33: 477-485.
 29. Shi, D.S., K.H. Lu and I. Gordon. 1990. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. *Theriogenology*, 33: 324(Abstract).

30. Wang, W.L., H.S. Jiang, K.H. Lu and I. Gordon. 1990. Effect of condition medium and glucose concentration on the *in vitro* development or early bovine embryos. *Theriogenology*, 33: 343(Abstract).
31. Yang, Y.B. and K.H. Lu. 1990. The influence of bovine oocyte type on *in vitro* fertilization and subsequent development *in vitro*. *Theriogenology*, 33: 355(Abstract).
32. 高光斗, 梁富根, 金正翊. 1990. 體外成熟, 體外受精牛 卵胞卵의 Co-culture 에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌, 14: 50-56.
33. 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: 112-119.
34. 朴世必, 金恩永, 鄭炯敏, 鄭吉生. 1990. 體外成熟牛 卵胞卵의 體外受精과 發生에 관한 研究. I. 卵丘細胞가 體外成熟牛 卵胞卵의 體外受精과 發生에 미치는 影響. 韓國家畜繁殖學會誌, 14: 1-8.
35. 朴恒均, 金榮默. 1986. 家畜繁殖學. 四訂. 鄉文社, pp.260-297.