

體外成熟牛卵胞卵의 體外受精과 發達에 關한 研究  
I. 卵丘細胞가 體外成熟牛卵胞卵의 體外受精과 發達에 미치는 影響

朴世必·金恩永·鄭炯敏·鄭吉生

建國大學校 畜產大學

Studies on *In vitro* Fertilization and Development of Bovine Follicular Oocytes Matured *In vitro*

I. Effect of Cumulus Cells on *In vitro* Fertilization and Development of Bovine Follicular Oocytes Matured *In vitro*

Park, S.P., E.Y.Kim, H.M.Chung and K.S.Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

SUMMARY

These experiments were carried out to investigate the effects of cumulus cells for *in vitro* fertilization and development of bovine follicular oocytes matured *in vitro*. The bovine ovaries were obtained at a slaughter house and the follicular oocytes surrounded by cumulus cells were collected by puncturing follicles with 2~6 mm of diameter.

Bovine oocytes were matured *in vitro* for 24~26 hours in a CO<sub>2</sub> incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air at 39°C. The medium used for maturation was TCM-199 supplemented with hormones, pyruvate, FCS and antibiotics. Epididymal spermatozoa were capacitated by *in vitro* culture for 2~3 hours in BO solution containing BSA(5mg/ml) and caffeine(2.5 mM). Insemination was made by introducing about 10~15 matured oocytes into the suspension of capacitated spermatozoa. Six hour after insemination the eggs were transferred to TCM-199 supplemented with FCS(10%) and HEPES(25mM), cultured for 7~8 days with 10~15 eggs/well in 4-well multidishes(Nunc Co.) forming cumulus cell monolayer.

The results obtained in these experiments were summarized as follows ;

1. The majority of the follicular oocytes with compacted cumulus cells existed in GV stage while those with dispersed or denuded cumulus cells existed GVBD and M II stage.
2. After 24~26 hours maturation, the maturation rates of the follicular oocytes cultured in TCM-199 containing hormones were slightly higher than those of oocytes cultured in medium without hormones, and the frequency of cumulus-compacted or denuded oocytes reaching M II stage cultured in medium containing hormones was 75.7% or 51.7%, respectively (P<0.05).
3. After 20 hours *in vitro* insemination, percentages of ova fertilized were 61.4% or 51.4%, respectively, for cumulus oophorus intacted or removed, and increased frequency of ova with both male and female pronuclei was found when cumuli were present (P<0.05).
4. The rates of embryos developed to 2-, 4-, 8-, 16-cell and morula or blastocyst stage after co-cultured with cumulus cells were 65.0%, 45.3%, 34.7%, 28.0% and 22.7%, respectively.

The results for morula or blastocyst stage were significantly higher than those of the embryos cultured in the basic medium ( $P < 0.05$ ).

## I. 緒 論

哺乳動物의 卵胞卵을 이용하는 研究는 成熟, 受精 및 胚發達 등과 같은 일련의 現象을 體外(*in vitro*)에서 檢討함으로써 이와 關聯된 多數의 生物學的 現象을 闡明할 수 있을 뿐만 아니라 家畜의 生産性 向上 및 改良 手段으로서 利用되고 있는 受精卵 移植技術에 있어서 移植 可能한 多數의 卵子를 提供할 수 있다는 점에 있어 그 意義가 매우 크다고 하겠다.

牛卵胞卵(bovine follicular oocyte)에 관한 研究는 1965年 Edwards가 體外成熟에 따르는 核成熟의 程度를 觀察한 이래 多數의 研究者에 의하여 遂行되어져 왔다. Iritani와 Niwa(1977)가 牛卵胞卵의 體外受精과 胚發達을 통한 産子生産에 成功한 이래 類似한 研究가 많은 研究者들에 의하여 報告되었다(Brackett 등, 1984; Serard와 Lambert, 1985, 1986; Lambert 등, 1986; Sirard 등, 1986; Crister 등, 1986; First와 Parrish, 1987; Xu 등, 1987; Hanada 등, 1987; Sirard 등, 1988; Goto 등, 1988; Fukuda 등, 1990). 그러나 이들 報告의 대부분은 排卵直前의 成熟卵胞卵을 이용한 것들이었다.

한편, 未成熟 牛卵胞卵에 관한 研究는 良質의 卵胞卵을 얻기가 어려울 뿐 아니라(Sirard 등, 1988), 牛精子의 受精能獲得方法이 確立되어 있지 않고(Iritani 등, 1984), 體外培養 條件도 確立되어 있지 않아 非正常的 發生(Goto 등, 1988) 및 *in vitro* cell block(Eyestone 등, 1984) 등이 阻害하여 研究의 進전이 극히 低調한 실정이다.

最近 이러한 問題點들을 克服하기 위한 基礎研究가 多數 遂行되고 있는데 이들 研究는 體外成熟에 關聯된 hormone 혹은 蛋白質 分解酵素 등과 같은 growth factor의 添加效果(Steiner 등, 1975; William-As hman, 1975; Carney 등, 1986; Menino와 O'Claray, 1986), 子宮 혹은 卵管을 利用한 卵胞卵의 體外培養(Newcomb 등, 1978; Parrish 등, 1989) 및 營養胚 葉(trophoblastic vesicle)(Camous 등, 1984), 顆粒細胞(granulosa cell)(Crister 등, 1986), 卵管上 皮細胞(Eyestone 등, 1988) 및 卵丘細胞(cumulus

cell)(Goto 등, 1988) 등과 같은 他 細胞와 共同培養(co culture)등으로 區分되고 있으나 아직 初段階에 머물러 있는 실정이다.

이에 본 研究에서는 卵巢內에 存在하는 多數의 未成熟 卵胞卵을 回收한 다음 이를 體外에서 成熟, 受精 및 培養함에 있어서 卵丘細胞(cumulus cell)가 미치는 京 鄉을 調査하여 약간의 成績을 얻었기에 그 結果를 報告 한다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 供試動物

屠畜場(宇星農場)에서 屠殺된 Holstein 成北牛을 供試動物로 사용하였다.

### 2. 培養液

#### 1) 精子 處理用 培養液

精子處理에는 BO液(Brackett와 Oliphant, 1975)을 基礎培養液으로 사용하였다. 精子洗滌用 培養液으로는 基礎培養液에 5mM caffeine을 添加한 것을, 受精能 獲得과 體外受精用 培養液은 基礎培養液에 5mg/ml의 BSA와 2.5mM caffeine을 添加한 것을 사용 하였다.

#### 2) 卵子 處理用 培養液

卵子的回收, 體外成熟 및 體外培養을 위해서는 TCM 199(Gibco Co.)에 Na-pyuvate 0.11g/l, Gentamycin 0.2mg/ml을 添加한 것을 基礎培養液으로 사용하였다. 이 基礎培養液을 基本으로 하여 卵子回收을 위해서는 25mM HEPES(Sigma Co.)를 添加하여 사용하였고, 體外成熟을 위해서는 1 $\mu$ g/ml의 FSH(Sigma Co.), 2IU/ml의 hCG(Sigma Co.) 및 1 $\mu$ g/ml의 oestradiol 17- $\beta$ (Sigma Co.)를 添加한 것을, 體外培養을 위해서는 基礎培養液에 25mM HEPES와 10% fetal calf serum(FCS: Sigma Co.)을 添加한 것을 사용하였다.

이들 모든 培養液은 pH 7.2~7.4, 삼투압 285~290 mOsmol/kg으로 調整하여 사용하였으며 使用直前に 0.22 $\mu$ m의 membrane filter를 사용하여 除菌한 다

은 10 ml 씩 분注하여 4°C에서 保管하면서 사용하였다.

### 3. 卵胞卵의 回收

#### 1) 卵胞卵의 回收

Holstein 成牝牛의 卵巢를 屠殺直後에 切取하여 100 IU/ml의 penicillin G와 100 µg/ml의 streptomycin sulfate를 含有한 38~39°C의 生理食鹽水가 들어 있는 保溫瓶으로 옮겨 2時間 이내 實驗室까지 운반 하였다. 이어 20 gauge의 注射針이 부착된 10 ml 注射器를 사용하여 2~6 mm의 可視卵胞로부터 卵丘細胞가 密集된 卵胞卵을 회수하였다.

#### 2) 卵胞卵의 生死鑑別

卵丘細胞에 둘러싸인 卵母細胞의 生存性 與否를 確認하기 위하여 卵子回收用 培養液에 同量의 0.4% trypan blue액(Gibco Co.)을 混合한 다음 卵母細胞를 15分間 培養한 후, 實體顯微鏡(Kyowa Co.)하에서 50% 이상 染色된 卵母細胞와 細胞質이 凝縮 또는 破片化된 異狀卵母細胞 등을 제거하고 染色이 되지 않는 것과 細胞質의 상태가 正常的인 卵母細胞만을 골라 體外成熟에 공시하였다.

### 4. 卵胞卵의 體外成熟 및 成熟度 判定

前述한 體外成熟用 培養液 100 µl 小滴을 流動 paraffin oil로 被覆한 다음 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 空氣條件의 培養器내에서 5~6時間 平衡시킨 후 이 培養液 小滴에 回收된 卵胞卵을 침지하여 24~26時間 培養하였다. 培養이 끝난 卵子는 0.1% aceto-orcein(1 mg/ml orcein in 45% acetic acid)으로 染色을 實施하여 卵胞卵의 核成熟度를 判別하였다.(Toyoda와 Chang, 1974).

卵胞卵 成熟의 正常 與否는 第1極體의 形成與否와 細胞質內의 核狀을 基準으로하여 判定하였는데 第1極體가 형성되었어도 細胞質內의 核이 不正位置에 있거나 또는 消失된 것은 異狀成熟으로 判정하였다(Yanagimachi, 1974 ; Park 등, 1989).

### 5. 體外受精

#### 1) 精子의 受精能 獲得

精巢上體 尾部로부터 採取된 精子를 遠心分離(1,000 rpm×5 min)에 의하여 BSA非含有, 5 mM caffeine-BO液으로 2~3회 洗滌하였다. 이때 最終 遠

心分離에 의하여 上層液을 제거한 다음 2.5 mM caffeine과 5mg/ml BSA를 含有한 培養液을 添加하여 20分동안 CO<sub>2</sub> 培養器內에서 培養함으로써 精子浮遊를 誘導하였다.

Petri dish(Falcon Co.)내에 100 µl(15×10<sup>6</sup> cells/ml)의 精子 浮遊液 小滴을 製作한 다음 流動 paraffin oil로 被覆하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 空氣條件의 培養器內에서 2~3時間 前培養을 實施함으로써 受精能을 獲得시켰다(Goto, 1988).

#### 2) 體外受精

前述한 方法에 의하여 體外成熟이 이루어진 卵胞卵을 5mg/ml의 BSA를 含有한 BO液으로 2회 洗滌한 다음 受精能을 獲得한 精子가 含有된 精子 浮遊液 小滴(10~15개/drop)으로 옮겨 體外受精을 誘導하였다. 培養 6時間에는 胚發生用 培養液인 10% FCS와 25 mM HEPES를 含有한 TCM-199 培養液으로 옮겼으며 體外受精의 與否는 第2極體의 放出, 細胞質內에 侵入한 精子 頭部の 膨化와 尾部的 觀察 및 雌雄前核의 確認 등을 基準으로 判정하였다.(Toyoda와 Chang, 1974).

### 6. 體外培養

한편, 體外受精된 卵胞卵은 受精後 20時間에 單層 培養된 卵丘細胞와 共同培養을 實施하였다. 즉, 直徑 1.5cm 이상의 成熟卵胞에서 회수된 卵丘細胞를 0.1% hyaluronidase液으로 처리하여 新鮮 培養液으로 3회 遠心分離한 후 組織培養用 plate(Nunc Co., 4-well)에 침지하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 空氣條件의 培養器內에서 48~72時間동안 培養함으로써 單層培養을 誘導하였다.

이때 單層培養에 利用되는 培養液은 24~36時間 間격으로 1/2씩 交替하였다. 이와 같이 單層培養된 卵丘細胞와 體外受精된 卵胞卵을 共同培養하면서 12時間 間격으로 位相差顯微鏡下에서 形態學的 特性을 觀察하였다.

## III. 結果 및 考察

### 1. 卵胞卵 回收時 卵丘細胞 부착상태에 따른 核成熟度<sup>1)</sup>

직경 2~6 mm의 卵胞에서 회수된 牛卵胞卵의 核成

Table 1. Nuclear stage of bovine follicular oocytes with different configuration of cumulus cell mass at recovery

Configuration of cumulus cell mass	Total no. of oocytes examined	Nuclear stages				
		GV <sup>1)</sup> (%)	GVBD <sup>2)</sup> (%)	MI <sup>3)</sup> (%)	NC <sup>4)</sup> (%)	M II <sup>5)</sup> (%)
Compacted	232	189(81.5)	28(12.1)	5(2.2)	10(4.3)	-
Dispersed	167	-	8(4.8)	8(4.8)	24(74.3)	27(16.2)
Denuded	204	20(9.8)	16(7.9)	16(7.9)	112(54.9)	27(13.2)

1) GV : Germinal Vesicle

2) GVBD : Germinal Vesicle Breakdown

3) M I : First Meiotic Metaphase

4) NC : Nuclear Condensation

5) M II : Second Meiotic Metaphase

Table 2. Effect of gonadotropin and oestradiol 17- $\beta$  on the maturation of bovine follicular oocytes with different configuration of cumulus cell mass

Configuration of cumulus cell mass	Hormone treatment	No. of oocytes examined	Nuclear stages				
			Meta I (%)	Ana I (%)	Telo I (%)	Mata II (%)	Degenerated
Compacted	without	142	36(25.4)	5(3.5)	-	98(69.0)	3(2.1)
	with <sup>a)</sup>	140	28(20.0)	-	6(4.3)	106(75.7)	-
Denuded	without	134	20(14.9)	18(20.9)	15(11.2)	62(46.3)	9(6.7)
	with	143	25(17.5)	10(7.0)	27(18.9)	74(51.7)	7(4.9)

a) 1  $\mu$ g/ml FSH, 2IU/ml hCG and 1  $\mu$ g/ml oestradiol 17- $\beta$

熟度を調査한 結果는 Table 1에서 보는 바와 같았다.

Table 1에서 보는 바와 같이 卵丘細胞의 부착상태에 따라 核成熟度는 相異하게 나타났다. 즉, 卵丘細胞가 compact 한 경우 卵核胞期(germinal vesicle stage)의 卵子가 차지하는 비율이 81.5%로서 disperse 또는 denude된 경우의 0% 및 9.8%에 비해 유의하게 높았다. 이 結果에 따라서 本 研究에서는 회수시 卵丘細胞가 compact 한 未成熟 卵胞卵단을 實驗에 供試하였다.

## 2. 牛卵胞卵의 體外成熟

採取된 卵核胞期 狀態의 未成熟 卵胞卵을 1  $\mu$ g/ml FSH, 2IU/ml의 hCG, 1  $\mu$ g/ml의 oestradiol 17- $\beta$  및 10% FCS를 添加한 TCM-199培養液에서 24~26時間 培養하면서 體外成熟을 誘導하였을 때의 結果는 Table 2에서 보는 바와 같았다.

卵丘細胞의 부착상태가 compact 한 경우와 denude

된 경우 다같이 統計的 有意差는 認定되지 않았지만, hormone 添加群이 다소 良好한 體外成熟率을 나타내었다. 한편, 成熟最終段階인 Metaphase II 段階에 도달된 것은 卵丘細胞가 compact 한 경우 69.0%와 75.7%로서 denude된 경우의 46.3%와 51.7%에 비하여 높게 나타났다( $P < 0.05$ ).

이와 같은 結果는 卵胞卵의 體外成熟에 있어서 hormone의 添加效果는 卵丘細胞의 存在下에서 보다 높은 體外成熟率을 나타낸다는 Sirard 등(1988)의 報告와 一致하는 것이었다.

## 3. 卵丘細胞의 附着有無가 牛卵胞卵의 體外受精에 미치는 影響

體外成熟된 牛卵胞卵을 卵丘細胞가 intact 한 群과 除去된 群으로 나누어 受精能 獲得이 誘導된 精巢上體尾部 精子와 受精시킨 후, 20時間에 卵子를 회수하여 受精率을 觀察한 結果는 Table 3에 提示한 바와 같

**Table 3. Effect of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine follicular oocytes**

Treatment	No. of ova fertilized/ Total no. (%)	Stage of fertilization (%) <sup>a)</sup>		
		I	II	III
CO <sup>+</sup> <sup>b)</sup>	86/140 (61.4)	22 (25.6)	28 (32.6)	36 (41.9)
CO <sup>-</sup> <sup>c)</sup>	75/146 (51.4)	21 (28.1)	35 (46.7)	19 (25.3)

a) Stage of fertilization :

Stage I ; Sperm penetration only

Stage II ; Sperm penetration and female pronucleus

Stage III ; Male and female pronucleus

b) CO<sup>+</sup> : Cumulus oophorus intact

c) CO<sup>-</sup> : Cumulus oophorus removed with 0.1% hyaluronidase

았다.

Table 3에서 보는 바와 같이 卵丘細胞가 intact 한 경우의 受精率은 61.4%로서 卵丘細胞를 제거한 경우의 受精率 51.4%에 비해 다소 높은 成績을 나타내어 卵丘細胞가 受精率에도 重要的 役割을 遂行함을 알 수 있었다. 한편, 受精後 20時間째에 固定, 染色을 實施하여 受精의 形態를 精子의 侵入만 이루어진 경우 (Stage I), 精子의 侵入과 雌性前核이 出現한 경우 (Stage II) 및 雌性 및 雄性前核이 出現한 경우 (Stage III)로 區分하여 觀察하였다.

그 結果, 卵丘細胞가 存在하는 경우의 Stage I은 25.6%, Stage II는 32.6% 및 Stage III는 41.9%였으며 卵丘細胞를 제거한 경우는 Stage I은 28.1%, Stage II는 46.7% 및 Stage III는 25.3%로서 卵丘細胞를 제거한 群에 있어서 Stage III의 比率이 卵丘細胞가 存在하는 群의 그것에 비해 有意하게 낮음을 알 수

있었다 (P<0.05).

이러한 結果는 卵丘細胞가 受精過程에 있어서 雄性前核의 形成에 關與한다는 것을 示唆해주는 結果라 하겠다. 이는 Ball 등 (1983)의 研究 結果와도 一致되는 것이었으며 돼지 卵胞卵을 이용하여 이와 類似한 結果를 나타냈던 朴 등 (1990)의 報告와도 一致되는 것이었다.

#### 4. 單層培養된 卵丘細胞가 體外受精된 牛卵胞卵의 胚發達에 미치는 影響

한편, 體外受精된 牛卵胞卵을 單層培養된 卵丘細胞와 共同培養하면서 그 發達狀態를 觀察한 結果는 Table 4에서 보는 바와 같았다.

卵丘細胞와 共同培養한 경우 總 75個의 卵子 中, 2-細胞期, 4-細胞期, 8-細胞期, 16-細胞期 및 桑實胚期 혹은 胚盤胞期 段階까지 發達한 것은 각각 48(65.0%)個, 34(45.3%)個, 26(34.7%)個, 21(28.0%)

**Table 4. Effect of cumulus cells on in vitro development of bovine embryos**

Co-culture	No. of embryos examined <sup>a)</sup>	No. of embryos developed to				
		2-cell (%)	4-cell (%)	8-cell (%)	16-cell (%)	Morula or Blastocyst (%)
With cumulus cells	75	48 (65.0)	34 (45.3)	26 (34.7)	21 (28.0)	17 (22.7)
Without cumulus cells	64	28 (43.8)	21 (32.8)	12 (18.8)	8 (12.5)	5 (7.8)

a) Ova with 2 polar bodies

個 및 17(22.7%)個로서 對照群에 비하여 전체적으로 높은 胚發達率을 나타내었다.

이러한 結果는 受精後 14일째인 受精卵으로부터 회수한 營養膜細胞를 1-細胞期의 受精卵와 共同培養한 結果 桑實胚期까지 發達한 비율이 42%였다고 한 Camous 등(1984)의 成績보다는 低調한 것이었지만 體外受精이 確認된 1-細胞期의 卵자를 受卵牛 卵管에 移植하여 6일째 회수한 結果 桑實胚期나 胚盤胞期로 發達한 胚의 비율이 38%였다고 報告한 Xu 등(1987)의 成績이나, 受精卵를 緬羊의 卵管에 移植한 結果 桑實胚期 이상으로 發達한 胚가 28%였다고한 Sirard 등(1988)의 成績 및 體外受精된 卵胞卵을 卵丘細胞와 共同培養한 結果 桑實胚期 이상까지 發達한 비율이 10.5%였다고 한 Fukuda 등(1990)의 成績과는 大差가 없는 것이었다.

특히 8-細胞期 이후의 發達率에 있어서 卵丘細胞와 共同培養한 群의 成績이 對照群의 그것에 비하여 有意하게 높았는데( $P < 0.05$ ) 이러한 結果는 胚發生이 進行됨에 따라서 卵丘細胞와의 共同培養의 效果가 크게 나타난다는 것을 示唆하는 것으로 생각되며 卵丘細胞의 添加에 의해 牛受精卵의 體外培養時 發生하는 8-16cell block을 어느 정도 克服할 수 있다는 可能性을 提示해주는 것이라 思料된다.

#### IV. 摘 要

本 研究는 卵巢內에 存在하는 多數의 可視卵胞(2~6 mm)로부터 未成熟 卵胞卵을 회수하여 卵丘細胞의 附着狀態에 따른 hormone 添加의 影響과 受精率을 比較 檢討하고 牛卵胞卵의 體外發生能에 미치는 卵丘細胞 添加의 影響을 檢討하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 卵胞卵 회수時의 核成熟 狀態는 卵丘細胞가 compact 한 경우 卵核胞期 卵자가 차지하는 비율이 81.5%로서, disperse 되었거나 또는 denude 된 경우의 0% 및 9.8%에 비해 有意하게 높았다.

2. 卵丘細胞의 附着狀態가 compact 한 경우와 denude 한 경우에 관계없이 hormone 添加群이 非添加群에 비해 다소 良好한 體外 成熟率을 보였다.

한편, hormone 非添加群과 添加群에 있어서 最終 成熟段階인 M II 段階에 到達된 것은 卵丘細胞가 compact 한 경우는 각각 69.0%와 75.7%로서 denude 된 경우의 46.3%와 51.7%에 비하여 有意하

게 높았다( $P < 0.05$ ).

3. 卵丘細胞가 intact 한 卵자의 受精率은 61.4%로서 卵丘細胞를 제거한 卵자의 51.4%에 비해 다소 높았다. 한편, 雌性 및 雄性 前核이 동시에 出現한 卵자의 비율은 卵丘細胞가 存在했을 때는 41.9%이고 卵丘細胞를 제거했을 때는 25.3%로서 前者가 後者보다 有意하게 높았다( $P < 0.05$ ).

4. 卵丘細胞와 共同培養한 受精卵이 8-細胞期, 16 細胞期 및 桑實胚期 혹은 胚盤胞期까지 發達한 비율은 각각 34.7%, 28.0% 및 22.7%로서 對照群의 18.8%, 12.5% 및 7.8%보다는 有意하게 높았다( $P < 0.05$ ).

#### V. 引用文獻

1. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R. L. Ax and N.L. First. 1983b. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. Theriogenology 19 : 112.
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. Bondioli, K.R. and R.W. Wright. 1983. *In vitro* fertilization of bovine oocyte by spermatozoa capacitation *in vitro*. J. Anim. Sci. 57 : 1001-1002.
4. Brackett, B.G., D. Bousquest, 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.
5. 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. 70 : 533-540.
6. Critser, E.C.S., M.L. Leibfried Lutledge, W.H. Eyestone, D.L. Northey and N.L. First. 1986. Acquisition of developmental

- competence during maturation *in vitro*. Theriogenology 25 : 150 (Abstract).
7. Chang, M.C. 1955. The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. J. Exp. Zool. 128 : 379-406.
  8. Eyestone, W.H., J.Vignieri and N.L.First. 1987. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium, Theriogenology 27 : 228 (Abstract).
  9. Fukuda, Y., Ichikawa, M., Naito, K. and Y.Toyoda. 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.
  10. Fukui, Y., M.Fukushima and H.Ono. 1983. Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation *in vitro*. J. Exp. Zool. 226 : 137-141.
  11. Goto, K., Y.Kajihara, S.Kosaka, M. Koba, Y.Nakanishi and K.Ohawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* maturation follicular oocytes. J. Reprod. Fert. 83 : 753-758.
  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 : 1456-1462.
  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. 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. Fert. 70 : 487-492.
  15. Kajihara, Y., K. Goto, S. Kosaka, Y. Nakanishi and D.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.
  16. 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.
  17. Lenz, R.W., G.D.Ball, J.K.Lohse, M.L. First and R.L.Ax. 1983. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. Biol. Reprod. 28 : 683-690.
  18. Lenz, R.W., G.D.Ball, M.L. Leibfried, R.L.Ax and N.L.First. 1982. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependant processes. Biol. Reprod. 29 : 173-179.
  19. Lu, K.H., M.P.Boland, T.F.Crosby and I.Gordon. 1987. *In vitro* fertilization and cattle oocytes matured *in vitro*. Theriogenology 27 : 251 (Abstract).
  20. Moltik, J. and J.Fulka. 1984. Fertilization of pig follicular oocytes cultivated *in vitro*. J.Reprod. Fert. 36 : 235-237.
  21. Newcomb, R., W.B.Christie and L.E.A. Rowson. 1978. Birth of calves after *in vitro* fertilization of oocytes removed from follicles and matured *in vitro*. Vet. Rec. 102 : 461.
  22. 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.
  23. Pincus, G. and E.U.Enzman. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs *in*

- vitro*. 1. the activation of ovarian eggs. J. Exp. Med. 62 : 665-675.
24. Sanbuissho, A. and W.R.Threlfall. 1985. The effects of estrus cow serum on the maturation and fertilization of bovine follicular oocyte *in vivo*. Theriogenology 23 : 226.
25. Sirard, M.A., J.J.Parrish, C.B.Ware, M. L.Leibfried-Ruthedge and N.L.First. 1989. The culture of bovine oocytes to obtained developmentally competent oocytes. Biol. Reprod. 39 : 546-552.
26. Toyoda, Y. and M.C.Chang. 1974. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. J.Reprod. Fert. 36 : 9-22.
27. Xu, K.P., T.Greve, H.Callssen and P. Hytten. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. J.Reprd. Fert. 81 : 501-504.
28. Yanagimachi, R. 1974. Maturation and fertilization *in vitro* of guinea pig ovarian oocytes. J. Reprod. Fert. 38 : 485-488.
29. 박세필, 박태균, 윤산현, 고대환, 정길생. 1989. 우난포란의 체외성숙에 관한 연구 III. 체외성숙 우난포란의 체외수정과 발달. 한국가축번식학회지 13(2) : 105-112.
30. 박수봉, 박항균, 入谷明. 1990. 체외배양시 과립막세포와 공배양된 돼지 난포란의 성숙과 수정. 한축지 : 32(1) 15-19.
31. 박태균, 이상진, 박세필, 고대환, 윤산현, 박흥대, 정태영, 정길생. 1989. 과립막세포가 우난포란의 체외수정과 발달에 미치는 영향. 한국가축번식학회지 13(3) : 171-178.
32. 윤산현, 고대환, 박세필, 박태균, 정길생. 1989. 우난포란의 체외성숙에 관한 연구 I. 난포란의 회수 및 체외 배양. 한축지 : 31(4)201-209.
33. 윤산현, 박세필, 박태균, 고대환, 정길생. 1989. 우난포란의 체외성숙에 관한 연구 II. 발정우혈청, 우난포액 및 난구세포가 난포란의 체외성숙에 미치는 영향. 한국낙농학회지 11(3) : 139-146.