

돼지 卵胞卵의 體外成熟 및 受精에 관한 研究

金相根 · 李曉徽 · 李明憲 · 申溶浩*

忠南大學校 農科大學

Studies on *in vitro* Maturation and Fertilization of Porcine Follicular Oocytes

Kim, S.K., M.H.Lee., M.H.Lee and Y.H.Shin*

College of Agriculture, Chungnam National University

SUMMARY

These studies were carried out to investigate the effects of fetal calf serum(FCS), estrous porcine serum(EPS), porcine follicular fluid(PFF), hormone and matured cumulus cell(MCC) on *in vitro* maturation and fertilization of porcine follicular oocytes. The ovaries and testes were obtained from slaughtered Landrace sow and boars, respectively. The follicular oocytes surrounded with cumulus cells were recovered by aspirating follicular fluid from the visible follicles of diameter 3~5 mm and the semen were prepared from boar's epididymal cauda.

The follicular oocytes were cultured in TCM-199 medium containing hormones, FCS, EPS, PFF and MCC for 48hrs. in a incubator with 5% CO₂ in air at 36°C and then matured oocytes were again cultured for 18~20 hrs. with 1.5×10⁶/ml motile capacitated sperm in the modified Tyroide solution containing 100 μg/ml of heparin.

The results obtained in these experiments were summarized as follows :

1. The maturation and fertilization rate of the follicular oocytes, cultured in the TCM-199 medium supplemented with 20% FCS and PMSG + HCG were 55.6~64.5% and 33.3~37.1%, respectively.
2. The maturation and fertilization rate of the follicular oocytes cultured in the TCM-199 medium supplemented with 20% EPS and PMSG + HCG were 50.0~55.0% and 30.3~33.3%, respectively.
3. The maturation rate(59.0~64.2%) and fertilization rate(34.8~39.3%) of follicular oocytes cultured in TCM-199 medium supplemented 20% FCS and 50% PFF were higher than those of follicular oocytes cultured in TCM-199 medium supplemented with 5%, 10% and 15% FCS and 10% and 50% PFF.
4. The maturation rate(60.0%) and fertilization rate(40.0%) of follicular oocytes cultured in TCM-199 medium supplemented with 20% FCS and granulosa cell (1×10⁶/ml) were signi-

* 忠北家畜衛生試驗所(Chungbuk Animal Health Laboratory)

ificantly higher than those of follicular oocytes cultured in TCM-199 medium supplemented with 5%, 10% and 15% FCS and granulosa cell.

I. 緒 論

受精卵 移植기술의 産業的 利用이 가능해짐에 따라 最近에는 우수한 능력을 가진 哺乳動物 암컷의 體外受精 및 受精卵 移植 등의 분야에 많은 연구가 수행되어 왔다.

哺乳動物 卵胞卵의 體外成熟에 관한 연구는 Pincus 와 Enzman(1936)이 家兎의 난포로부터 회수한 卵胞卵을 體外培養했을때 減數分裂 현상이 일어남을 보고한 이래, 소(Edwards, 1965 ; Thibault 등, 1975 ; Shea 등, 1976 ; Leibfried 와 First, 1980 ; Fukui 와 Sakuma, 1980 ; Lenz 등, 1983), 양(Moor 와 Trounson, 1977 ; Crosby 와 Moor, 1981 ; 金 등, 1984) 및 돼지(Edwards, 1965 ; McGaughey 와 Polge, 1971 ; Sato 등, 1978)등에서 보고되었다.

한편, 體外成熟 卵胞卵의 體外受精에 관한 연구는 體內·外 受精能獲得 정자와 體外受精과, 體外成熟 난자의 生殖道내의 이식에 의한 體內受精 등(Fulka 등, 1982 ; Ball 등, 1983 ; Lenz 등, 1983 ; Iritani 등, 1986 ; Lu 등, 1987 ; Xu 등, 1987 ; Fukui 와 Ono, 1989 ; Goto 등, 1989)의 결과가 보고되었으나, 주로 실험동물과 소에서만 보고되었을 뿐 돼지에서는 보고가 극히 적은 실정이다.

또한 卵胞卵의 體外成熟 및 受精率을 향상시키기 위하여 培養液에 각종 호르몬의 첨가와 培養液에 첨가되는 血清의 종류 및 수준 또는 卵胞液이나 顆粒膜細胞 등의 첨가에 따라 體外成熟 및 受精率을 높일 수 있다는 결과가 보고되었다(Moor 와 Trounson, 1977 ; Richter 와 McGaughey, 1979 ; Minato 와 Toyoda, 1982 ; Wilde 등, 1984 ; 鄭 등, 1986 ; Eppig 와 Schroeder, 1986 ; Fukui 와 Ono, 1989).

이에, 본 연구는 돼지의 미성숙 卵胞卵을 채취하여 각종 호르몬, 顆粒膜細胞 및 發情豚 血清과 排卵 직전의 卵胞液을 첨가한 培養液내에서 培養하면서 體外成熟率과 受精率을 조사하여 卵胞卵의 體外成熟과 受精에 미치는 영향을 규명코저 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 材 料

1) 卵胞卵의 回收

정상 생식기를 가진 도살 직후의 雌豚(80~100 kg)으로부터 卵巢를 적출하여, penicillin G(100 IU/ml)와 streptomycin sulfate(100 mg/ml)를 첨가한 후, 38℃로 조정된 生理的 食鹽水가 들어있는 보온병에 침적하여 1시간 이내에 실험실로 옮겨, 卵巢표면을 멸균한 생리적 식염수로 세척하고 여과지로 난소표면의 습기를 제거한 다음 직경 3~5 mm의 卵胞만을 18 gauge 주사기로 卵胞液을 흡입하여 時計皿에 채취한 후 實體顯微鏡(20~40×)하에서 卵丘細胞가 조밀하게 부착되고 細胞質이 균일한 卵胞卵을 회수하여 培養液으로 3회 세척하였다.

2) 發情豚 血清의 분리

학내 부장에서 發情徵候가 발견된 雌畜成豚의 耳靜脈으로부터 채혈하여 정치시킨 후 3,000 rpm으로 10분간 2회 遠心分離한 다음 56℃에서 30분간 非働化처리 후 사용시까지 -20℃에서 보관하였다.

3) 卵胞液의 준비

5 mm 이상의 정상적인 卵胞를 공시하여 10 ml 주사기로 卵胞液을 수집하여, 2,000 rpm으로 10분간 遠心分離 후 上層液만을 수집하여 56℃에서 30분간 非働化처리 후 사용시까지 -20℃에서 보관하였다.

4) 顆粒膜細胞의 준비

직경 5 mm 이상의 卵胞를 미세가위를 이용하여 卵胞를 난소 표면에서 분리한 후 實體顯微鏡하에서 미세 핀셋으로 2~3겹의 卵胞外膜 및 毛細血管으로 제거한 다음 PBS로 3~4회 세척한 후 毛細血管이 없는 난포부분을 절제한 다음 卵胞내용물을 5% FCS를 첨가한 PBS로 회수하였다. 1회에 4~5개의 卵胞를 선발 수집하여 2,000 rpm으로 10분간 遠心分離 후 침전된 顆粒膜細胞(1×10^6 /ml)를 배양액에 첨가하였다.

5) 培養液의 준비

돼지 卵胞卵의 體外成熟을 위한 기본 培養液은 TCM-199(Whittaker Co., USA)로 5%, 10%, 15% 및 20% (V/V)의 FCS를 첨가하였으며, 또한 여기에

PMSG 와 HCG, 10%, 50% (V/V)의 卵胞液, 顆粒膜細胞(1×10^6 /ml) 및 5%, 10%, 15% 및 20% (V/V)의 發情豚血清을 각각 첨가하여 試驗에 사용하였다.

2. 方法

1) 精子的 회수 및 受精能獲得 誘起

도살 직후 雄豚의 精巢上體를 절제하여 體外受精 2시간전에 여과지로 수분을 제거한 후 세절한 다음 受精能獲得 培養液(modified Tyroide solution, pH 7.4) 2ml에 精子浮游液 0.01ml를 원심분리용 시험관에서 잘 혼합한 후 38°C의 배양기에서 1시간 swim up 처리하였다.

약 0.5ml의 上層液을 2,000rpm으로 10분간 遠心分離한 후 침전된 精子 pellet를 동량의 heparin 용액

(100 μ g/ml)과 함께 혼합하여 CO₂ 培養器에서 15분간 정처하였다.

2) 卵胞卵의 體外培養 및 受精

Mineral oil (Squibb, USA)로 피복한 50 μ l의 培養液은 배양 2~3시간전에 CO₂배양기(5% CO₂, 38°C)에서 평형시킨 후 5~10개의 卵母細胞를 배양하였다.

體外에서 成熟시킨 卵母細胞를 배양액으로 세정한 후 mineral oil로 피복한 45 μ l의 수정용 배양액 小滴에 5개의 卵母細胞를 주입한 후 受精能獲得을 유기시킨 精子浮游液 2 μ l(1.5×10^6 /ml)로 媒精하였다. 體外成熟 배양 48시간 후 卵母細胞의 1/2은 成熟率을 조사하였으며, 나머지 1/2은 媒精후 18~20시간에 受精率을 검사하였다.

3) 受精의 判定

배양된 卵胞卵은 0.1% hyaluronidase(Sigma

Table 1. Effects of various FCS and gonadotrophin(PMSG + HCG) added to culture media on in vitro maturation and fertilization of porcine follicular oocytes.

Serum	Hormone	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured* (%)	No. of oocytes fertilized** (%)
5% FCS	PMSG 1IU + HCG 1IU	79	34(43.0)	20(25.3)
	PMSG 1IU + HCG 10IU	93	39(44.6)	25(26.9)
	PMSG 10IU + HCG 1IU	65	29(44.6)	18(27.6)
	PMSG 10IU + HCG 10IU	88	37(42.0)	23(26.1)
	total	325	139(42.8)	83(25.5)
10% FCS	PMSG 1IU + HCG 1IU	46	21(45.6)	12(26.0)
	PMSG 1IU + HCG 10IU	66	31(46.9)	19(28.8)
	PMSG 10IU + HCG 1IU	58	27(46.6)	18(31.0)
	PMSG 10IU + HCG 10IU	68	33(48.5)	19(27.9)
	total	238	112(47.0)	68(28.6)
15% FCS	PMSG 1IU + HCG 1IU	30	17(56.6)	8(26.7)
	PMSG 1IU + HCG 10IU	36	20(55.6)	9(25.0)
	PMSG 10IU + HCG 1IU	54	31(57.4)	20(37.0)
	PMSG 10IU + HCG 10IU	57	32(57.4)	24(37.0)
	total	177	100(56.5)	61(34.5)
20% FCS	PMSG 1IU + HCG 1IU	26	16(61.5)	9(34.6)
	PMSG 1IU + HCG 10IU	27	15(55.6)	9(33.3)
	PMSG 10IU + HCG 1IU	31	20(64.5)	11(35.5)
	PMSG 10IU + HCG 10IU	35	22(62.9)	13(37.1)
	total	119	73(61.3)	42(35.3)

* The number of oocytes matured to the second.

** The number of oocytes fertilized.

Chemical Co., USA)의 처리로 주위의 卵丘細胞層을 제거한 體外成熟卵이나, 受精卵을 slide glass 중앙에 보정시키고 acetic alcohol 1:3으로 48시간 정도 고정시킨 후 0.1% acetic orcein액으로 염색하여 位相差顯微鏡하에서 卵胞卵의 核의 성숙 정도 및 受精 여부를 Shea 등(1976), Ball 등(1983)의 방법에 준하여 관찰하였다.

III. 結果 및 考察

1. 牛胎兒血清과 性腺刺戟호르몬의 효과

豚卵胞卵의 體外成熟 및 受精에 미치는 牛胎兒血清(FCS)과 性腺刺戟호르몬(PMSG + HCG)의 영향을 구명하고자, 기본배양액에 5%, 10%, 15% 및 20%의 FCS와 PMSG + HCG를 첨가하였을때의 體外成熟率과 受精率은 Table 1에 나타난 바와 같다.

5% FCS와 性腺刺戟호르몬을 첨가한 培養液에서 배양한 卵胞卵의 體外成熟率과 受精率은 각각 42.8%와 25.5%였으며, 10% FCS와 性腺刺戟 호르몬의 첨가시는 47.0%의 성숙율과 28.6%의 수정율을 나타냈다. 또한 15% FCS와 性腺刺戟호르몬을 첨가했을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 56.5%와 34.5%였으며, 20% FCS와 性腺刺戟호르몬의 첨가에 있어서는 61.3%의 성숙율과 35.3%의 수정율을 나타냈다.

체외배양 卵胞卵의 성숙율의 범위는 42.8%~61.3%로서 20% FCS 첨가에서 61.3%로 가장 높은 성숙율을 나타냈으며, 5% FCS 첨가에서는 42.8%로 약간 저조한 성적을 나타냈다.

한편, 體外受精率 역시 20% FCS와 PMSG + HCG를 첨가한 배양에서 가장 높은 수정율을 나타냈으며, 5% FCS와 PMSG + HCG 첨가의 경우는 가장 낮은 수정율을 나타냈다.

이러한 결과는 Sato 등(1978)과 Iritani 등(1986)의 60.9% 및 60.6%의 體外成熟率과 유사한 성적이었다.

한편, 體外受精率에 있어서는 Iritani 등(1986)의 26.4%보다는 우수한 성적이었으나 Nagai 등(1984)의 75.0%의 수정율에 비해서는 낮은 성적이었다.

2. 發情豚血清과 性腺刺戟호르몬의 효과

豚 卵胞卵의 체외성숙 및 수정에 있어서 發情豚血清(EPS)과 性腺刺戟호르몬을 첨가한 배양액에서 배양했

을때의 體外成熟率 및 受精率은 Table 2에서 보는 바와 같다.

5%의 發情豚血清과 性腺刺戟호르몬을 첨가한 배양액에서 성숙시킨 卵胞卵의 성숙율과 수정율은 각각 39.8%와 23.5%였으며, 10%의 發情豚血清과 性腺刺戟호르몬의 첨가시의 성숙율과 수정율은 42.7%와 26.7%를 나타냈다. 또한, 15% 및 20%의 發情豚血清과 性腺刺戟호르몬의 첨가시의 성숙율과 수정율은 각각 48.7%와 27.7% 및 53.1%와 32.2%였다.

한편, 동일조건하에서 發情豚血清의 농도가 증가함에 따라 대체로 成熟率은 증가하였으며, 또한 牛胎兒血清(FCS)이 發情豚血清(EPS)보다 우수한 성숙율 및 수정율을 나타냈다.

이러한 결과는 Sanbuissho와 Threlfall(1985)이 發情牛血清과 배란시의 血清 및 배란후 24시간 후의 血清을 첨가한 배양액에서 배양했을때 成熟率에 있어서는 유의할만한 차이는 없었으나, 受精率에 있어서는 發情牛血清이 가장 우수한 성적을 얻었다고 한 보고와는 類似한 점이 인정되었다.

供試動物은 다르나, Xu 등(1987)과 Lu 등(1987)이 소에 있어서 發情牛血清이 卵胞卵의 체외성숙과 수정에 있어서 향상된 결과를 가져온다고 한 보고와, Fukui와 Ono(1989)의 牛胎兒血清과 發情牛血清을 비교할 때 牛胎兒血清이 成熟率과 受精率에 있어서 우수한 결과를 얻었다고 한 보고와는 유사한 성적이었으며, 發情豚血清의 경우도 牛胎兒血清을 대체할 수 있는 우수한 血清으로 인정되었다.

3. 牛胎兒血清과 卵胞液의 효과

牛胎兒血清과 배란 직전의 卵胞에서 채취한 卵胞液을 첨가한 배양액에서 體外培養한 卵胞卵의 성숙율과 수정율은 Table 3에 나타난 바와 같다.

5%의 牛胎兒血清과 10%, 50%의 卵胞液을 첨가하였을때의 성숙율은 42.1%와 55.5%였고, 수정율은 26.3%와 27.7%였으며, 10%의 牛胎兒血清과 10%, 50%의 卵胞液을 첨하였을때의 성숙율은 53.8%, 60.0%였고, 수정율은 30.7%, 33.3%를 나타냈다. 한편, 15%의 牛胎兒血清과 10%, 50%의 卵胞液을 첨가하였을때의 성숙율은 54.5%, 62.5%였고, 수정율은 31.8%, 37.5%였으며, 20%의 牛胎兒血清과 10%, 50%의 卵胞液을 첨가하였을때의 성숙율은 59.0%, 62.4%였고, 수정율은 34.8%, 39.3%였다. 한편, 牛

Table 2. Effects of various estrous porcine serum and gonadotrophin(PMSG + HCG) added to culture media on *in vitro* maturation and fertilization of porcine follicular oocytes.

Serum	Hormone	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured* (%)	No. of oocytes fertilized** (%)
5% EPS	PMSG 1IU + HCG 1IU	26	10(38.5)	7(26.9)
	PMSG 1IU + HCG 10IU	25	10(40.0)	6(24.0)
	PMSG 10IU + HCG 1IU	26	11(42.3)	5(23.8)
	PMSG 10IU + HCG 10IU	21	8(38.1)	5(23.8)
	total	98	39(39.8)	23(23.5)
10% EPS	PMSG 1IU + HCG 1IU	18	7(38.9)	5(27.7)
	PMSG 1IU + HCG 10IU	20	9(45.0)	5(25.0)
	PMSG 10IU + HCG 1IU	19	8(42.1)	6(31.5)
	PMSG 10IU + HCG 10IU	18	8(44.4)	4(22.2)
	total	75	32(42.7)	20(26.7)
15% EPS	PMSG 1IU + HCG 1IU	32	16(50.0)	8(25.0)
	PMSG 1IU + HCG 10IU	31	14(45.2)	9(29.0)
	PMSG 10IU + HCG 1IU	30	16(53.3)	8(26.6)
	PMSG 10IU + HCG 10IU	26	12(46.1)	8(30.8)
	total	119	58(48.7)	33(27.7)
20% EPS	PMSG 1IU + HCG 1IU	18	9(50.0)	6(33.3)
	PMSG 1IU + HCG 10IU	20	11(55.0)	6(30.0)
	PMSG 10IU + HCG 1IU	28	15(53.6)	9(32.0)
	PMSG 10IU + HCG 10IU	30	16(53.3)	10(33.3)
	total	96	51(53.1)	32(32.3)

* The number of oocytes matured to second metaphase.

** The number of oocytes fertilized.

Table 3. Effects of various FCS and follicular fluid added to culture media on *in vitro* maturation and fertilization of porcine follicular oocytes.

Serum	Follicular fluid	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured* (%)	No. of oocytes fertilized** (%)
5% FCS	10%	19	8(42.1)	5(26.3)
	50%	18	10(55.5)	5(27.7)
10% FCS	10%	26	14(53.8)	8(30.7)
	50%	15	9(60.0)	5(33.3)
15% FCS	10%	22	12(54.5)	7(31.8)
	50%	24	15(54.5)	7(31.8)
20% FCS	10%	23	13(59.0)	8(34.8)
	50%	28	18(64.2)	10(39.3)

* The number of oocytes matured to the second metaphase.

** The number of oocytes fertilized.

胎兒血清의 농도를 증가시킴에 따라 성숙율과 수정율도 대체로 증가하는 경향을 나타냈다.

이러한 결과는 牛胎兒血清에는 수정을 촉진하는 확실적인 요소가 존재하며, 이 요소는 돼지 卵胞液에도 존재한다고 한 Eppig와 Schroeder(1986)의 보고와 일치하였다.

4. 牛胎兒血清과 顆粒膜細胞의 효과

각 농도의 牛胎兒血清과 顆粒膜細胞를 첨가한 배양액에서 배양했을때의 卵胞卵의 성숙율과 수정율은 Table 4에 나타난 바와 같다.

Table 4. Effects of various FCS and granulosa cell(1×10^6 /ml) added to culture media on in vitro maturation and fertilization of porcine follicular oocytes.

Serum	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured*(%)	No. of oocytes fertilized** (%)
5% FCS	30	15(50.0)	8(26.6)
10% FCS	32	17(53.1)	9(28.1)
15% FCS	31	17(54.8)	11(35.4)
20% FCS	30	18(60.0)	12(40.0)

* The number of oocytes matured to the second metaphase.

** The number of oocytes fertilized.

5%의 牛胎兒血清과 顆粒膜細胞를 첨가하였을 때의 卵胞卵의 성숙율과 수정율은 50.0%, 26.6%였으며, 10%의 牛胎兒血清과 顆粒膜細胞를 첨가하였을 때의 성숙율은 53.1%, 수정율은 28.1%였다. 한편, 15% 및 20%의 牛胎兒血清과 顆粒膜細胞를 첨가하였을 때의 성숙율은 54.8%와 60.0%였으며, 수정율은 35.4%와 40.0%였다.

이러한 결과는 Ball 등(1983)이 顆粒膜細胞는 glycoaminoglycans(chondroitin sulfate)를 생산하며, 이 물질은 卵胞卵의 성숙과정에 필수적인 卵丘細胞의 확장에 유익한 효과를 나타냈다고한 보고와, Ball 등(1983) 및 Crister 등(1986)은 배양액에 顆粒膜細胞를 첨가하면 성숙율 및 수정율이 향상된다고 한 보고와 일치되는 소견이었다.

한편, 일부에서는 卵胞卵의 성숙을 억제하는 물질은 顆粒膜細胞의 기원이며(Tsafiriri, 1979), 顆粒膜細胞에 의해 생산되어 卵胞液으로 방출된다(Tsafiriri 등, 1976)고 보고하였으나, 다른 연구자들은 顆粒膜細胞와의 共培養으로 마우스(N-kola와 Smith, 1980), 돼지(Jagiello 등, 1977; Rice와 Mcgaughey, 1980), 소(Jagiello 등, 1977) 등의 卵胞卵의 성숙을 억제하지 못하였다고 보고하였다.

IV. 摘要

본 연구는 돼지의 미성숙 卵胞卵을 채취하여 血清, 호르몬, 顆粒膜細胞 및 배란 직전의 卵胞液을 첨가한 培養液내에서 배양하면서 體外成熟率과 受精率을 조사하였는바 그 결과는 다음과 같다.

1. FCS 20%와 성선자극호르몬(PMSG + HCG)을 첨가한 TCM-199 배양액에서 배양했을때의 卵胞卵의 成熟率은 55.6~64.5%였으며, 受精率은 33.3~37.1%였다.

2. 發情豚 血清 20%와 性腺刺戟호르몬(PMSG + HCG)을 첨가한 TCM-199배양액에서 배양했을때의 卵胞卵의 成熟率은 50.0~55.0%였으며, 受精率은 30.0~33.0%였다.

3. FCS 20%와 배란직전의 卵胞에서 채취한 卵胞液 50%를 첨가한 TCM-199 배양액에서 배양했을때의 卵胞卵의 成熟率은 59.0%~64.2%, 受精率은 34.8~39.3%로서, FCS 5%, 10% 및 15%와 卵胞液 10%, 50%를 첨가한 배양액에서 배양시의 成熟率과 受精率에 비해 높았다.

4. FCS 20%와 成熟 顆粒膜細胞(1×10^6 /ml)를 첨가한 TCM-199배양액에서 배양했을때의 卵胞卵의 成熟率과 受精率은 각각 60.0%와 40.0%로서, FCS 5%, 10% 및 15%와 成熟 顆粒膜細胞를 첨가한 배양액에서 배양시의 成熟率과 受精率에 비해 높았다.

V. 引用文獻

1. 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* fertiliza-

- tion of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod., 28 : 717-725.
2. Crister, E.S., M.L.Leibfried-Rutledge, M. L., W.L.Eyestone, D.L.Northey and N.L. First. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro* Theriogenology, 25 : 150(Abtract).
 3. Crosby, I.M. and R.M.Moor. 1985. Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation. J.Reprod. Fert., 75 : 467-473.
 4. Edwards, R.G. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, Rhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature, 208 : 349.
 5. Eppig, J.J. and A.C.Schroeder. 1986. Culture system for mammalian oocyte development : progress and prospects. Theriogenology, 25 : 97-106.
 6. Fukui, Y. and H.Ono. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells and added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J.Reprod. Fert., 86 : 501-506.
 7. Fukui, Y. and Y.Sakuma. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro* : Relation to ovarian activity, follicular size and the presence of cumulus cell. Biol. Reprod., 22 : 669-672.
 8. Fulka, J., Jr.A.Pavlok and J.Fulka. 1982. *in vitro* fertilization of zona-free bovine oocytes matured in culture. J.Reprod. Fert., 64 : 495-499.
 9. 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.
 10. Iritani, A., K.Utsumi, M.Miyake and Y. Yamaguchi. 1986. Individual variation in the *in vitro* fertilizing ability of bull spermatozoa. Dev. Growth & Differ. Suppl. 28 : 45.
 11. Jagiello, G., J.Graffeo, M.Ducayen and R.Prosser. 1977. Further studies of inhibitors of *in vitro* mammalian oocyte maturation. Fert. Steril., 28 : 476-481.
 12. Leibfried, M.L. and N.L.First. 1980. Follicular control of meiosis in the porcine oocytes. Biol. Reprod., 23 : 705.
 13. 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 dependent processes. Biol. Reprod., 23 : 705.
 14. Lu, K.H., M.P.Boland, T.F.Crosby and I.Gordon. 1987. *In vitro* fertilization of cattle oocytes matured *in vitro*. Theriogenology, 27 : 251. (Abstract).
 15. McGughey, R.W. and C.Polge. 1971. Cytogenetic analysis of pig oocytes matured *in vitro*. J.Exp.Zool., 176 : 383-396.
 16. Minato, Y. and Y.Toyoda. 1982. Induction of cumulus cell expansion and maturation division of porcine oocyte cumulus complexes *in vitro*. Jap.J.Zootech.Sci. 53 : 480-487.
 17. 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.
 18. Nagai, T., K.Niwa and A.Iritani. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 70 : 271-275.
 19. Nekola, M.V. and D.M.Smith. 1974. Oocyte maturation and follicle cell viability *in vitro*. Eur.J.Obstet. Gynec. Reprod. Biol., Suppl. 4 : 125-131.
 20. Pincus, G. and E.V.Enzman. 1936. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. II. Activation of tubal

- eggs of rabbit. J.Exp.Zool., 72 : 195-208.
21. Rice, C. and R.W.McGaughey. 1980. Interactions between the granulosa cell and the oocyte *in vitro*. J.Anim.Sci., Suppl. 51 : 521. (Abstract).
 22. Richter, J.D. and R.W.McGaughey. 1979. Specificity of inhibition by steroids of porcine oocyte maturation *in vitro*. J.Exp. Zool., 209 : 81-90.
 23. Sanbuissho, A. and W.R.Threlfall. 1985. The effects of estrous cow serum on the maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte *in vitro*. Theriogenology, 23 : 226. (Abstract).
 24. Sato, E., A.Iritani and Y.Nishikawa. 1978. Rate of maturation division of pig follicular oocytes cultured *in vitro*. Jap.J. Zootech.Sci., 49 : 400-405.
 25. Shea, B.F., J.P.A.Latour, K.N.Bedirian and R.D.Baker. 1976. Maturation *in vitro* and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes. J. Anim.Sci., 43 : 809 - 815.
 26. Thebault, C., M.Gerad and Y.Menazo. 1975. Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. J.Reprod. Fert., 45 : 605-610.
 27. Tsafri, A. 1979. Oocyte maturation. In the vertebrate ovary. Plenum Press, New York, p.409-442.
 28. Tsafri, A., S.H.Pomerantz and C.P.Channing. 1976. Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluidipartical characterization of the inhibitor. Biol.Reprod., 14 : 511-516.
 29. Wilde, O., R.Marcolongo, G.Algel and G. Catro. 1984. Effect of oestradiol-17 β and progesterone on the *in vitro* maturation of bovine follicular oocytes. Veterinaria Argentina, 11 : 752-758.
 30. Xu, K.P., T.Greve, H.Callensen and P. Hyttel. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. J.Reprod.Fert., 81 : 501-504.
 31. 鄭英彩, 金昌根, 尹鍾澤, 朴在元. 1986. 家畜의 改良 및 繁殖效率 增進에 관한 研究. III. 過排卵處理 토기에 있어서 卵胞卵의 體外成熟과 受精能力에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌, 10 : 211-217.
 32. 金正翊, 今井裕, 丹羽皓二, 入谷明. 1984. 山羊 卵胞卵의 體外成熟分裂, 韓畜誌, 26 : 435-439.