

체외수정 및 미세조작에 의한 가축(胚)의 생산과 효율적 이용에 관한 연구

II. 소 체외수정 난포란의 발생단계별 동결과 이식후의 생존성

정영채 · 김창근 · 윤종택* · 최선호 · 정광조

중앙대학교 산업대학

Studies on Production and Efficient Utilization of Livestock Embryos by *In Vitro* Fertilization and Micromanipulation.

II. Effects of Embryonic Development on Survival after Freezing and Transfer in Bovine Oocytes Fertilized *In Vitro*

Chung, Y. C., C. K. Kim, J. T. Yoon*, S. H. Choi, K. J. Chung

College of Industrial Studies, Chung-Ang University

SUMMARY

The effects of *in vitro* maturation and sperm treatment condition on the *in vitro* fertilization (IVF) and developmental capacity of bovine oocytes were investigated and the development of embryos was compared under the 2 different co-culture system, with GC or BOEC. The cultured embryo to 16 cell or morula were transferred into recipients or frozen by 2 different freezing method.

The results obtained were summarized as follows :

1. *In vitro* maturation rates of bovine follicular oocytes cultured in TCM199 with 10% FCS or ECS were 64.0% and 72.7%, but the case of addition of 10% FCS or ECS to TCM199 co-cultured with granulosa cells were 81.3% and 84.0%, respectively. IVM rate of these TCM199 added to granulosa cells was higher than that of media without granulosa cells.
2. When bovine follicular oocytes were matured in TCM199 with 10% FCS and GC and then fertilized *in vitro* by sperm treated with caffeine, embryo developments of bovine oocytes co-cultured with BOEC were 38.4% and 51.4%, respectively. But those of bovine oocytes co-cultured with GC were 52.2% by sperm treated with caffeine-heparin.
3. Cleavage rates of bovine oocytes cultured with 10% FCS alone and fertilized *in vitro* by sperm treated with caffeine-heparin was 33.0%.
4. When bovine follicular oocytes were matured in TCM199 with 10% FCS and GC, embryo developments of bovine oocytes co-cultured with BOEC of GC were 46.0% and 50.2%, respectively.

이 논문은 1991년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.

* 안성산업대학교(Ansung National Polytechnical University)

5. When bovine follicular oocytes were matured in TCM199 with 10% ECS and GC, embryo developments co-cultured with BOEC or GC were 45.2% and 51.4%, respectively.
6. When Korean Native cow's follicular oocytes matured in TCM199 with 10% FCS and GC, embryo developments of the bovine oocytes co-cultured with BOEC and GC were 41.8% and 60.1%. But with FCS 10% those of the bovine oocytes co-cultured with BOEC and GC were 42.0% and 48.4%, respectively.
7. When Holstein's follicular oocytes were matured in TCM199 with 10% ECS and GC, embryo developments of the bovine oocytes co-cultured with BOEC and GC were 50.0% and 57.7%, but with ECS 10% those of the bovine oocytes co-cultured with BOEC and GC were 52.2% and 56.5%, respectively.
8. The viability of frozen-thawed embryos ranged from 60~80% and those of frozen-thawed embryos from vitrification was lower than that from conventional method.
9. The selected fresh embryos were transferred nonsurgically to 7 recipients but did not result in pregnancy

I. 서 론

소 난포란을 이용한 체외수정기술은 수정란 이식 분야에서 가장 큰 문제점으로 대두되고 있는 다량의 수정란 확보와 경비 절감뿐만 아니라 첨단 유전공학 기술의 도입수단으로써 가장 적절한 방법으로 생명공학의 동물분야에서 유전자 조작 기술 등의 다양한 기술 개발을 촉진하게 된다. 그러나 아직도 소 난포란의 체외성숙 및 체외수정을 위한 최적조건에 대한 체계가 불분명한 상태이며 해결 해야 할 많은 문제점들이 있다.

현재 미성숙 난포란의 이용율을 증진시키기 위한 방법이 활발히 연구되고 있으며 근년에는 체외성숙 난포란으로부터 송아지가 생산되었다(Hanada 등, 1986; Crister 등, 1986). 그러나 난포란은 체외수정 후 체외배양시 8~16 세포기에 발생이 정지하는 cell block 현상이 나타나며(Camous, 1984), 초기 배의 발생능이 체내성숙난자보다 낮기 때문에(Leibfried-Rutledge 등, 1987), 소의 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정 그리고 이식으로 산자를 얻기 위한 성숙배양의 과정, 혈청첨가, 정자처리 방법 또는 초기배의 배양 방법 등 여러 가지 방법이 제시되어 많은 개선이 이루어졌으며 또한 미성숙

난포란을 체세포와의 공배양하여 체외성숙시킨 후 체외수정한 배반포기 배를 이식하여 산자를 생산하여(Goto 등, 1988, 1989; Lu 등, 1988; Eyestone과 First, 1989; Fukuda 등, 1990, Kajihara 등, 1990, 1991), 매우 바람직한 결과를 얻고 있으나 그 방법의 재현성과 결과에 큰 차이를 나타내고 있다.

결국 난포란의 이용을 실용화 하기 위해서는 난포란의 체외성숙, 수정 그리고 수정란의 체외 발육 과정이 정착되어야 하며 난포란의 생산 이용효율을 더욱 증대시키기 위해서 이들 난자나 수정란을 동결보존하는 기술도 함께 개발되어야만 한다.

따라서 본 연구는 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정, 발생시키는 체외수정 체계를 개발하고 vitrification에 의한 수정란의 동결보존 방법을 개발하는데 일차적 목적이 있으며, 소의 체외성숙, 체외 수정 및 체외배양으로 생산된 수정란을 이식하여 산자를 생산하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시 난자와 정액

공시 난자는 축협가락동 도축장에서 도살되는 한우와 홀스타인 중에서 정상적인 생식기를 가진 개체의 난소에서 채란하였으며 공시정액은 축협한우

개량사업소에서 제조된 한우 동결정액을 사용하였다.

2. 난포란의 채란

난포란의 채란은 도살 직후 분리 채취된 난소를 멸균생리식염수로 2~3회 세척한 후 항생제와 생리식염수가 들어있는 보온병(35℃)에 담아 38℃ 항온실로 운반하여 생리식염수로 3회 세척하고 10ml 주사기와 20케이지 주사침을 직경 2~6mm의 정상 난포로부터 난소 실질을 천자하여 난포액과 동시에 연속흡입 채취하여 채란하였다. 난포란은 실제현미경하에서 난구세포층이 치밀하고 세포질이 양호한 난포란만을 선별 이용하였다.

3. 난포란의 체외성숙배양과 성숙 판정

난포란의 체외성숙배양은 TCM199(380-2340, Gibco)를 사용하여 fetal calf serum(FCS:240-1555, Gibco)과 estrus cow serum(ECS:발정당일혈청)을 56℃에서 30분간 비등화시켜 각각 10%를 첨가하였고 gentamycin(국제약품) 50mg/ml을 첨가하여 CO₂ 배양기에서 4~5시간 평형후 4-well dish(Nunclon)에 0.5ml씩 분주하여 각 well당 10~15개의 난포란을 임의배치하여 39℃, 5% CO₂, 95% 공기, 100% 습도인 배양기에서 24~25시간 체외배양을 실시하였다.

난포란을 체외성숙시키기 위한 과립막세포와의 공배양에서는 Racowsky와 Mcgaughey(1982)의 방법에 따라 과립막세포수를 1×10^6 /ml로 조정하여 사용하였다.

난포란의 체외성숙 판정은 배양된 난포란을 0.3% hyaluronidase로 5분간 처리하여 난구세포를 제거하고 acetic-alcohol고정액(1:3)으로 고정하여 1% acetic orcein으로 염색하고 위상차현미경하에서 Shea 등(1976), Iritani 등(1984), Ball 등(1984)의 방법에 따라 metaphase II에 도달된 난자를 성숙난자로 판정하였다.

4. 정자처리와 체외수정

정자의 체외수정능 회복은 서로 다른 2개체의 한우 동결정액 straw를 용해 혼합하여 caffeine(Ohgoda 등, 1988)과 caffeine-heparin(Niwa와

Ohgoda, 1988)을 첨가하고 39℃, 5% CO₂, 95% 공기, 100% 습도의 CO₂ 배양기에서 1시간 동안 전배양하여 유키하였다. Caffeine과 heparin의 최종농도를 각각 5mM과 10 μg/ml되게 하였고 정자수는 1.0×10^6 /ml 생존정자수로 하여 petri-dish에 0.1ml씩 소적을 만든 후 멸균 paraffin oil로 피복하고 성숙된 난포란을 10~15개씩 넣고 39℃, 5% CO₂, 95% 공기, 100% 습도의 CO₂ 배양기에서 18시간동안 체외수정을 실시하였다.

5. 체외수정란의 체외배양

1) 과립막세포와의 공배양

체외수정란의 체외발생을 위한 과립막세포의 준비는 체외성숙 배양시와 같은 방법으로 과립막세포를 분리하여 세포수를 1×10^6 /ml로 조정된 다음 4well-dish에 0.5ml씩 분주하여 48시간 배양시켜 과립막 단층세포층을 형성시킨 후 공배양을 실시하였으며 매 48시간마다 신선배양액으로 배양액의 1/2씩 교환하였고 체외수정 후 18시간된 난포란을 144시간 공배양하여 배발생 상태를 조사하였다.

2) 난관 상피세포와의 공배양

난관 상피세포의 준비는 Gandolfi와 Moor(1987)의 방법에 따라 난관을 TCM199 2ml로 관류하여 원심분리하여 상층액을 제거하였으며 이 과정을 2~3회 반복한후 Antibiotic-Antimycotic(Gibco)을 ml당 0.02ml 첨가하여 39℃, CO₂ 5%, 95% 공기, 100% 습도인 CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였으며 매 48시간마다 신선배양액으로 1/2씩 첨가 교환하였다. 체외수정후 18시간된 난포란을 난관상피세포 단층세포층과 함께 144시간 배양하여 배발생 상태를 관찰하였다.

6. 체외수정란의 동결과 생사 판정

체외배양된 16세포기와 상실배 수정란을 Lehn-Jensen(1984)의 동결기 이용법과 Massip 등(1987)의 vitrification 방법에 따라 동결하였다.

동결용해란의 생사 판정은 Schilling 등(1982)의 방법에 따라 FDA 검사로 실시하였다. FDA 염색액은 acetone 1ml에 5mg의 FDA를 녹여 stock solution을 만든 후 필요할 때마다 mPBS에 FDA 최종

농도가 2.5 µg/ml 되게 조정한 후 사용하였다.

7. 수정란의 이식

정상 발정주기를 보인 미경산우를 선정하여 자연 발정주기 5~6일에 맞추어 16세포기 또는 상실배기의 수정란을 0.25 straw에 장진하여 비와과적인 방법으로 1~2개를 자궁에 이식하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 난포란의 체외성숙

난포란을 성숙배양액 TCM 199에 FCS나 ECS를 각 10% 첨가하고 과립막세포와 공배양하였을 때 난포란의 체외성숙율은 Table 1과 같다.

FCS 10%만 첨가된 배양액에서 난포란의 체외성숙율은 64.0%이었고 FCS 10%와 과립막세포와의 공배양한 결과는 81.3%이었다. ECS 10%만 첨가된 배양액에서의 체외성숙율은 72.7%이었으며, ECS 10%와 과립막세포와의 공배양한 결과는 84.0%이었다.

혈청만을 첨가하여 난포란을 체외성숙시켰을 때 FCS와 ECS에서 각각 64.0%와 72.7%로 FCS보다는 ECS첨가에서 다소 높은 경향이 있었으며 혈청과 과립막세포와 공배양할 때는 81.3%와 84.0%로 큰 차이는 없었으나 ECS첨가와 과립막세포와 공배양하였을 때 다소 높은 경향이 있었다. 난포란의 체외성숙은 혈청만을 첨가하여 체외배양하였을 때보다는 과립막세포와 공배양하였을 때 향상되었다. 그러나 혈청과 과립막세포와 공배양하여 체외성숙시켰을 때는 혈청첨가간의 체외성숙율은 큰 차이를 보이지 않았다.

이와 같은 결과는 Ball 등(1983)이 과립막세포는 난포란의 성숙과정에 필수적인 존재로 난구세포 팽

화에 유익하며 성숙을 및 수정율을 향상시킨다는 결과와 유사하였으며 혈청첨가에서 ECS첨가로 체외성숙율이 향상되었다는 Sanbuisso와 Threlfall (1985), Lu 등(1987), Xu 등(1987), 김 등(1990), 윤(1990), 정 등(1990)의 보고와 같은 결과였으나, Younis 등(1989)의 89%, Lu 등(1987)의 90% 체외성숙율 보다는 낮은 체외성숙율을 나타내었다.

FCS를 첨가하고 난포란을 체외성숙시켰을 때는 64.0%로 Fukui와 Ono(1989)가 61.3%, Xu 등(1986)는 79%, 윤(1990)은 66.7%로 비슷한 결과를 나타내었으나, Goto 등(1989)은 90%, Sirard 등(1988)은 87~99%, Kajihara 등(1989)의 92.9~95.9%보다는 낮은 결과이었다.

혈청 및 과립막세포와 공배양한 분 실험에서 얻은 체외성숙율은 Crister 등(1989)의 82.9%와는 유사한 결과이었으나 Fukui(1989)가 ECS 및 과립막세포와의 공배양에서 70.9%의 체외성숙율을 나타내어 본 실험의 결과보다 낮았으며 Fukui와 Ono (1989)는 FCS와 과립막세포와의 공배양에서 71.3%, ECS와 과립막세포와는 66.7%로 오히려 ECS에서 낮은 체외성숙율을 나타내어 본 실험의 결과보다 낮은 성적이면서도 다른 경향을 나타내었다.

본 실험에서 난포란의 체외성숙율은 FCS 보다는 ECS 첨가에서 체외성숙율이 다소 증가하는 경향이 있었으나 과립막세포와 공배양하였을 때 체외성숙율의 향상율이 더 큰 것으로 보아 난포란의 체외성숙에서 과립막세포와의 공배양은 매우 유효한 방법으로 생각되었다.

2. 정자처리에 따른 난포란의 발생율

TCM199에 10% FCS와 과립막세포와 공배양하여 체외성숙시킨 난포란을 정자처리와 초기배 배양 방법에 따른 체외수정란의 발생율은 Table 2와 같

Table 1. In vitro maturation of oocytes cultured in TCM199 with FCS or ECS

| Maturation medium | No. of oocytes | | Maturation rate(%) |
|-------------------|----------------|---------|--------------------|
| | Examined | Matured | |
| 10% FCS | 50 | 32 | 64.0 |
| 10% FCS+GC | 59 | 48 | 81.3 |
| 10% ECS | 44 | 32 | 72.7 |
| 10% ECS+GC | 50 | 42 | 84.0 |

Table 2. Effect of sperm treatment on *in vitro* development rate of embryos

| Sperm treatment | Maturation medium(TCM) | Coculture | No of oocytes | | |
|--------------------|------------------------|-----------|---------------|----------|----------|
| | | | Cultured | Cleaved | Morula |
| Caffeine | 10% FCS | BOEC | 169 | 65(38.4) | 13(7.7) |
| | +GC | GC | 173 | 89(51.4) | 33(19.1) |
| Caffeine + heparin | +10% FCS | BOEC | 176 | 75(42.6) | 25(14.2) |
| | +GC | GC | 107 | 56(52.2) | 27(25.2) |

다.

Caffeine으로 단독처리하여 난관상피세포와 공배양하였을 때 배발생율은 38.4%이었고 과립막세포와 공배양하였을 때는 51.4%이었다.

Caffeine과 heparin을 병용처리하여 난관상피세포와 공배양하였을 때 배발생율은 42.6%이었고 과립막세포와 공배양하였을 때는 52.2%이었다.

본 실험에서 caffeine-heparin 병용처리하여 얻은 결과는 Kajihara 등(1991)의 36.1~55.5%의 난할율과, Takada 등(1991)의 43.3~59.6%의 난할율보다는 낮은 성적이었으나 윤(1990), 정 등(1990)의 성적과는 비슷하였다. 또한 본 실험에서 caffeine 단독처리와 caffeine-heparin 병용처리에서 난할율이 차이가 없었던 것은 Niwa와 Ohgoda(1988), Park 등(1989)이 caffeine과 heparin 병용처리하였을 때 또는 Aogagi 등(1988)이 caffeine-Ca ionophore 처리에서 수정율이 상승되었다는 보고와는 다른 결과이었다.

정자처리에 따른 배발생율은 caffeine과 heparin을 병용처리하였을 때가 약간 높은 경향이었으나 큰 차이가 없었으며 상실배로의 배발생율도 양처리

구간에 차이가 없었으나 caffeine과 heparin 병용처리구가 약간 높은 경향을 나타내었다.

본 연구에서는 caffeine과 heparin 병용처리로 정자의 수정능획득을 유지하였다.

3. 체외수정 난포란의 발생능

TCM199 성숙배양액에 혈청(FCS, ECS)을 첨가하여 과립막세포와의 공배양하여 체외성숙시킨 난포란을 체외수정하여 초기배 배양에 따른 체외수정란의 발생능은 Table 3과 같다.

TCM 199 배양액에 FCS 10%만을 첨가하여 체외성숙시키고 체외수정한 후 TCM 199에 FCS 10%만으로 체외배양하였을때 난포란의 발생율은 33.0%이었다.

TCM199 배양액에 FCS10%와 과립막세포와 공배양하여 체외성숙시킨 난포란을 체외수정후 난관상피세포와 공배양하여 체외배양하였을 때 발생율은 46.0%이었고 과립막세포와 공배양하여 체외배양하였을 때는 50.2%이었다.

TCM 199 배양액에 FCS 10%와 과립막세포와 공배양한 체외성숙난포란을 체외수정시켜 난관상

Table 3. Developmental capacity of *in vitro* fertilized embryos

| Maturation medium(TCM) | Culture system | No. of oocytes | | |
|------------------------|----------------|----------------|------------|----------|
| | | Cultured | Cleaved(%) | Morula |
| 10%FCS | 10%FCS | 156 | 36(33.0) | 9(5.7) |
| | BOEC | 189 | 87(46.0) | 17(9.0) |
| 10%FCS +GC | GC | 201 | 101(50.2) | 24(11.9) |
| | BOEC | 115 | 52(45.2) | 13(11.3) |
| 10%ECS +GC | GC | 103 | 53(51.4) | 21(20.4) |

피세포와 공배양하여 체외배양하였을 때 발생율은 45.2%이었으며 과립막세포와 공배양하여 체외배양하였을 때는 51.4%이었다.

TCM 199에 10% FCS만으로 체외성숙시켜 체외 발생할 경우는 체외배양시 난관상피세포나 과립막세포와 공배양하여 체외배양할 때보다 매우 낮은 결과를 보이고 있으며 특히 상실배로의 발달이 매우 낮았다. 이처럼 난포란을 FCS만으로 체외배양할 경우에 배발생율이 매우 낮지만 체세포와 공배양할 때는 첨가 혈청간 차이가 없었다.

이와 같은 결과는 Crister 등(1986)이 난포란을 과립막세포와 공배양할 때 성숙율이나 수정율에는 큰 영향을 미치지 않으나 상실배 및 배반포기는 과립막세포와의 공배양에서만 이루어졌다고 한 보고와 같은 결과였으며 Lu 등(1989), Xu 등(1987), Fukui와 Ono(1988)의 결과와 비슷한 결과를 나타내었고 Sanbuisso와 Threlfall(1985)이 ECS가 체외수정율을 향상시킨다고 한 결과와 일치하였으나 Fukui와 Ono가 FCS가 양호하다고 한 결과와는 상이하였다.

체외수정란을 체세포와 공배양할 때에 상실배 이상으로 발생이 증진된다는 보고는 많이 있으나 배반포에로의 발육촉진효과 원인은 아직 잘 알려져 있지 않다. 체세포와 공배양할 때 난포란의 발생능

증진은 Eystone과 First(1989)는 배발생시 발생억제 물질을 제거한다고 하였고 Gandolfi와 Moor(1989)는 분비물질이 배발생 촉진한다고 하였으며, Bavister(1988) 등은 배발생에 필요한 인자를 생산한다고 하였고, Rexroad(1989)는 미지성분이 배발생을 증진시킨다고 하였다.

Lu 등(1988)은 난관상피세포와의 공배양은 체외성숙과 체외수정후 배발생에 적절한 환경을 제공하여 이식후 산자를 얻을 수 있다고 하여 난포란의 체외배양에는 체세포와의 공배양이 매우 유효한 방법임을 알 수 있었다.

4. 품종별 체외수정란의 발생능

한우와 홀스타인종의 난포란을 이용하여 체외성숙 배양액에 FCS나 ECS 10%를 첨가하고 과립막세포와 공배양하여 체외성숙시킨 후 체외수정하여 난관상피나 과립막세포와 공배양한 결과는 Table 4와 같다.

한우난포란은 FCS 10%와 과립막세포와 체외성숙시킨 후 난관상피세포와 공배양하여 체외배양하였을 때 배발생율은 42.0%이었고 과립막세포와 공배양하여 체외배양하였을 때 48.4%이었다.

ECS 10% 및 과립막세포와 체외성숙시킨 후 난관상피세포와 공배양하여 체외배양하였을 때 발생율은 41.8%이었고 과립막세포와의 공배양하여 체

Table 4. Developmental capacity of Korean Native Cow and Holstein embryos fertilized *in vitro*

| Breed | Maturation medium(TCM) | Co-culture | No. of oocytes | | |
|----------|------------------------|------------|----------------|----------|----------|
| | | | Cultured | Cleaved | Morula |
| KNC | 10% FCS | BOEC | 176 | 74(42.0) | 18(10.2) |
| | | +GC | GC | 132 | 64(48.4) |
| | 10% ECS | BOEC | 122 | 51(41.8) | 12(9.8) |
| | | +GC | GC | 153 | 92(60.1) |
| | 10% FCS | BOEC | 113 | 59(52.2) | 21(18.5) |
| | | +GC | GC | 112 | 69(56.5) |
| Holstein | 10% ECS | BOEC | 114 | 57(50.0) | 15(13.2) |
| | | +GC | GC | 149 | 41(57.7) |

외 배양하였을 때는 60.1%이었다.

ECS 첨가에서 체외성숙된 한우 난포란의 체외발생율이 다소 높은 경향이었으나 각 처리구간에 큰 차이가 없었으며 난관상피세포나 과립막세포와의 공배양에서 체외배양하였을 때 배발생율도 과립막세포와 공배양하여 체외배양한 경우가 약간 높은 경향이였다.

홀스타인종 난포란은 FCS 10%와 과립막세포와 체외성숙시킨 후 난관 상피세포와 공배양하여 체외 배양하였을 때 배발생율은 42.2%이었고 과립막세포와 공배양하여 체외배양하였을 때 56.5%이었다.

ECS 10% 및 과립막세포와 체외성숙시킨 후 난관 상피세포와 공배양하여 체외배양하였을 때 발생율은 50.0%이었고 과립막세포와의 공배양하여 체외배양하였을 때는 57.7%이었다.

이와 같이 홀스타인종에서도 한우와 같은 경향을 나타내었고 상실배까지의 발생율도 한우나 홀스타인종에서 별 차이가 없었으며 첨가된 혈청이나 체세포와의 공배양에서도 차이가 없었다. 그러나 한우 난포란과 비교하여 볼 때 전체적으로 홀스타인종 난포란이 체외발생율이 약간 높은 경향이였다. 이와 같은 결과는 Kajihara 등(1987)이 보고한 바와 같이 본 실험에서 체외수정에 사용된 정자가 한우동결정자로 홀스타인종에서 채란된 난포란은 교잡종 배가 되기 때문에 체외발생율이 높은 것이

아닌가 생각되어진다.

5. 체외수정란의 동결

난포란으로 부터 체외 배양하여 얻은 16세포기 또는 상실배를 vitrification과 conventional 한 방법으로 동결 용해한 다음 FDA 검사로 생존성을 알아본 결과는 Table 5와 같다.

체외수정란의 동결용해후의 생존성은 60~80%로 동결기를 이용한 동결법이나 vitrification에 의한 동결법 모두에서 동결 가능성을 나타내었다. 체외수정란의 동결 송아지가 생산된 예가 있으며 자연배란 체내 수정란에서 이미 vitrification 동결 방법이 성공하였기 때문에 난포란을 체외수정한 후 vitrification 동결에 의하여 얻어진 본 실험 결과에서도 체외수정란의 동결 가능성을 시사하였다.

6. 수정란의 이식

정상 발정주기를 갖는 한우와 홀스타인종 미경산우 7두를 선발하여 체외배양된 수정란을 비외과적으로 이식한 결과는 Table 6과 같다.

체외배양 방법에 상관없이 이식된 7두 모두에서 임신에 성공하지 못하였고 다만 이식 후 정상 발정주기를 넘긴 개체가 3두 있었다. 그러나 이들의 원인이 배사멸 또는 임신중지에 의한 것인지 확인할 수는 없었다. 체외수정란의 이식에 있어서 임신 실패

Table 5. Viability of frozen-thawed 16-cell and morulae stage embryos

| Method | | No. of embryo | |
|----------|-------------|---------------|-------------|
| Freezing | Development | Evaluated | Survived(%) |
| A | BOEC | 18 | 12(66.7) |
| | GC | 15 | 9(60.0) |
| B | BOEC | 15 | 12(80.0) |
| | GC | 20 | 15(75.0) |

A : Vitrification B : Conventional

Table 6. Result in non-surgical transfer of IVF embryos

| Culture method | No. of recipients | Pregnancy | Extended eEstrus |
|----------------|-------------------|-----------|------------------|
| A | 3 | - | 1 |
| B | 4 | - | 2 |

A : matured in TCM 199 + 10% ECS + GC and culture in TCM 199 + BOEC

B : matured in TCM 199 + 10% ECS + GC and culture in TCM 199 + GC

패의 원인은 이식되는 체외수정란의 질적인 평가문제와 수란우의 선발 및 발정동기화 문제에 그 원인이 있다고 생각되었다.

IV. 적 요

본 연구는 미성숙난포란을 체외성숙 후 체외수정하여 cell block stage를 극복하고 배를 발생시켜 수정란이식에 의하여 송아지를 생산할 수 있는 체외수정 체계를 확립하기 위하여 소 미성숙 난포란을 혈청과 과립막세포를 첨가하여 체외성숙후 체외수정하여 초기배 발생능 및 동결융해 후의 생존성을 살펴보고 체외수정란을 이식하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. TCM 199 성숙배양액에 FCS와 ECS 10%만을 첨가하였을 때 난포란의 체외성숙율은 64.0%와 72.7%이었으나 FCS와 ECS 10%를 첨가하고 과립막세포와 공배양하였을 때는 81.3%와 84.0%로 체외성숙율이 향상되었다.
2. TCM 199 성숙배양액에 10% FCS 및 과립막세포와 체외성숙시킨 난포란을 caffeine 처리된 정자와 체외수정하여 난관상피세포와 공배양하였을 때 배발생율은 38.4%이었고 과립막세포와 체외배양하였을 때는 51.4%이었다. Caffeine-heparin 처리된 정자와 체외수정하여 난관상피세포와 공배양하였을 때 배발생율은 42.6%이었고 과립막세포와 체외배양하였을 때 52.2%이었다.
3. TCM199 성숙배양액에 10% FCS만을 첨가하여 체외배양하였을 때 난포란의 발생율은 33.0%이었다.
4. 10% FCS 및 과립막세포와 공배양하여 체외성숙 시킨 후 체외수정한 다음 난관상피세포와 공배양하였을 때 배발생율은 46.0%이었고 과립막세포와 체외배양하였을 때는 50.2%이었다.
5. TCM199 성숙배양액에 10% ECS만을 첨가하여 과립막세포와 공배양하여 체외수정한 다음 난관상피세포와 공배양하였을 때 배발생율은 45.2%이었고 과립막세포와 체외배양하였을 때는 51.4%이었다.
6. 10% ECS 및 과립막세포와 공배양하여 체외성숙시킨 한우 난포란의 배발생율은 난관 상피세포와 공배양하였을 때 41.8%이었고 과립막세포와 체외배양하였을 때는 60.1%이었다. 한편 FCS 10% 및 과립막세포와 공배양하여 체외성숙시킨 후 난관 상피세포와 공배양하였을 때 배발생율은 42.0%이었고 과립막세포와 체외배양하였을 때는 48.4%이었다.
7. 10% ECS 및 과립막세포와 공배양하여 체외성숙시킨 홀스타인 소 난포란의 체외 배발생율은 난관 상피세포와 공배양하였을 때 50.0%이었고, 과립막세포와 체외배양하였을 때 57.7%이었다. 한편 FCS 10% 및 과립막세포와 공배양하여 체외성숙시킨 후 난관 상피세포와 공배양하였을 때의 배발생율은 52.2%이었고 과립막세포와 체외배양하였을 때는 56.5%이었다.
8. 체외수정란의 동결융해후 생존율은 60~80%이었다.
9. 체외수정란 이식에서 수태에는 이르지 못하였으나 3 에서 정상 발정주기를 넘겨 수태의 가능성을 나타내었다.

V. 인용문헌

1. Aoyagi, Y., K. Fuji, Y. Iwazumi, M. Furudate, Y. Fukui and H. Ono. 1988. Effects of two treatments on semen from different bulls on *in vitro* fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology* 30:973-985.
2. 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. 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.
4. Bavister, B. D. 1988. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and

- in vitro*. Theriogenology 29:143-154.
5. Crister, E. S., M. L. Leibfried-Rutledge, W. H. Eyestone, D. L. Northey and N. L. First. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. Theriogenology 25:150
 6. Eyestone, W. H. and N. L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviduct tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert. 85: 715-720.
 7. Fukuda, Y., M. Ichikawa, K. Naito and Y. Toyoda. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. Biol. Reprod. 42: 114-119.
 8. Fukui, Y. 1989. Effects of sera and steroid hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviduct epithelial cells. J. Anim. Sci. 67:1318.
 9. Fukui, Y. and H. Ono. 1989. Effect of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Reprod. Fert. 86:501-506.
 10. 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
 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. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 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.
 13. Hanada, A., Y. Shioya and T. Suzuki. 1986. Birth of calves from nonsurgical transfer of blastocysts originated from *in vitro* fertilized oocytes matured *in vitro*. 78th Annu. Meet, Jpn Soc. Zootech. Sci. 1:18.
 13. Iritani, A., M. Kasai, K. Niwa and H. 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 K. Ogawa. 1987. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocyte and their development up to hatched blastocysts *in vitro*. Jpn. J. Anim. Reprod. 33:173-180.
 16. Kajihara, Y., N. Kometani, S. Kobayashi, Y. Shitanaka and K. Goto. 1991. Pregnancy by bovine blastocysts developed in co-culture with cumulus cells/uterine endometrial cells after *in vitro* fertilization. Jpn. J. Anim. Reprod. 37:177-184.
 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.
 18. 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* and *in vivo*. Biol. Reprod. 36:376-383.
 19. Lehn-Jensen, H. 1984. Deep freezing of cattle embryo. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I. Vol. IV. II. 1-12.
 20. Lu, K. H., I. Gordon, H. B. Chen, M. Gallagher and H. McGovern. 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. Vet. Rec. 122:539-540.
 21. Lu, K. H., I. Gordon, M. Gallagher and H.

- McGovern. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *Vet. Rec.* 121:259-260.
22. Massip, A. P., Van Der Zwalman and F. Ectors. 1987. Progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 27:69-79.
 23. 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.
 24. Ohgoda, O., K. Niwa, M. Yuhara, S. Takahashi and K. Kanoya. 1988. Variations in penetration rates *in vitro* of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. *Theriogenology* 29:1375-1381.
 25. Park, C. K., O. Ohgoda and K. Niwa. 1989. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *J. Reprod. Fert.* 86:582.
 26. Racowsky, C. and R. W. McGaughey. 1982. Further studies of the effects of follicular fluid and membran granulosa cells on spontaneous maturation of pig oocytes. *J. Reprod. Fert.* 66:505-512
 27. Rexroad, C. E. Jr. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology* 29:387-397.
 28. 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.
 29. 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 esturs cow serum. *Theriogenology* 33:477-485.
 30. 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.* 43:809-811.
 31. Shilling, E., H Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorecence microscopy, *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, Ed. E. S. E. Hafez and K. Semm, MTP Press, Lancaster, England, pp. 349-355.
 32. Sirard, M. A., J. J. Parrish, C. B. Ware, M. L. Leibfried Rutledge and N. L. First. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.* 39:546-552.
 33. Takada, N., A. Tsukamoto, Y. Kurokawa and Y. Shioya. 1991. Effect of cumulus cells on the development of bovine oocytes matured fertilized *in vitro*. *Jpn. J. Reprod.* 37:9-13.
 34. Xu, K. P., T. Greve, H. Callesen and P. Hyttel. 1987. Pregnancy rates following transfer of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and co-culture. *Theriogenology.* 33:351.
 35. Younis, A. I., B. G. Brackett and R. A. Fayrer Hosken. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Reserch* 23:189-201.
 36. 김창근, 정영채, 윤종택, 최선호, 류범룡, 정광조, 김홍률, 송해범. 1990. 소의 체외성숙 난포란의 체외수정과 발생에 관한 연구. *한국축산학회지* 32:27-36.
 37. 윤종택, 1990. 소 난포란의 체외수정에 있어서 발생능과 미세구조 및 단백질상에 관한 연구. *중앙대학교 대학원 박사학위논문*
 38. 정영채, 김창근, 류범룡, 윤종택, 김형태, 이규승. 1990. 가축의 개량 및 번식 효율 증진에 관한 연구. VI 소에 있어서 체외수정 난포란의 발생능 향상에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 14:73-83