

## 돼지 난포란의 형태와 배양시간이 체외성숙 및 수정란의 배발생능에 미치는 영향

이장희 · 김창근 · 정영채  
중앙대학교

### Effect of Type and Culture Time of Porcine Oocytes on *In Vitro* Maturation and Developmental Potential of Embryos

J. H. Lee, C. K. Kim and Y. C. Chung

College of Industrial Studies, Chung-Ang University

#### SUMMARY

The objective of this study was to develop an effective *in vitro* production system capable of obtaining more porcine embryos from immature oocytes. These experiments were thus conducted to examine the effect of oocytes type and maturation time on the *in vitro* maturation(IVM) and fertilization(IVF) of oocytes and the *in vitro* development (IVD) of IVF embryos.

1. The degree of oocyte maturation based on cumulus expansion index(CEI) did not differ for A- and B-typed oocytes but the index of oocyte type C was lower( $P < 0.05$ ) than that of other oocyte types.
2. When the oocytes of type A and B were matured for 36, 42 and 48hrs, the CEI was not different between the 36- and 42-h maturation but the CEI after 48hrs was greatly lower( $P < 0.05$ ) than that of other maturation times.
3. The highest cleavage rate(48.6%) of IVF oocytes was obtained from A typed oocytes and 42-h maturation but the developmental potential based on cleavage index was the highest when B-typed oocytes were matured for 42hrs.

#### 서론

난포로부터 분리된 난포란은 체외의 적정조건에서 배양될 때 자발적으로 성숙이 재개될 수 있으나 세포질의 완전한 성숙에는 이르지 못하는 것으로 보고되었으며(Ball, 1983), 한편 체외성숙난포란의 배발생이 배란난자보다 훨씬 낮게 보고되어 있다(Leibfried-Rutledge 등, 1987; Nagashima 등, 1993).

돼지에서 난포란의 체외성숙은 Edwards(1962)가 처음으로 보고한 이래, Leman과 Dziuk(1971),

Motlik과 Kubelka(1974), Eng 등(1986), Prochazka 등(1992)에 의하여 많은 연구가 행해져 왔다. 돼지난포란의 체외성숙 및 배발생능에 영향을 미치는 요인으로서 체란 난포의 크기, 난포란의 형태 및 배양시간이 고려되어 왔다. 이들 요인중 Wu 등(1992)은 난포란의 난구세포층 두께에 따라 체외성숙율이 다르다고 하였고, Yoshida 등(1989)과 Byun 등(1991)은 성숙배양후 난구세포의 팽화정도가 핵성숙과 밀접한 관계가 있다고 하였으며 Prochazka 등(1992)은 40~42시간의 체외성숙에서 91~92%의 난포란이 metaphase II에 도달됨을 보고하였다. Sato와 Ishibashi(1977)는 난구세포의

존재유무에 따라 성숙을 또는 정자침입율이 차이가 있으며 난구세포의 존재하에서 정자침입율이 높다고 하였다. 특히 Kikuchi 등(1993)은 난자의 형태가 수정율에 영향을 미친다고 하였다. 그러나 Hunter(1991)는 배양시간이 길어지면 난자의 노화로 인해 다정자침입율이 높아진다고 하였다.

난포란의 배양시간이 수정후 배발생에 미치는 영향을 보면 Hagen 등(1991), Mattioli 등(1989) 및 Naito 등(1989)은 40~44시간 및 48시간 체외성숙에서 높은 난할율을 얻었고 최근 Wang 등(1992)이 32~36시간 성숙에서 높은 난할율을 얻음으로서 체외성숙 배양시간이 다소 짧아지는 경향에 있다. 한편 Mattioli 등(1989)은 채란된 난포란의 난포크기에 따라 체외수정후 배발생의 차이가 있음을 보고 하였으며 Galeati 등(1991)과 Hawk 등(1992)은 수정시 난구세포의 유무에 따라 발생율이 다르다고 하였다.

따라서 본 실험은 수정란의 체외생산기술에서 가장 기본적인 난포란의 형태와 배양시간이 돼지 난포란의 체외성숙 및 체외수정후 배발생에 미치는 영향을 조사하여 실용적인 체외성숙난자의 생산기반을 마련하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시난자와 채란

본 실험에 사용된 난포란은 도축장에서 도살직후 난포기의 난소로부터 얻어졌다. 도살직후 분리해 낸 난소는 항생제(황산스트렙토마이신 0.5mg, 페니실린 100만 IU/l)가 첨가된 생리식염수로 2~3회 세척한 후 33~35℃의 보온병에 넣어 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난포내 난자를 채란하기 위해 항온실에서 신선한 생리식염수로 난소표면을 3~4회 세척한 후 19-gauge 10ml 주사기로 2~5mm 크기의 정상난포에서 난소실질을 연속적으로 찢어 난포액과 함께 난포란을 흡입하여 채란하였다. 흡입된 난포액을 10ml 시험관에 담아 5분간 정지시킨 후 스포이드로 하부액을 흡입하여 배양접시에 성숙배양액과 적당히 혼합하고 inverted

microscope(Olympus SZ-PT, Japan)하에서 난구세포층이 충분한 정도에 따라 난자-난구세포 complex를 A, B 및 C형으로 선별하여 공시하였다.

### 2. 난포란의 체외성숙배양액

기본배양액 TCM 199 Earl's salt에 Yoshida 등(1990, 1992)의 방법에 따라 sodium pyruvate(100mg/l), glucose(550mg/l), dibekacin sulphate(100mg/l, Sigma, USA), 10%(v/v) pFF(pig follicular fluid), 10% FCS(fetal calf serum) 및 estradiol-17 $\beta$ (1 $\mu$ g/ml, Sigma, USA)를 첨가하였고, 호르몬은 hCG(10IU/ml, Chorulon, Intervet Co., Holland) 및 PMSG(10IU/ml, Folligon, Intervet Co., Holland)를 첨가하였으며 micromilipore filter(0.2 $\mu$ m)로 여과시킨 후 39℃, 100% 습도, 95% air, 5% CO<sub>2</sub> incubator(Model No. 2300, Sheldon, USA)에서 12시간 전배양시킨 후 pH 7.4로 조정하여 사용하였다.

pFF의 준비는 난포란채란시 회수한 난포액을 3,000 rpm에서 30분동안 상온에서 원심분리한 후 상층액을 취하여 micromilipore filter로 여과시킨 다음 적당량 분주하여 -20℃에서 보관 사용하였다. FCS 준비는 Gibco社 제품을 구입하여 56℃에서 30분간 비동화시킨 후 적당량 분주하여 -20℃에서 보관 사용하였다.

### 3. 난포란의 체외성숙 및 성숙판정

체외성숙은 Yoshida 등(1990, 1992)의 방법에 따라 성숙배양액을 4-well dish(Cat. No. 176740, Nunclon, Denmark)에 0.5ml씩 분주한 후 난구세포의 부착정도에 따라 난포란을 well당 10~30개씩 넣고 멸균 파라핀 오일로 피복한 후 39℃, 100% 습도, 95% air, 5% CO<sub>2</sub>, incubator에서 36~48시간 배양하였다.

체외성숙판정은 Fagbohun 과 Downs(1990) 및 Fenton 등(1993)의 방법에서 등급기준을 다소 수정하여 난구세포의 팽화 정도를 3가지 형태로 분류한 후 3가지 등급(1, 2 및 3)에 따라 성숙정도를 index로 표시하였다. 이때 등급 1을 가진 난포란은

난구세포의 팽화정도가 30% 이하인 난포란이며, 등급 3은 난구세포가 70% 이상 팽화된 난포란으로 하였다.

#### 4. 정자준비

도축장에서 도살직 후 2~3개체의 한쪽 정소로부터 수집한 정소상체미부를 4℃ 정도의 보온병에 보관하여 2시간 이내 실험실로 운반하였다. 운반된 정소상체미부는 생리식염수로 2~3회 세척후 Niwa 등(1988)의 방법에 따라 정소상체미부의 표피를 절개하고 한가닥의 cauda tubule을 자른 다음 정소상체미부에 연결된 정관의 선단을 forcep으로 막아 역류를 방지한 후 10ml 주사기 -26 gauge 주사침으로 정관쪽에서 공기압력을 가해 농후정자를 채취하였다. 개체별로 채취된 정자는 정장내 수정능 억제물질을 제거하기 위해 수정기본배양액으로 5~10배 희석하고 300 × g에서 10분간 2회 반복 원심분리하였다.

#### 5. 체외수정

##### 1) 체외수정 기본 배양액

Yoshida 등(1990)의 방법에 따라 TCM 199 Earl's salt 용액에 sodium pyruvate(0.1mg/ml), glucose(0.55mg/ml), calcium lactate(0.9mg/ml), dibekacin sulphate(0.1mg/ml), BSA(10mg/ml), FCS 10%(v/v)를 첨가한후 micro-milipore filter(0.2um)에 여과시키고 pH 7.8 로 조정된 다음 4-well dish에 각 well당 0.5ml씩 분주한 후 12시간 전배양시켰다.

##### 2) 정자의 전처리

세정된 정소상체미부정자를 caffeine(2mM)이 들어있는 수정 배양액으로 재부유하여 원심분리후 양호한 활력을 갖는 정자를 얻기 위하여 1,000 rpm에서 0.5~1분간 원심분리하는 강제 swimp up 방법으로 죽은 정자 또는 이물질들을 침전시켰다. 상층액만을 1,500 rpm에서 5분간 다시 원심분리후 상층액을 제거하여 운동 정자의 농도가  $5 \times 10^6$  /ml 되게 재부유시켜 Nagai 등(1984)의 방법에 따라 0.

5~1시간 전배양하였다.

#### 3) 체외수정

체외성숙이 끝난 난포란을 수정 배양액이 들어 있는 4-well dish의 well 당 형태별 10~30개씩 옮긴 후 수정능획득 전처리가 끝난 정자를  $5 \times 10^5$  /ml 되게 주입하고 멸균 파라핀오일로 피복한 다음 39℃, CO<sub>2</sub> incubator에서 6~7시간동안 수정시켰다.

#### 6. 수정란의 체외배양 및 발생능 판정

수정란을 sodium pyruvate(40μg/ml), glucose(1.0mg/ml), sodium lactate(60% syrup; 3.7μl/ml), dibekacin sulphate(100μg/ml), glutamine(0.146μg/ml) 및 10%(v/v) FCS가 포함된 TCM 199 Earl's salt(발생배양액)에 옮겨 수정후 120시간까지 배양하였으며 매 24시간마다 신선배양액으로 1/2씩 교환하였다. 수정란의 발생능 판정은 처리별 발생성적을 분할지수로 표시하였다. 분할지수는 Wright(1977)의 방법에서와 같이 처음 공시 수정란의 2, 4, 8, 16 및 32배로 발생할 때 점수를 각각 1(2-세포기), 2(4-세포기까지 발생한 수정란), 3(8-세포기까지 발생한 수정란), 4(8-세포기까지 발생한 수정란) 및 5점(상실배까지 발생한 수정란)으로 구분하고 이들 발생정도의 점수와 각 점수에서 조사된 수정란 수를 곱한 총합을 처리별 난할된 수정란의 총수로 나누었을 때의 값으로 하였다.

#### 7. 통계분석

실험결과의 통계분석은 Minitab statistical software(Minitab, New York, 1985)의 일반선형모형을 사용하여 student's T-test로 유의성 검정을 하였으며 수정란의 난할율은  $\chi^2$ -test로 유의성 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 난포란의 형태가 체외성숙도에 미치는 영향

난포로부터 채취한 돼지 난자를 Fig. 1의 왼쪽에 나타낸 바와 같이 A형(난구세포가 치밀하고 넓게 둘러쌓인 난포란), B형(난구세포가 A형보다는 좁

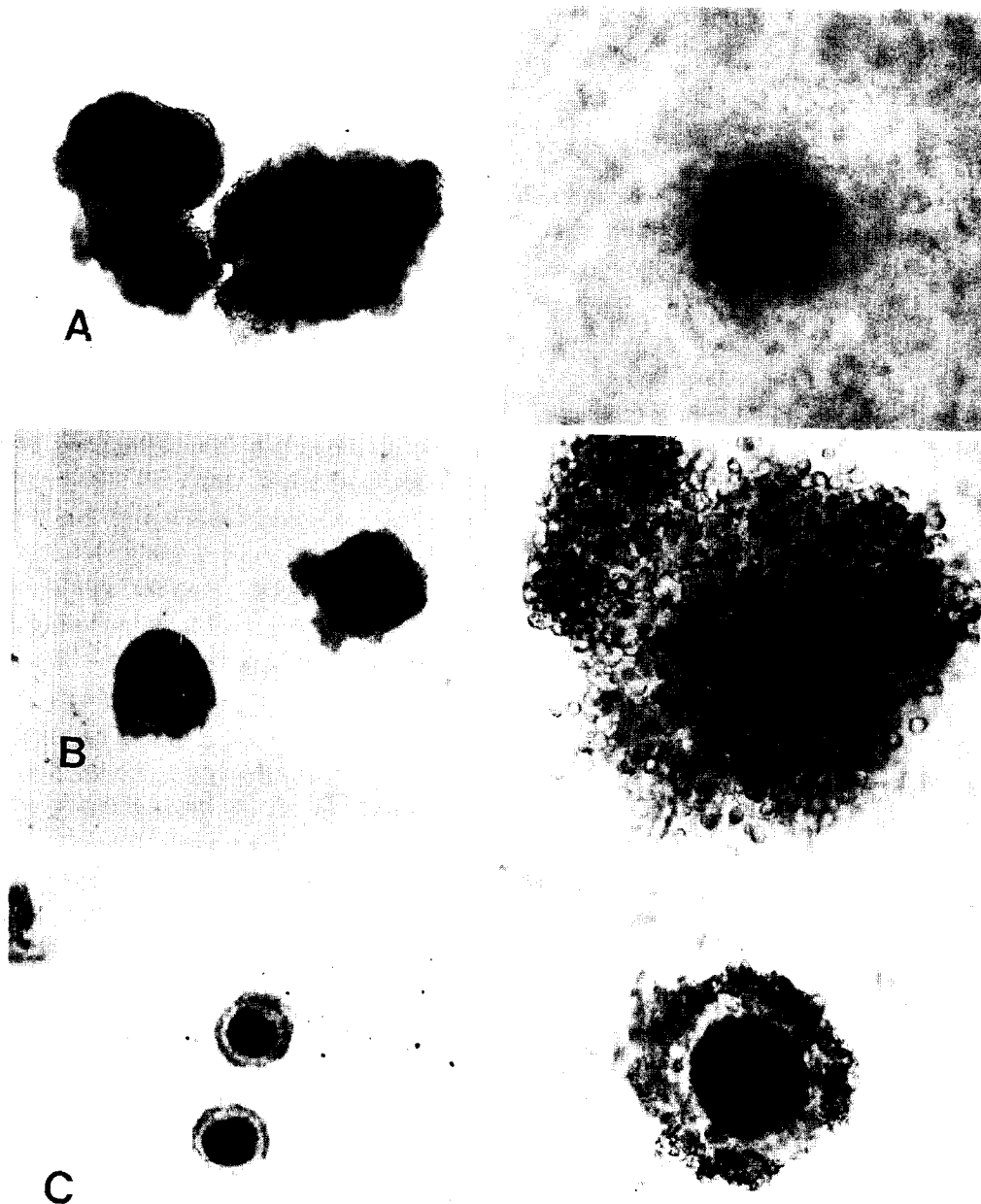


Fig. 1. Types of oocyte-cumulus complexes(Left : 40)at collection and degrees of cumulus cells expansion after *in vitro* maturation(Right : x100)

Oocytes-cumulus complexes was classified into 3 types according to the differences in the tightness and thickness of cumulus cell layers :

A, cumulus-enclosed oocyte, completely ; B, corona-enclosed oocyte ; C, denuded oocyte, nearly.

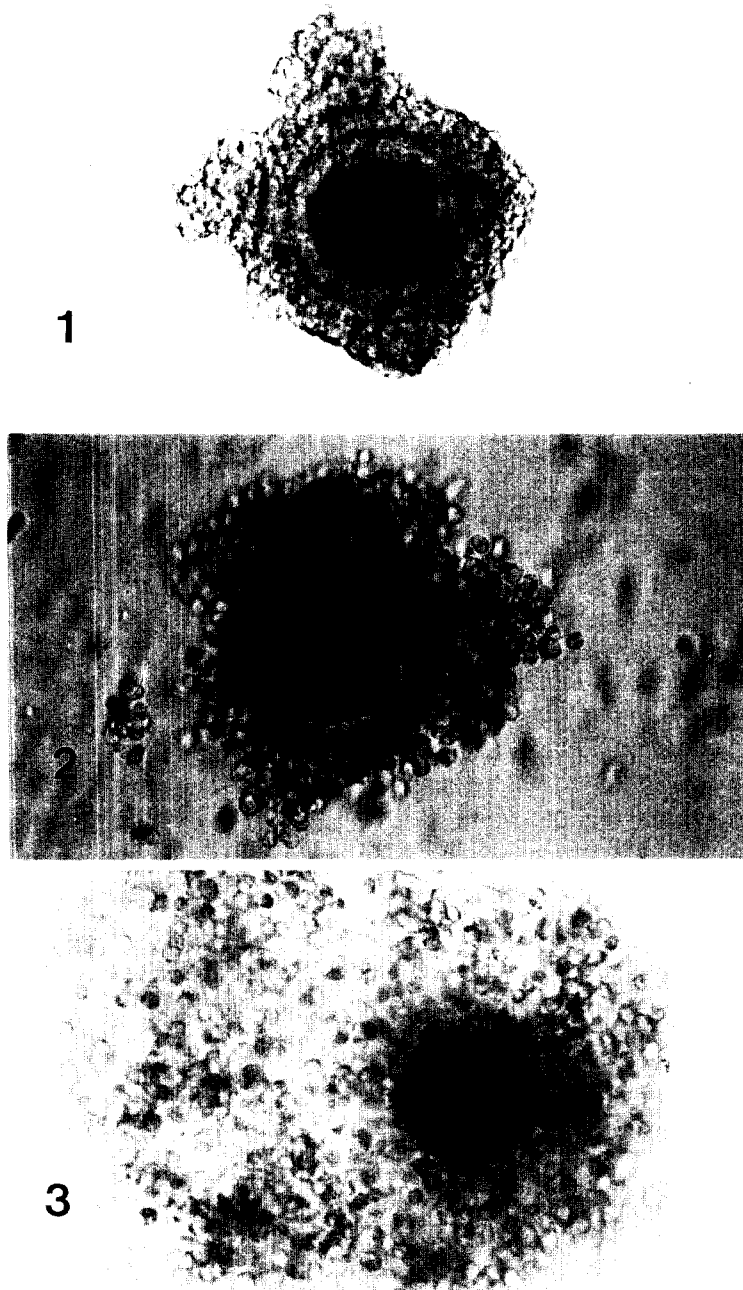


Fig. 2. Types of oocyte-cumulus complexes(Left : 40)at collection and degrees of cumulus cells expansion after *in vitro* maturation(Right : x100)

Oocytes-cumulus complexes were classified into 3 types according to the differences in the tightness and thickness of cumulus cell layers :

A, cumulus-enclosed oocyte, completely : B, corona-enclosed oocyte : C, denuded oocyte, nearly.

Table 1. Cumulus cells expansion after in vitro maturation in 3 different oocyte types

Type <sup>3)</sup>	No. of oocytes <sup>1)</sup> examined	Degree <sup>2)</sup> of cumulus cells expansion			
		1	2	3	CEI <sup>4)</sup> (x±SD)
A	97	2	19	76	2.77 <sup>a</sup> ±0.08
B	154	10	23	121	2.72 <sup>a</sup> ±0.03
C	51	33	18	0	1.36 <sup>b</sup> ±0.07

<sup>1)</sup> Oocytes were cultured for 42hrs in maturation medium(TCM-199 Earl's salt supplemented with 100mg/l Na-pyruvate, 550mg/l glucose, 900mg/l Ca-lactate, 100mg/l dibekacin sulfate, 1ug/ml estradiol-17β, 10% FCS and 10% pFF, 10IU/ml hCG and 10IU/ml PMSG).

<sup>2)</sup> Degree of cumulus cells expansion was assessed according to subjective scale from "1"(no expansion) to "3"(complete expansion)

by a modified Fagbohun and Downs's method(1990).

<sup>3)</sup> Type A : Cumulus-enclosed oocyte, completely.

B : Corona-enclosed oocyte.

C : Denuded oocyte, nearly.

<sup>4)</sup> CEI(cumulus cells expansion index) was defined as :

$$CEI = \frac{\sum D_i F_i}{\sum F_i}$$

Where,

D<sub>i</sub> : ith value for degree of cumulus cells expansion, i 1, 2 and 3.

F<sub>i</sub> : frequency corresponding to D<sub>i</sub>.

<sup>a,b</sup> Values in same column with different superscripts are significantly different (P<0.05).

으나 정상적인 방사관층을 갖는 난포란) 및 C형(주위에 난구세포가 거의 없는 난포란)난포란을 hCG(10IU/ml) 및 PMSG(10IU/ml)가 첨가된 성숙배양액 42시간 체외성숙시켰을 때 난구세포의 팽화 정도 Fig. 1의 오른쪽과 같다. A형 난포란은 세포질과 방사관층을 관찰하기 어려울 정도로 아주 넓게 팽화되었으며, B형 난포란은 방사관층과 난구세포층이 선명하게 팽화되었고 C형 난포란의 경우에는 성숙후에도 난구세포층이 거의 없거나 방사관층의 일부가 손상된 상태였다.

체외성숙후 난구세포의 팽화정도를 난구세포팽화지수(CEI : cumulus cells expansion index)로 표시한 A, B 및 C형 난포란의 성숙도는 Table 1과 같으며 성숙정도의 기준인 팽화지수(1, 2, 3)별 난포란의 형태는 Fig. 2와 같다. 형태에 따른 성숙도는 난구세포가 많이 부착된 난포란일수록 팽화지수가 높게 나타났다. A형과 B형 난포란의 CEI간에는 유의적인 차이가 없었으나 C형 난포란의 성숙도는

A, B형보다 현저히 낮았다(p<0.05).

이 결과는 Kikuchi 등(1993)이 체외성숙된 돼지 난포란을 팽화된 난구세포와 과립막세포를 가진 난포란, 팽화된 난구세포만 가진 난포란 및 나화된 난포란으로 분류하였을 때 각 group에서 나타난 성숙율이 75.0, 76.6 및 81.3%로서 성숙후 난구세포가 적게 부착된 난포란일수록 성숙율이 높다고 보고한 것과는 상반된 경향이였다. 그러나 Wu 등(1992)이 난구세포가 많이 부착된 난포란일수록 성숙율이 높다고 보고한 결과와는 매우 일치된 경향을 얻었다. 또한 Ding과 Foxcroft(1992)는 돼지난포란을 난포세포와 공배양시 난포세포가 핵성숙에는 영향을 미치지 않으나 세포질 성숙에 크게 영향을 하는 것으로 보고한 바 있다. 이들의 결과에서 난포란의 성숙정도가 난구세포의 부착정도에 따라 차이가 있기 때문에 체외성숙시 공시 난포란의 선별이용이 성숙율을 높이는데 중요한 요인이 되고 있음을 제시하고 있다. 그러나 본 실험에서 팽화정도 3의 난포란을

Table 2. Effect of culture time on cumulus cells expansion of oocytes

Culture time(h)	No. of oocytes <sup>1)</sup> examined	Degree of cumulus cells expansion			
		1	2	3	CEI <sup>2)</sup> (x ± SD)
36	224	17	35	172	2.69 <sup>a</sup> ± 0.09
42	729	44	128	557	2.69 <sup>a</sup> ± 0.08
48	368	45	88	235	2.48 <sup>b</sup> ± 0.23

<sup>1)</sup> Oocytes were cultured in maturation medium containing hCG(10IU/ml) and PMSG(10IU/ml).

<sup>2)</sup> CEI : refer to Table 1.

<sup>a,b</sup> Values in same column with different superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 3. Effect of oocyte types and maturation times on developmental potential after *in vitro* fertilization

Oocytes types <sup>1)</sup>	Maturation time(h)	No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved to						Total	Cleavage index <sup>2)</sup> (x SE)
			2-cell	4-cell	8-cell	16-cell	M	(%)		
A	36	49	11	6	—	1	—	18(35.8±9.8) <sup>a</sup>	1.61±.14 <sup>b</sup>	
	42	80	5	8	18	7	3	41(48.6±9.6) <sup>a</sup>	3.01±.32 <sup>a</sup>	
	48	101	22	14	4	3	1	44(43.0±9.4) <sup>a</sup>	1.73±.19 <sup>b</sup>	
B	36	63	8	8	2	2	2	22(34.0±2.0) <sup>a</sup>	2.18±.42 <sup>a</sup>	
	42	82	1	4	16	6	1	28(35.0±5.4) <sup>a</sup>	3.25±.44 <sup>a</sup>	
	48	79	16	9	4	3	1	33(45.7±7.2) <sup>a</sup>	1.93±.07 <sup>a</sup>	
C	36	86	6	1	2	3	—	12(16.7±3.8) <sup>b</sup>	2.16±.39 <sup>a</sup>	
	42	67	2	2	1	1	—	6(9.1±2.2) <sup>b</sup>	1.75±.48 <sup>b</sup>	
	48	62	6	5	1	—	—	12(18.3±2.6) <sup>b</sup>	1.31±.19 <sup>b</sup>	

<sup>1)</sup> Oocyte types at *in vitro* fertilization after *in vitro* maturation :

A, cumulus-enclosed oocyte, completely; B, corona-enclosed oocyte; C, denuded oocyte, nearly.

<sup>2)</sup> Cleavage index(CI) was assessed according to scores "1"(two-cell) to "5"(developed to morula stage:M) described by Wright's method(1977).

CI based on number of normal blastomeres as measured by the formula for a geometric progression and was defined as :

$$CI = \frac{\sum Di Fi}{\sum Fi}$$

Where,

Di : ith score for developmental potential of embryos, i=1, 2, 3, 4 and 5.

Fi : frequency corresponding to Di.

완전성숙으로 간주할 경우 A 및 B형 난포란의 성숙율이 각각 78.4%(76/97) 및 78.6%(121/154)였고, C형 난포란은 전혀 성숙이 일어나지 않았던 것은 Kikuchi 등(1993)과 Wu 등(1992)의 성숙율과 차이가 있었다. 그 이유는 본 실험의 난구세포 팽화 정도에 의한 성숙판정방법과 핵형분석에 의한 성숙판정방법간의 차이에 기인된 것으로 볼 수 있겠다.

그러나 Byun 등(1991)과 Yoshida 등(1989)이 돼지 난포란의 체외성숙시 난구세포의 팽화도와 핵성숙간에 상당히 일치함이 보고한 바 있으며 또한 난구세포 팽화지수에 의한 성숙판정이 소(Fenton 등, 1993), 생쥐(Fagbhun Downs, 1990)에서도 유용한 방법으로 소개된 바 있기 때문에 본 실험에서 난포란의 성숙에 미치는 난구세포의 영향이 객관성있게

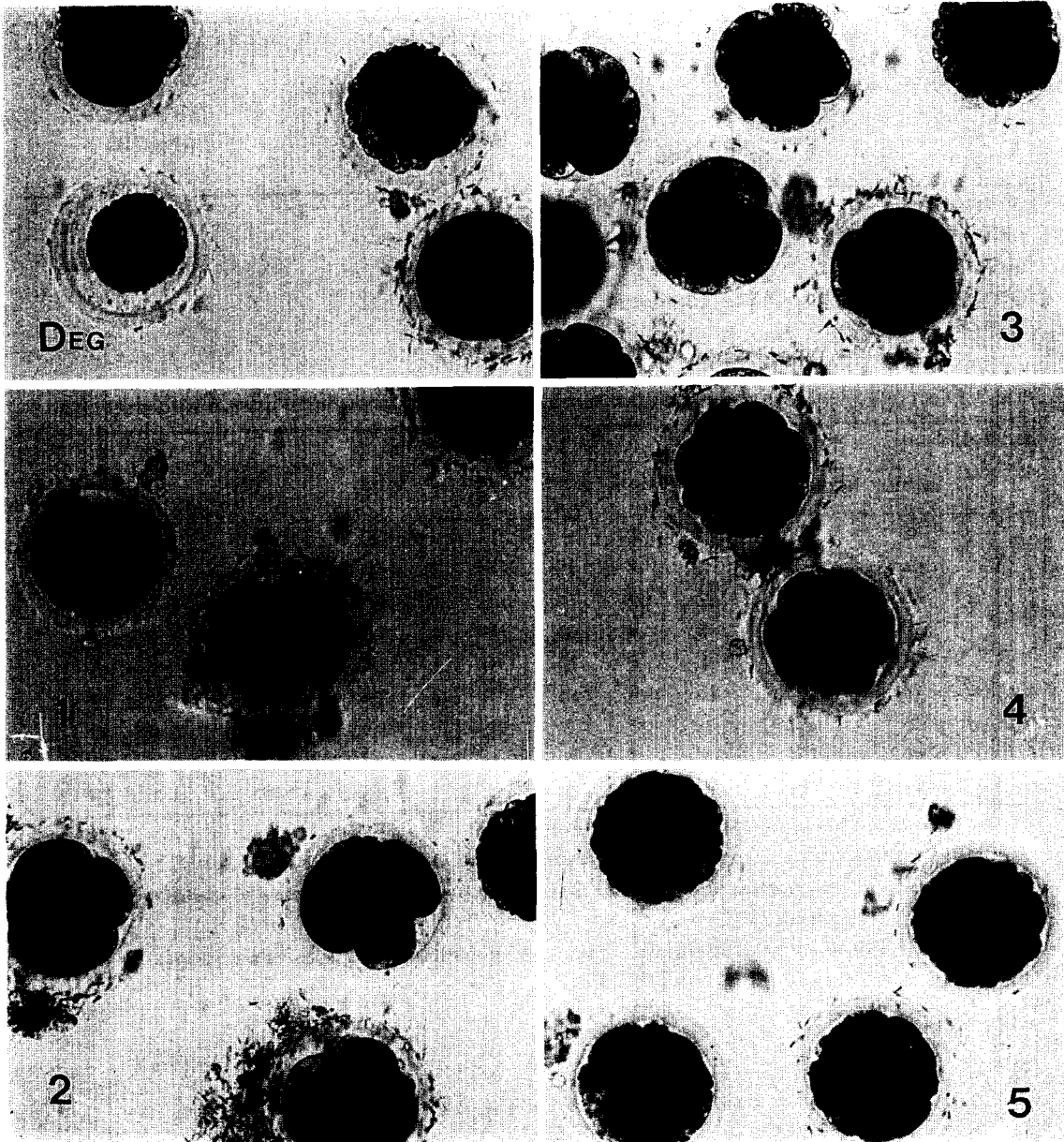


Fig. 3. Various stages and cleavage index scores of embryos derived form *in vitro* fertilization

Deg : One-cell or degenerated embryos(x100)

1 : 2-cell embryos(score 1)

2 : 4-cell embryos(score 2)

3 : 8-cell embryos(score 3)

4 : 16-cell embryos(score 4)

5 : Morula(score 5)



조사된 것으로 사료된다.

## 2. 배양시간이 체외성숙도에 미치는 영향

포란중에서 정상적인 형태를 가진 A와 B형 난포란만을 선별하여 hCG(10IU/ml) 및 PMSG(10IU/ml)가 첨가된 성숙배양액에서 36, 42 및 48시간 체외성숙시킨 후 배양시간별 난구세포팽화지수(CEI)는 Table 2와 같다.

배양 36, 42 및 48시간에서의 CEI가 각각 2.69, 2.69 및 2.48로서 36 및 42시간 성숙시켰을 때가 48시간 성숙보다 유의적( $P < 0.05$ )으로 높은 성숙도를 나타내었으며 한편 팽화정도 3을 나타내는 난포란의 비율은 각각 76.8%, 76.4% 및 63.8%로서 48시간에서 낮았다. 이와 유사한 결과를 Yoshida 등(1989)도 보고한 바 있는데 36~42시간 성숙배양에서 74~98%의 난포란에서, 48시간에서는 53%의 난포란에서 난구세포의 팽화가 일어났다. 그러나 본 실험 결과를 체외성숙배양후 metaphase II 도달 즉 핵성숙으로 보고된 결과와 비교할 경우 다소 차이가 있었다. 특히 Kim 등(1990)은 36시간과 48시간 성숙시킨 후의 metaphase II 도달율이 45.5%와 61.3%로서 48시간에 더 높게 보고하였다. 또한 McGaughey와 Polge(1971)의 경우도 52~55시간 성숙에서의 핵성숙율이 64%로서 43~44시간에서 보다 높다고 보고하였으며 McGaughey와 Van Blerkom(1977)도 45시간까지 성숙시키는 동안 metaphase II에 도달된 난포란의 비율이 시간이 경과될수록 높아지는 경향을 보고하였다. 한편 Hagen 등(1991)은 metaphase II까지의 도달에 41~48시간이 소요됨을 보고하였고 Prochazka 등(1992)은 36시간과 42시간 배양에서의 핵성숙율이 77.3%와 91.3%로 42시간에서 양호한 결과로 얻었다. 이 두 보고의 결과는 본 실험의 42시간 배양에서 난구세포팽화지수가 높았던 결과와 일치되고 있음을 알 수 있었다.

이와 같이 돼지난포란의 체외성숙시간에 따른 성숙율은 보고자에 따라 일치되고 있지 않을 뿐만 아니라 체외성숙란의 체외수정후 배발생율에서도 역시 보고자간에 차이가 많다(Iritani 등, 1978; Nagai 등, 1984). 최근 Mattioli 등(1989)과 Naito

등(1989)이 40~44시간 또는 48시간 체외성숙배양에서 체외수정 후 높은 난할율이 보고된 이후로 체외성숙시간이 다소 연장되는 추세에 있으나 다수의 수정란을 생산하기 위한 정확한 체외성숙시간의 결정은 더 연구가 진행되어야 할 과제로 사료된다.

## 3. 난포란의 형태와 성숙배양시간이 배발생에 미치는 영향

hCG(10IU/ml)와 PMSG(10IU/ml)가 첨가된 성숙배양액(pH 7.4)에 Fig. 1에서와 같이 돼지 난포란의 형태와 배양시간별로 42시간 체외성숙시키고 체외수정후 120시간까지 발생시켰을 때 난할율과 분할지수는 Table 3과 같으며 각 분할지수에 따른 수정란의 난할상태는 Fig. 3과 같다.

A형 난포란을 42시간동안 성숙시킬 경우가 48.6%로 난할율이 가장 높았으며, 분할지수에 의한 발생성적은 B형 난포란의 42시간 성숙에서 3.25로 다소 높았다. 또한 A 및 B형 난포란에서는 36과 48시간 보다 42시간 성숙배양에서 다소 높은 발생성적을 보여주었으며 C형 난포란은 성숙시간이 경과될수록 발생성적이 낮았다.

이와 같은 결과는 Kikuchi 등(1993)이 여러 형태의 난포란중에서 나화된 난자가 metaphase-II의 도달율이 가장 높았고, 팽화된 난구세포로 쌓인 난포란은 침투율이, 팽화된 난구세포와 과립막세포로 둘러싸인 난포란은 응성전핵형성율이 각각 가장 높았다고 한 결과와 Galeati 등(1991)이 체외성숙후 난구세포가 붙어있는 난포란의 체외수정율이 나화된 난포란보다 높았던 결과와 같은 경향이였다. 또한 소에서도 Fukui 등(1992)은 난구세포로 둘러싸인 난포란의 체외수정에서 가장 높은 난할율을 보고한 바 있으며 Hawk 등(1992)은 소 난포란의 성숙 전후에 난구세포의 제거시 수정율과 확장배반포형성율이 현저히 감소됨을 보고하였다. 이들의 결과에서 성숙시 난구세포의 존재가 수정후 정상적인 발생에 중요한 영향을 미치는 것으로 나타나 있다. Galeati 등(1991)도 성숙동안 난구세포의 존재가 정자침입율에 영향을 미칠 뿐만 아니라 수정후 난할율 또는 발생능을 좌우하는 요인이 됨을 보고하였다. 한편 48시간 성숙배양에서 정상발생율이 저

조했던 것은 이미 Table 3에서 언급한 바와 같이 48 시간의 성숙에서 난구세포의 팽화지수가 낮았고 동시에 난자의 노화에 따른 다정자 침입율이 증가된 데 기인한 것으로 사료되었다.

## 적 요

본 연구는 첫째 미성숙난포란으로부터 다수의 돼지 수정란을 얻기 위한 효과적인 체외생산체계를 개발하기 위해 난포란의 형태 및 성숙시간이 체외 성숙, 체외수정 및 배발생에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 난포란의 성숙도를 난구세포팽화지수(CEI: cumulus expansion index)로 나타냈을 때 A와 B형 난포란간에는 차이가 없었으나 C형 난포란의 CEI는 현저히 낮았다( $P < 0.05$ ).
2. A형 및 B형 난포란을 36, 42 및 48시간 성숙시켰을 때 36시간과 42시간의 CEI에는 차이가 없었으나 48시간 성숙은 다른 성숙시간보다 매우 낮았다( $P < 0.05$ ).
3. 체외수정된 난포란의 난할율은 A형 난포란의 42시간 성숙에서 가장 높았으나 분할지수로 나타낸 발생능은 B형 난포란의 42시간 성숙에서 가장 높았다.

## 참고문헌

- Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD and First NL. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.* 28:717-725.
- Byun TH, Lee SH and Song HB. 1991. Development of rapid staining method for nucleus of the oocyte from domestic animals. *Korean J. Anim. Sci.* 33:25-31.
- Ding J and Foxcroft GR. 1992. Follicular heterogeneity and oocyte maturation *in vitro* in pigs. *Biol. Reprod.* 47:648-655.
- Edwards RG. 1962. Meiosis in ovarian oocytes of adult mammals. *Nature* 196:446-450.
- Eng LA, Kornegay ET, Huntington J and Wellman T. 1986. Effects of incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 76:657-662.
- Fagbohun CF and Downs SM. 1990. Maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex: stimulation by lectins. *Biol. Reprod.* 42:413-423.
- Fenton SE, Dentine MR and Ax RL. 1993. Modulation of bovine oocyte-cumulus cell complex maturation and fertilization *in vitro* by glycosaminoglycans. *J. Dairy Sci.* 76:701-712.
- Fukui Y, Sawai K, Furudate M, Sato N, Iwazumi Y and Ohsaki K. 1992. *Mol. Reprod. Dev.* 33:357-362.
- Galeati G, Modena S, Lauria A and Mattioli M. 1991. Follicle somatic cells influence pig oocyte penetrability and cortical granule distribution. *Mol. Reprod. Dev.* 29:40-46.
- Hagen DR, Prather RS and First NL. 1991. Response of porcine oocytes to electrical and chemical activation during maturation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 28:70-73.
- Hawk HW, Nel ND, Waterman AR and Wall RJ. 1992. Investigation of means to improve rates of fertilization in *in vitro* maturation/*in vitro* fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 38:989-998.
- Hunter RHF. 1991. Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.* 29:385-391.
- Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penetration of pig oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 54:379-383.
- Kikuchi K, Nagai T, Motlik J, Shioya Y and Izaike Y. 1993. Effect of follicle cell on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology* 39:593-599.

- Kim CK, Chung YC, Lee MS, Yoon JT, Pang MG and Chung KS. 1990. Studies on *in vitro* maturation of pig follicular oocytes. Korean J. Anim. Reprod. 14:84-91.
- Kim SK, Lee MH, Lee MH and Shin YH. 1990. Studies on *in vitro* maturation and fertilization of porcine follicular oocytes. Korean J. Anim. Reprod. 14:23-30.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, Northey DL and First NL. 1987. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. Biol. Reprod. 36:376-383.
- Leman AD and Dziuk PJ. 1971. Fertilization and development of pig follicular oocytes. J. Reprod. Fert. 26:387-389.
- Mattioli M, Bacci ML, Geleati G and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. Theriogenology 31:1201-1207.
- McGaughey RW and Polge C. 1971. Cytogenetic analysis of pig oocytes matured *in vitro*. J. Exp. Zool. 176:383-355.
- McGaughey RW and Blerkom J Van. 1977. Patterns of polypeptide synthesis of porcine oocytes during maturation *in vitro*. Dev. Biol. 56:241-254.
- Motlik J and Kubelka M. 1974. Fertilization of pig oocytes cultivated *in vitro*. J. Reprod. Fert. 36:235-237.
- Nagai T, Niwa K and Iritani A. 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.
- Nagashima H, Nagai T and Yamakawa H. 1993. *In vitro* development of *in vivo* and *in vitro* fertilized porcine zygotes. Mol. Reprod. Dev. 36:163-168.
- Naito K, Fukuda Y and Ishibashi I. 1989. Developmental ability of porcine ova matured in porcine follicular fluid *in vitro* and fertilized *in vitro*. Theriogenology 31:1049-1057.
- Niwa K and Ohgoda O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. Theriogenology 30:733-741.
- Prochazka R, Kanka J, Sutovsky P, Fullka J and Motlik J. 1992. Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse. J. Reprod. Fert. 96:725-734.
- Sato E and Ishibashi T. 1977. Meiotic arresting action of the substance obtained from cell surface of porcine ovarian granulosa cells. Jpn. J. Zootech. Sci. 48(1):22-26.
- Wu GM, Qin PC, Tan JH and Wang LA. 1992. *In vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes. Theriogenology 37:323.
- Yoshida M, Ishizaki Y and Pursel VG. 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 31:68-71.
- Yoshida M, Bamba K and Kojima Y. 1989. Effects of gonadotropins and estradiol -17 on the timing of the nuclear maturation and cumulus mass expansion in pig oocytes culture *in vitro*. Jpn. J. Anim. Reprod. 35:86-91.
- Yoshida M, Ishizaki Y and Kawagishi H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. J. Reprod. Fert. 88:1-8.