

## 돼지난포의 배양에 의한 난자의 성숙<sup>+</sup>

박춘근 · 임종민 · 박영국 · 이준희 · 이상영\* · 정희태 · 양부근 · 김정익  
강원대학교 축산대학

### Oocytes Maturation by Follicular Culture in Porcine

Park, C.K., J.M. Lim, Y.K. Park, J.H. Lee, S.Y. Lee\*, H.T. Cheong, B.K. Yang and C.I. Kim  
College of Animal Agriculture, Kangwon University

#### SUMMARY

The aim of this study was to investigate the effect of the follicular culture from which the oocytes originate on their subsequent *in vitro* maturation ability. Ovarian follicles were isolated and cultured according to size(1~2mm, 2~6mm and 6~8mm) for 42~44 h. The rates of germinal vesicle breakdown(GVBD) in each groups were 87%(65/75), 82%(80/97) and 89%(47/53), but the oocytes maturation were suppressed at anaphase- I stage. In spite of the adding porcine follicular fluid and /or hormones in maturation medium, maturation ability of oocytes from follicle cultured for 21~22 h were inhibited. When oocytes from follicle cultured for 4 h at various temperature were incubated for 38~40 h, the rates of oocytes maturation from follicle cultured at 20°C (51%, 26/51) and 39°C (54%, 26/48) were significant higher ( $P < 0.05$ ) than group cultured at 4°C (33%, 19/58). On the other hand, the GVBD were started 2 h after culture of follicle or oocytes. To summarize, oocytes maturation by follicular culture were inhibited at anaphase- I stage in porcine. When the follicle cultured for 4 h, maturation were completed to metaphase- II stage. However, rates of GVBD in oocytes from follicular culture were higher than oocytes cultured in medium.

(Key words : Follicular culture, Oocytes maturation, Germinal vesicle breakdown, Porcine)

#### I. 서론

포유동물의 난소내에 존재하고 있는 난자는 핵이 제 1감수분열 전기에 머무르는 동안 성장하고 직경이 증가하며, 배란전 gonadotrophin surge 후 완전히 성장한 난자만이 감수분열을 계속하여 제 1감수분열을 완성한 후 배란된다. 일반적으로 난소내에 수많은 난자가 존재하지만(Gosden과 Telfer, 1987), 단지 극소수의 난자만이 배란되며 거의 대부분의 난자는 난소내에서

성장의 여러 단계에서 사멸한다. 한편 난소로부터 회수한 난자를 체외에서 배양하면 폐쇄난포에 의해 야기된 난자의 잃어버린 능력을 회복시킬 수 있는 것으로 생각되어 왔다(Eppig 등, 1990). 이와 같이 난포로부터 회수한 난자는 체외에서 성숙이 가능하며 수정후 초기배까지 발육시킨 후 자궁내에 이식하여 생쥐(Schroeder와 Eppig, 1984), 면양(Staigmiller 등, 1984), 소(Goto 등, 1988) 및 돼지(Mattioli 등, 1989)를 비롯한 많은 동물종에서 산자의 생산에 성공하였다. 최근 난자의 성장 및 성숙을 위한 체외배양기

<sup>+</sup> 이 논문은 1997년도 한국과학재단의 핵심전문연구과제 지원비에 의해 수행되고 있는 결과의 일부임.  
\* 삼양축산주식회사

술은 난자와 난포의 발달에 대한 메카니즘의 연구에 유용하게 이용되었으며, 완전히 발달하지 않은 난포로부터 회수한 미성숙난자를 적절한 조건하에서 배양하므로써 난자의 직경이 증가하고 핵성숙의 완성이 가능하게 되었다(Hiirao 등, 1990, 1994 ; Carroll 등, 1991). 더구나 체외에서 성장 및 성숙시킨 난자를 이용한 산자 생산의 성공은 난자의 완전한 발육이 체외에서도 가능하다는 것을 시사하고 있다(Eppig와 Schroeder, 1989; Eppig 등, 1992). 따라서 가축의 생산을 위한 난자의 성숙배양은 암컷의 생식세포의 대량생산 및 공급을 가능하게 할 것으로 기대된다. 그러나 돼지의 경우 난포로부터 회수한 난자의 체외배양후의 성숙율은 아직도 타동물종에 비하여 낮은 편이며 배양조건에 따라 그 차이가 매우 심하게 나타나고 있다. 본 연구에서는 돼지의 난포를 배양한 후 회수한 난자의 성숙 및 발육상태를 검토하여 난포내 난자의 초기 성숙상태와 그후의 발육능력과의 관계를 규명하고자 수행되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난포의 채취

도축장에서 회수한 난소는 30~35℃의 생리식염수(NaCl, 0.9% w/v ; penicillin 100,000 IU/L, amphotericin B 250 $\mu$ g/L) 내에 넣어 2~3시간 이내에 실험실까지 운반하였다. 난포의 발달이 잘된 난소를 선택하여 생리식염수로 3회 세척한 후 수술가위와 핀셋을 사용하여 실험에 이용할 난포를 난소로부터 분리·채취하였다.

### 2. 난포 및 난자의 배양

실험 1 : 난포의 직경을 1~2, 2~6 및 6~8mm로 구분하여 채취한 후 10% fetal calf serum (FCS), 20mM Na-pyruvate 및 50mg/ml gentamycin이 첨가된 TCM-199배양액내에서 4회 세척후 동일 배양액을 이용하여 5% CO<sub>2</sub>, 39℃에서 42~44시간 배양하였다. 배양개시 21~22시간에서 난포를 2회 세척한 후 배양액을 교환하였다. 난포의 배양을 완료한 후 동일 배양액내에서 수술가위와 핀셋을 이용하여 난포를 파열시켜 현미경하에서 회수한 난자의 난구세포를 제거하여 고정·염색후 성숙상태를 관찰하였다.

실험 2 : 난소로부터 직경 2~6 mm의 난포를 분리·채취한 후 실험 1에서 기술한 방법으로 TCM-199액내에서 21~22시간 배양하였다. 배양후 난포를 파열시켜 회수한 난자는 10% 돼지난포액(PFF, porcine follicular fluid), 호르몬(1 $\mu$ g/ml FSH, 5 $\mu$ g/ml LH 및 1 $\mu$ g/ml E<sub>2</sub>) 또는 난포액+호르몬을 첨가한 배양액내에서 계속하여 21~22시간 배양한 후 난자의 성숙상태를 검토하였다.

실험 3 : 난소로부터 분리·채취한 직경 2~6mm의 난포는 10% FCS, 20mM Na-pyruvate 및 50mg/ml gentamycin이 첨가된 TC-199액을 이용해 4, 20 및 39℃에서 4시간 배양후 난포를 파열시켜 난자를 회수한 후 호르몬(1 $\mu$ g/ml FSH, 5 $\mu$ g/ml LH 및 1 $\mu$ g/ml E<sub>2</sub>)과 10% 난포액이 첨가된 50 $\mu$ l의 배지내에 10개씩의 난자를 넣어 38~40시간 계속 배양한 후 난자의 성숙상태를 관찰하였다.

실험 4 : 난포의 배양과 난자의 배양시 성숙상태를 비교하기 위하여, 직경 2~6mm의 난포와 이들 크기의 난포로부터 회수한 난자를 10% FCS, 20mM Na-pyruvate 및 50mg/ml gentamycin이 첨가된 TC-199액을 이용해 배양하면서 1, 2, 3 및 4시간에서 관찰하여 난자의 성숙상태를 검토하였다.

## III. 결 과

Table 1에서는 난소로부터 채취한 난포를 체외에서 42~44시간 배양한 후 회수한 난자의 성숙상태와 난포의 직경과의 관계를 나타냈다. 난포의 크기를 1~2, 2~6 및 6~8 mm로 구분하여 배양한 결과 GVBD의 비율은 87%(65/75), 82%(80/97) 및 89%(47/53)로 유의차는 인정되지 않았으며, 난포의 직경에 관계없이 anaphase-I기에서 난자의 성숙이 정지되었다.

한편, 21~22시간 배양한 난포로부터 난자를 회수하여 여러 조건에서 21~22시간 계속배양한 난자의 성숙상태를 Table 2에 나타냈다. GVBD는 난자의 배양조건에 관계없이 96~100%로 차이를 나타내지 않았으나 metaphase-II까지 성숙한 난자는 관찰되지 않았다. 그러나 대조구의 경우 metaphase-I에서 성숙이 정지된데 비해 난포액 또는 호르몬물질의 첨가시 anaphase-I까지 발육한 난자가 관찰되었다.

**Table 1. Relationship between follicular culture and meiotic maturation in porcine oocytes**

Follicle diameter(mm)	No. of oocytes examined*	No. of oocytes matured with :						No. of GVBD(%)
		GV	P- I	M- I	A- I	T- I	M- II	
1~2	75	10	49	14	2	0	0	65 /75(87)
2~6	97	17	60	17	3	0	0	80 /97(82)
6~8	53	6	30	14	3	0	0	47 /53(89)

\* Follicles were cultured in TC-199 medium for 42~44 h. GV:germinal vesicle stage ; P- I :prophase- I stage ; M- I :metaphase- I stage ; A- I :anaphase- I stage ; T- I :telophase- I stage ; M- II :metaphase- II stage ; GVBD:germinal vesicle breakdown stage.

**Table 2. Maturation *in vitro* by oocytes culture after follicular culture for 21~22 h**

Culture condition	No. of oocytes examined*	No. of oocytes matured with :						No. of GVBD(%)
		GV	P- I	M- I	A- I	T- I	M- II	
Control	36	0	23	13	0	0	0	36 /36(100)
PFF	53	2	39	9	3	0	0	51 /53( 96)
Hormones	64	1	44	15	4	0	0	63 /64( 98)
PFF+Hormones	52	0	35	14	3	0	0	52 /52(100)

\* Oocytes were matured *in vitro* after follicular culture for 21-22 h

PFF:porcine follicular fluid ; Hormones:1 $\mu$ g /ml FSH + 5 $\mu$ g /ml LH + 1 $\mu$ g /ml E<sub>2</sub>.

**Table 3. Oocytes maturation in follicle cultured at various temperature for 4 h**

Follicular culture Temp.( $^{\circ}$ C)	No. of oocytes examined*	No. of oocytes matured with :					No. of M- II (%)
		GV	P- I	M- I	A- I	T- I	
4	58	0	2	12	18	7	19(33) <sup>a</sup>
20	51	0	0	6	12	7	26(51) <sup>b</sup>
39	48	0	0	2	12	8	26(54) <sup>b</sup>

\* Oocytes were cultured in TC-199 medium with porcine follicular fluid and hormones after follicular culture for 4h. a-b, p<0.05

Table 3은 난포를 4시간동안 여러 온도에서 배양한 후 회수한 난자를 체외성숙배양시켜 얻은 결과를 나타냈다. 실험군 모두에서 GV로 남아 있는 난자는 관찰되지 않았으며, 20 및 39 $^{\circ}$ C에서 배양한 난포로부터 회수한 난자를 계속배양한 경우 metaphase-II까지 발육한 난자의 비율은 51%(26/51)와 54%(26/48)로 4 $^{\circ}$ C의 33%(19/58)보다 유의적으로 높은 성숙율을 나타냈다(P<0.05).

난포와 난자의 배양후 GVBD가 일어나는 시기를 비교한 결과 Table 4에 나타낸 바와 같이 1시간 동안 배양한 경우에는 GVBD가 일어난 난자를 관찰할 수 없었다. 그러나 2, 3 및 4시간 배양한 난포로부터 회수

한 난자의 경우 9%(4/46), 23%(10/44) 및 33%(12/36)로 난자 자체의 배양시 3%(1/41), 13%(8/61) 및 15%(6/41)에 비해 높은 비율로 난자의 GVBD가 관찰되었으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

#### IV. 고 찰

일반적으로 난포로부터 채취한 난자가 체외성숙후 체외수정 및 배양에 이용되고 있는데, 이와 같이 난포로부터 채취한 난자는 48시간 내에서 체외성숙배양이 이루어지고 있다(Moor 등, 1990). 한편, 난포 자체를

분리·채취하여 체외에서 배양한 경우 난포내에 존재하는 난자에 있어서 성숙이 진행되는 상태와 이들 난자의 성숙능력 및 체외에서의 이용 가능성에 대한 연구가 요구되므로, 본 연구에서는 이와 같은 점을 검토할 목적으로 수행되었다.

돼지의 경우, 난소내에서 직경 2~6 mm의 난포로부터 채취한 난자를 42~44시간 체외성숙을 위한 배양시 metaphase-II까지의 성숙율은 보고자 및 배양조건에 따라 매우 다르다. 본 연구의 결과에서 난포의 직경을 1~2, 2~6 및 6~8 mm로 구분하여 42~44시간 배양한 결과 metaphase-II기까지 성숙한 난자는 어느 실험구에서도 관찰되지 않았다. 이와 같은 결과는 체외에서 난자의 성숙이 난포액내에서 성숙이 억제된다는 것을 의미하는데, 돼지의 난포액은 난자의 성숙억제인자를 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며 Sreenan(1970)은 소의 난자도 난포액내에서 핵성숙이 억제된다고 보고하였다. 또한 Sirard와 First(1988)도 비슷한 실험에서 소의 난포액이 햄스터 난자의 성숙을 억제한다는 사실을 보고하여 본 연구에서도 난포 자체의 배양시 난포내의 난포액이 난자의 성숙을 억제하는 것으로 추측된다. 한편 Petr 등(1989)은 돼지의 난구세포로부터 분리되는 물질 중에서 돼지와 소 난자의 GVBD를 억제할 수 있는 인자가 함유되어 있다고 보고하였으며, 돼지의 granulosa cell은 소(Kalous 등, 1993)와 말(Hinrichs와 Schmidt, 1993) 난자의 성숙분열을 억제하는 것으로 나타났다.

본 연구의 결과에서도 난포의 배양을 난자의 체외성숙 배양기간인 42~44시간과 동일하게 하였을 때 난자의 성숙이 anaphase-I기에서 정지되었는데, 난포의 배양을 21~22시간만 실시한 후 난자를 회수하여 나머지 21~22시간 배양액내에서 배양했을 경우에도 Table 2에서 나타낸 바와 같이 난자의 체외성숙기간중 배양액내에 10%의 난포액 또는 FSH, LH 및 estradiol을 첨가한 경우 이들 물질의 무첨가시에 비해 핵성숙이 약간 더 진행되었으나 난자의 성숙이 anaphase-I기에서 정지되는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 난자의 체외성숙시 난포액의 첨가가 핵성숙에 효과적으로 작용한다는 Yoshida 등(1992)의 보고와는 달리 난포를 21~22시간 배양하는 동안 난자의 성숙능력이 이미 상실되어 난포액이나 호르몬물질의 첨가에도 불구하고 난자의 성숙은 더 이상 진행되지 않는 것으

로 생각된다.

체외성숙을 위해 난소로부터 난자를 회수하는 과정에서, 가축의 도축시간과 난포로부터 난자의 회수시간과의 간격과 난소의 보존온도는 매우 중요한 문제로 간주되고 있다. 소의 경우 많은 연구자들은 도축후 1~2시간 이내에 30℃에서 난소를 보존하는 것은 난자의 성숙에 영향이 없다고 하였으나(Risopatron 등, 1991; Sekine 등, 1992), 난소의 보존온도가 30℃ 이하가 되면 완전한 핵성숙이 되지 않는 것으로 나타났다(First와 Parrish, 1987). 그러나 Kruij와 Ver-nooy(1982)는 오히려 18~21℃에서 난소를 보존하면서 난자를 회수하는 것이 더욱 효과적이라고 보고했다.

한편 돼지의 경우, Rosenkranz(1993)는 난소를 30~37℃보다는 20℃에서 운반·보존하는 것이 난자의 체외성숙율을 향상시킨다고 보고했다. 본 연구에서 난포를 20 및 39℃에서 4시간 배양한 후 회수한 난자를 배양액내에서 38~42시간 계속 배양한 경우 난자의 성숙율이 51 및 54%로 차이는 없었으나 4℃에서 배양한 경우 난자의 성숙율이 33%로 낮게 나타나 낮은 온도에서의 난포배양은 적당하지 않은 것으로 나타났다(Table 3). 또한 난자핵의 현미경 검사시 4℃에서 배양된 난포로부터 얻은 난자는 핵의 형태적변형 및 위축이 심하게 일어난 것이 관찰되었다.

한편 39℃에서 난포 및 난자를 배양하는 동안 핵성숙이 일어나는 과정을 검토하기 위하여 배양개시후 매시간 난자의 성숙상태를 검토한 결과 난포 및 난자의 배양후 2시간째에 GVBD가 일어났으며(Table 4), 배양후 3 및 4시간에서 회수한 난자는 난포배양의 경우 난자배양보다 오히려 GVBD의 비율이 높게 나타났는데 이와 같은 결과는 난포내의 난자에서도 prophase-I기와 같은 성숙초기단계까지는 GVBD가 진행되는 것으로 생각된다.

결론적으로, 돼지의 경우 난포의 직경크기에 관계없이 배양후 GVBD는 비슷한 비율로 일어나며, 난포를 21~22시간 배양시 난자의 성숙능력이 상실되는 것으로 나타났다. 한편 20℃ 및 39℃에서 4시간 동안의 난포배양은 난자의 성숙에 커다란 영향을 미치지 않았지만 난포의 저온배양은 난자핵의 성숙억제 및 형태의 변형 및 위축을 가져오는 것으로 밝혀졌다. 또한 난포 배양 2시간후 GVBD가 관찰되었으며, 배양후 4시간

**Table 4. Maturation of porcine oocytes at various times of follicles and oocytes culture**

Periods of culture(h)	Type of culture*	No. of oocytes examined	No. of GV	No. of GVBD(%)**
1	F	45	45	0( 0)
	O	53	53	0( 0)
2	F	46	42	4( 9)
	O	41	40	1( 3)
3	F	44	34	10(23)
	O	61	53	8(13)
4	F	36	24	12(33)
	O	41	35	6(15)

\* F:Follicular culture ; O:Oocytes culture.

\*\* No. of oocytes matured to prophase- I stage.

까지 난자보다는 난포배양시 GVBD가 높은 비율로 일어나 난포내에서 초기단계의 난자성숙에 관한 연구가 앞으로 진행되어야 할 것으로 생각된다.

## V. 적 요

본 연구는 난포배양후 회수한 난자의 성숙능력을 검토하기 위하여 수행되었다. 난소로부터 난포를 직경에 따라 1~2mm, 2~6mm 및 6~8mm로 구분하여 채취한 뒤 42~44시간 배양한 결과 GVBD의 비율은 87%(65/75), 82%(80/97) 및 89%(47/53)로 유의적인 차이는 인정되지 않았으며 이들 난자의 성숙은 anaphase- I 기에서 정지되었다. 또한 난포를 21~22시간 배양한 뒤 회수한 난자를 배양액내에 난포액 및 호르몬물질을 첨가하여 21~22시간 계속배양하여도 난자의 성숙은 anaphase- I 기에서 정지되었다. 그러나 난포를 4시간동안 20 및 39℃에서 배양한 후 회수한 난자를 계속하여 38~40시간 배양한 경우 metaphase- II 기까지 성숙한 난자의 비율은 51%(26/51) 및 54%(26/48)로 4℃(33%, 19/58)에서 난포를 배양한 경우에 비해 유의적으로 높은 성숙율을 나타냈다 ( $P < 0.05$ ).

한편 난포 또는 난자의 배양후 2시간에서 GVBD가 관찰되었으며, 4시간동안 난포를 계속해서 배양한 경우 난포내의 난자가 난자 자체의 배양보다 GVBD의 비율이 높게 나타났다. 본 연구의 결과에서 난포의 배양은 난자의 성숙을 억제하지만 난포배양 2시간후 난자성숙이 prophase- I 기까지 진행되었으므로 난포내

난자의 초기성숙에 대한 보다 자세한 연구가 요구된다.

## VI. 인용문헌

- Eppig, J. J. and A. C. Schroeder. 1989. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization *in vitro*. *Biology Reprod.*, 41:268-276.
- Eppig, J. J., A. C. Schroeder, J. J. M. Van de Sandt, C. A. Ziomek and B. D. Bavister. 1990. Developmental capacity of mouse oocytes that grow and mature in culture : the effect of modification of the protocol. *Theriogenology*, 33:89-100.
- Eppig, J. J., K. Wigglesworth and M. J. O'Brien. 1992. Comparison of embryonic developmental competence of mouse oocytes grown with and without serum. *Mole. Reprod. Develop.*, 32:33-40.
- First, N. L. and J. J. Parrish. 1987. Preparation of sperm for *in vitro* fertilization. *Proceedings of a Symposium on the Application of Egg and Embryo Technologies to Domestic Animals(Copenhagen)*, 33-35.
- Gosden, R. E. and E. Telfer. 1987. Numbers

- of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *J. Zoology*, 211:169-175.
6. 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. Fertil.*, 83:753-758.
  7. Hinrichs, K. and A. L. Schmidt. 1993. Reversible meiotic arrest of horse oocytes by coculture with follicular components. *Theriogenology*, 39:232.
  8. Hirao, Y., T. Miyano and S. Kato. 1990. Fertilization of *in vitro* grown mouse oocytes. *Theriogenology*, 34:1071-1077.
  9. Hirao, Y., T. Nagai, M. Kubo, T. Miyano, M. Miyake and S. Kato. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 100:333-339.
  10. Kalous, J., P. Sutovsky, Z. Rimkevicova, Y. Shioya, B. L. Lie and J. Motlik. 1993. Pig membrana granulosa cells prevent resumption of meiosis in cattle oocytes. *Mole. Reprod. Develop.*, 34:58-64.
  11. Kruip, Th. A. M. and B. T. M. Vernooy. 1982. Influence of temperature on the resumption meiosis of bovine oocytes *in vitro*. In : Rolland, R., E. V. van, Hall, S. G. Hillier, K. P. and J. Schoemaker. (eds) Follicular Maturation and Ovulation. International Congress Series, pp. 282-288.
  12. Mattioli, M., M. L. Bacci, G. Galeati and E. Seren. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 31:1201-1207.
  13. Moor, R. M., M. Mattioli, J. Ding and T. Nagai. 1990. Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fertil., Supple.*, 40:197-210.
  14. Petr, J., L. Zetova, J. Fulka and F. Jilek. 1989. Quantitative inhibitory influence of porcine cumulus cells upon the maturation of pig and cattle oocytes *in vitro*. *Reprod. Nutri. Develop.*, 29:541-540.
  15. Risopatron, J. M., M. R. Del Campo and C. H. Campo Del. 1991. Effect of storage temperature on the maturation, fertilization and development of cattle oocytes. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 23:143-150.
  16. Rosenkranz, C. 1993. Low temperature(20°C) during transport porcine ovaries improves *in vitro* maturation of COCs. *J. Reprod. Fertil.*, 11:64(abs. 118).
  17. Sekine, J., T. Sakurada and R. Oura. 1992. Optimum temperature of ovary transportation for *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Veterinary Record*. 131:372.
  18. Schroeder, A. C. and J. J. Eppig. 1984. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. *Develop. Biology*, 102:493-497.
  19. Sirard, M. A. and N. L. First. 1988. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol. Reprod.*, 39:229-234.
  20. Sreenan, J. M. 1970. *In-vitro* maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes. *J. Agri. Sci.*, 75:393-396.
  21. Staigmiller, R. B. and R. M. Moor. 1984. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res.*, 9:221-229.
  22. Yoshida, M., Y. Ishizaki, H. Kawagishi, K. Bamba and Y. Kojima. 1992. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 95:481-488.

(접수일자 : 1997. 5. 8. / 채택일자 : 1997. 6. 3.)