

도축장에서 난소운반 온도가 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 영향

박 병 권
충남대학교 농과대학

Effect of *In Vitro* Maturation of Porcine Immature Oocyte at Ovary Transportation Temperature from Slaughter House

Park, Byung Kwon

College of Agriculture, Chungnam National University

SUMMARY

This study was conducted to find out the recovery rate of oocyte according to the different size of follicles from porcine ovaries, and the effect of *in vitro* maturation of porcine immature oocyte at the different transportation temperature of ovaries from slaughter house.

The results obtained were summarized as follows :

1. The number of follicles per ovary was 22.5. The number of A- and B-typed oocytes (type A : cumulus-enclosed oocyte, type-B : corona-enclosed oocyte) per ovary was 2.4. The proportion of A- and B-typed oocytes was 29.6% of the total recovery oocytes.
2. When the immature oocytes were cultured for 36, 40, 44 and 48 h at 5°C transportation temperature of ovary, the germinal vesicle breakdown (GVBD) rates of porcine oocytes were 32.5, 28.2, 22.6 and 25.9% respectively. There were no significant differences between all the culture time for GVBD. Especially, most of oocytes were observed to arrest the development beyond germinal vesicle (GV) stage.
3. When the immature oocytes were cultured for 36, 40, 44 and 48 h at 25°C transportation temperature of ovary, the GVBD rates were 81.0, 90.0, 91.7 and 92.9%, and the maturation (Met- II) rates were 51.2, 78.8, 76.2 and 78.6%, respectively.
4. When the immature oocytes were cultured for 36, 40, 44 and 48 h at 38°C transportation temperature of ovary, the GVBD rates were 93.9, 96.5, 96.5 and 95.3%, and the maturation rates were 62.2, 88.4, 84.7 and 86.0%, respectively.
5. The above results showed that the maturation rates of immature oocytes between 25°C and 38°C transportation temperature of ovary did not differ significantly.

(Key words : Porcine, Oocyte, IVM, Ovary transportation temperature)

I. 서 론

수정란이식, 난자 및 수정란의 동결보존, 수정란의 성판별, 핵이식을 통한 복제동물의 작출, 유전자이식을 통한 유용한 생리활성물질을 생산해 내기 위한 복

함개체의 작출 등과 같은 가축번식학 분야의 첨단기술을 연구하기 위해서는 우선적으로 다수의 수정란을 확보하는 것이 필수적이다. 따라서 이를 해결하는 하나의 수단으로서 가축의 난소내에 다량 존재하는 미성숙 난포란을 채취하여 체외에서 성숙배양하여 수정시킴으로서 다량의 수정란을 얻고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

포유동물 난자의 체외성숙에 관한 연구는 Pincus와 Enzmann(1935)이 토끼의 미성숙 난포란을 채취하여 체외배양하면 체내에서 일어나는 일련의 핵성숙과정이 자발적으로 일어난다는 것을 최초로 보고한 이래, 여러 연구자에 의해서 다양한 동물에서 연구가 진행되어 왔으며, 특히 돼지에 있어 미성숙난포란의 체외성숙은 Edward(1965)에 의하여 체외에서 43~46시간 동안 체외배양하므로써 제1성숙분열 전기(prophase-I)의 복사기(diotene)에 멈추어 있던 난자의 핵이 성숙분열을 재개하여 제2성숙분열 중기(meta-phase-II)에 도달한다는 것이 처음으로 보고된 이래 여러 연구자에 의하여 돼지난포란의 체외성숙률을 높이려는 연구가 다각적으로 수행하여 왔다. 즉, 난소의 형태(Motlik 등, 1984 ; Byun과 Lee, 1992) 및 난포의 크기(Leibfried와 First, 1979 ; Motlik 등, 1984 ; Nagai 등, 1993), 그리고 성숙배양시간(Yoshida와 Kojima, 1989 ; Wang 등, 1992 ; Bousquet, 1994 ; 이 등, 1994) 등과 같은 요인에 의한 미성숙난포란의 체외성숙에 미치는 영향에 대하여 연구가 수행되어 왔으며, 적절한 배양액 선정(Eng 등, 1986 ; 정, 1993), 성선자극호르몬과 혈청의 첨가(Linder 등, 1974 ; Channing 등, 1978 ; Racowsky, 1985 ; Naito와 Toyoda 등, 1992) 등으로 적절한 체외성숙배양 조건을 구명하려는 연구가 수행되어 왔다.

그러나 난포란을 체외에서 성숙시켜 이용하는 연구에서 소의 경우는 현재까지 다수의 산자 생산이 보고되어 어느 정도 기술체계가 확립되었다고 볼 수 있으나, 돼지에서는 난포란이 체외성숙시간이 다른 가축에 비하여 길고, 체외(*in vitro*)성숙시에는 체내(*in vivo*)성숙시보다 난구세포와 난포란의 미세용모로 연결되어 있는 수가 적고 쉽게 분리되어 gap junction의 감소가 빨라져 물질이동에 장애가 발생(Motlik 등, 1984)하고 성숙시 일어나는 난세포질내의 세포소기관들의 제배열이 불완전하고 난세포질내에 항산화물질

(antioxidants)의 일종인 glutathione(GSH)과 같은 물질의 합성에 장애를 초래(Funahashi 등, 1995)하여 성숙시간이 길어지고 수정시 다정자침입률이 높아지며, 정자두부의 팽화, 응성전핵 형성률을 감소 및 4-세포기에서 체외발생능 정지현상을 초래하는 등 결과적으로 체외수정란 생산 및 산자생산이 극히 제한되고 있는 실정이다(Ball, 1983 ; Racowsky, 1991). 한편, 이와 같은 여러 가지 실험방법과 더불어, 최근 도축장에서 난소를 실험실로 운반할 때의 온도조건이 미성숙난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외배발달에 영향을 미친다는 연구(Eng 등, 1986 ; 변 등, 1989 ; Funahashi와 Day, 1993abc ; Kikuchi 등, 1993 ; Rosenkranz, 1993 ; Yoshida 등, 1993ab ; 가 등, 1995 ; Sawai 등, 1997) 결과가 여러 연구자들에 의하여 보고되고 있으나 아직도 적절한 온도조건이 확립되었다고 볼 수 없다.

따라서 본 연구는 돼지 난포의 크기에 따른 이용 가능한 난포란의 회수율에 대하여 조사하였고, 도축장에서의 난소 운반온도를 5, 25 및 38℃의 서로 다른 온도로 운반하였을 때 난핵포봉괴율(GVBD) 및 체외 성숙율(Met-II)에 미치는 영향을 구명하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 돼지 난소의 운반

난포란의 채취를 위한 난소는 도축 직후의 암돼지(체중 120 kg 내외)로부터 적출하여 100 IU/ml의 penicillin G(Sigma, USA)와 100 µg/ml의 streptomycin G(Sigma, USA)를 첨가한 멸균생리식염수(0.9% NaCl)로 실험설계에 따라 5, 25 및 38℃의 생리식염수가 충만된 각각의 보온병에 침지하여 90분 이내에 실험실로 운반하였다.

2. 공시난포란의 채란

39℃의 신선 멸균생리식염수로 난소 표면을 2~3회 세척하여 혈액 등의 이물질을 제거한 다음, 39℃의 온수조에 보관하면서 실험에 공시하였다. 난포란의 채취는 18gauge의 주사침이 장착된 10 ml의 주사기로 실험설계에 따라 2 mm 이하, 2~5 mm 및 5 mm 이상의 3종류로 난포크기에 따라 분리하여 난포란을 회수

하였다. 회수된 난포란은 난구세포층이 전체적으로 치밀하고 넓게 분포된 A형 난포란, 난구세포층이 넓게 분포되지 않고 부분적으로 상실된 B형 난포란 및 난구세포층이 거의 부착되어 있지 않은 C형 난포란으로 구분하였다. 난소온반 온도에 따른 체외성숙율의 차이를 조사하기 위한 처리구에서는 난포직경 2~5 mm의 포상난포를 연속적으로 찢어 난포액과 함께 난포란을 흡인하였으며 이것을 15 ml 원심분리관으로 옮겨 39°C의 온수조에서 5~10분간 정치시켜 난포란의 침전을 유도하였다. 다음에 침전물만을 취하여 1cm 간격으로 방안이 표시된 87×15 mm 페트리접시(petri dish)에 넣고, 4 mg/ml(w/v) BSA(bovine serum albumin, Fraction V, Sigma, USA)가 첨가된 PBS와 희석하여 실제현미경(20~40×)하에서 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 부착되고 난세포질이 균일한 난포란을 선별하여 체외성숙에 공시하였다.

3. 체외성숙 배양액

본 실험에서 사용된 체외성숙 배양액은 TCM-199(Gibco, USA)를 기본배양액으로 하여 0.6 mM cysteine, 0.2 mM Na-pyruvate, 10 µg/ml FSH, 1 µg/ml estradiol-17β, 3.05 mM glucose(Sigma, USA), 0.91 mM Na-pyruvate, 2.92 mM Ca-lactate, 0.60 mM L-cysteine, 100 IU/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin sulfate 및 FBS(Gibco 16000-044) 10% 첨가하여 pH 7.4, 삼투압 290~300 mOsmol로 조정하여 사용전에 0.22 µm millipore filter(MFS, USA)로 여과·멸균하여 39°C, 5% CO₂, 95% 공기, 100% 습도의 CO₂ 배양기에서 10~12시간 동안 평형시킨 후 사용하였다.

4. 난포란의 체외성숙배양

난포란의 체외성숙은 35 mm plastic dish(Corning, USA)에 200 µl의 체외성숙배양액 drop을 만들어 39°C, 5% CO₂, 95% 공기, 100% 습도로 조절된 CO₂ 배양기내에서 2~3시간 동안 평형시킨 후, 채취된 난포란을 체외성숙용 배양액으로 3차례 세척하여 drop 당 10~15개의 미성숙 난포란을 적하하여 실험설계에 따라 36, 40, 44 및 48시간 동안 배양하여 성숙을 유도하였다.

5. 체외성숙 난포란의 염색 및 성숙판정

각각의 배양시간동안 성숙배양시킨 난포란을 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법(Rapid Staining Method)으로 염색하여 난포란의 핵성숙단계를 비교 판정하였다.

염색방법은 먼저, 0.3%의 hyaluronidase(IV-S, Sigma USA) 용액에 성숙배양이 완료된 난포란을 옮겨 1~2분간 hyaluronidase 처리를 한 후, 직경이 난포란의 크기와 비슷한 미세피펫으로 pipetting하여 난구세포를 완전히 제거한 다음 5%(v/v) FBS가 함유된 PBS로 2~3회 세척하였다. 멸균 slide glass 위에 난포란 10~20개를 적하한 다음, cover slip으로 덮고, 난포란의 부피로 생긴 cover slip과 slide glass의 틈으로 고정액(glacial acetic acid : absolute ethanol=1 : 3)을 흘리는 방법으로 5~10분간 고정을 하였다. 고정이 끝난 난포란의 염색은 염색액(basic fuchsin staining solution)을 고정액과 같은 방법으로 주입하여 2~3분간 염색을 실시한 후, 탈염제(glacial acetic acid : distilled water : glycerol=1 : 3 : 1)를 흘려 난세포질 이외의 염색액을 제거시킨 다음, 위상차현미경(×1,000)하에서 난포란의 핵성숙 단계를 판정하였다. 핵성숙 단계의 판정은 Hunter와 Polge(1966)의 방법에 준하여 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 난포의 크기에 따른 난포란의 회수율

전체 난소 169개에서 실험에 공시된 가시난포의 개수는 Table 1에서 보는 바와 같이 각 난포의 크기별로 2 mm 이하가 1,996개, 2~5 mm가 1,670개 그리고 5 mm 이상인 난포가 137개로서 총 3,803개였으며, 난소 1개당 공시난포의 수는 22.5개로 조사되었다. 한편, 각 난포 크기별로 회수된 난포란의 수는 2 mm 이하, 2~5 mm 및 5 mm 이상의 난포가 각각 872개, 464개 및 28개로서 가시난포 3,803개에서 총 1,364개의 난포란이 회수되었다. 이 가운데 난포란의 체외성숙 실험에 이용할 수 있는 난포란은 A형 및 B형 난포란인데, 실험에 공시한 난소 169개중 395개가 회수되어 난소 1개당 2.4개였으며, 회수된 전체 난포란 1,364개중 이용 가능한 난포란은 395개로서 그 비율은 29.6%였다. 한편, 돼지의 체외수정실험에서 일반적으로 이용되는

Table 1. Distribution of 3 different size of follicles of 169 ovaries

Follicle size(mm)	No. of follicle	Type of oocyte-cumulus complex ¹			Total(%)	No.(%) of A, B type ²
		A	B	C		
<2	1,996	50	147	675	872(43.7)	197(22.6)
2 to 5	1,670	58	125	281	464(27.8)	183(39.4)
>5	137	7	8	13	28(20.4)	15(53.6)
Total	3,803	115	280	969	1,364(35.9)	395(29.0)

¹ A : cumulus-enclosed oocytes, completely.

B : corona-enclosed oocytes.

C : cumulus-denuded oocytes, nearly.

² A, B type / Total

난포의 크기(2~5 mm) 이외에 2 mm 이하 난포에서도 A, B형 난포란의 회수율이 높은 것으로 나타났다.

돼지에서는 난포크기에 따른 난포란의 형태 및 회수율에 관하여 보고된 바가 없는데, 소를 대상으로 Armstrong 등(1992)이 보고한 결과를 보면 난소 1개 당 2 mm 이상 되는 난포의 수가 8.7~14.5개, 회수된 난포란의 수가 3.8~5.3개였으며, 그 중 체외수정실험에 이용될 수 있는 A, B형 난포란의 회수율은 39~41%였다고 보고하였다.

2. 난소의 운반온도에 따른 난포란의 체외성숙률

도축 직후의 난소를 채취하여 5℃의 멸균생리식염수에 침지하여 운반한 미성숙난포란의 난핵포 붕괴율(germinal vesicle breakdown, GVBD)와 체외성숙률은 Table 2와 같다.

난핵포 붕괴율은 36, 40, 44 및 48시간에서 각각 32.

5, 28.2, 22.6 및 25.9%로서 시간별로 유의차가 인정되지 않았으며, 대부분의 난포란이 난핵포(germinal vesicle, GV) 단계에 멈췄으며, 난핵포 붕괴가 일어난 난포란도 소수(2.3~3.5%)만이 제1감수분열 중기(first meiotic division metaphase, Met- I)까지만 발달하여 제2감수분열 중기(second meiotic division metaphase, Met- II) 즉, 배란직전의 성숙난자까지 발달하지 못하였다.

따라서 난소를 5℃로 운반할 경우 배란 직전의 성숙난자까지 체외에서 성숙시킬 수 없음이 입증되었다.

돼지 난소의 운반온도를 25℃로 하여 체외성숙을 유도하였을 때 난핵포 붕괴율과 체외성숙율은 Table 3과 같다.

성숙배양액에 36, 40, 44 및 48시간동안 배양하였을 때 난핵포 붕괴율은 각각 81.0, 90.0, 91.7 및 92.9%로서 각 처리구간에 유의성은 인정되지 않으나 40시간

Table 2. Maturation of porcine oocytes at 5℃ transportation temperature of ovary

Culture time(h)	Total no. of oocytes examined	No. of oocytes at the stages of ¹						Percentage of GVBD	Maturation rate(%) ²
		GV ³	Pro- I	Met- I	Ana- I	Tel- I	Met- II		
36	80	54	24	2	-	-	-	32.5	0
40	85	61	24	-	-	-	-	28.2	0
44	84	65	17	2	-	-	-	22.6	0
48	85	63	19	3	-	-	-	25.9	0

¹ GV : germinal vesicle stage, Pro I : first prometaphase, Met I : first metaphase, Ana I : first anaphase, Tel I : first telophase, Met II : second metaphase.

² Percentage of oocytes reached Met- II.

³ The data included degeneration oocytes.

Table 3. Maturation of porcine oocytes at 25°C transportation temperature of ovary

Culture time(h)	Total no. of oocytes examined	No. of oocytes at the stages of ¹						Percentage of GVBD	Maturation rate(%) ²
		GV ³	Pro- I	Met- I	Ana- I	Tel- I	Met- II		
36	84	16	2	14	6	3	43	81.0	51.2 ^b
40	80	8	—	5	2	2	63	90.0	78.8 ^a
44	84	7	2	5	2	4	64	91.7	76.2 ^a
48	84	6	2	7	1	2	66	92.9	78.6 ^a

¹ GV ; germinal vesicle stage, Pro I ; first prometaphase, Met I ; first metaphase, Ana I ; first anaphase, Tel I ; first telophase, Met II ; second metaphase.

² Percentage of oocytes reached Met- II.

³ The data included degeneration oocytes.

^{ab} Means in the same column with different superscript differ significantly(P<0.05).

이상의 처리구에서 90% 이상의 높은 난핵포 붕괴율을 나타냈으며, 미성숙난자의 체외성숙률은 각 처리별로 51.2, 78.8, 76.2 및 78.6%로서 40시간 동안 성숙배양하였을 경우가 가장 높은 성적을 나타냈다.

이와 같은 결과는 Funahashi와 Day(1993a)의 돼지난소 운반온도를 25°C로 하여 체외성숙을 유도하였을 때 30, 40 및 50시간에서 난핵포 붕괴율이 각각 98.3, 98.2 및 94.6%였고 성숙율(Met- II)은 각각 37.9, 76.4 및 83.9%라고 한 보고, Kikuchi 등(1993)의 46시간 체외성숙을 유도하였을 때 체외성숙률이 79%라는 보고, 그리고 Eng 등(1986)이 25~27°C로 난소를 운반하여 46~48시간 체외성숙을 유도하였을 때 성숙률이 71%라는 보고와는 일치하는 결과였고 Rosenkranz(1993)의 난소운반 온도를 20°C로 하였을 때

난구세포 평화도가 48%, 체외성숙율이 60%라는 보고보다는 성숙률이 높은 결과였다. 그러나, Funahashi와 Day(1993c)가 25°C로 운반하여 40시간동안 체외성숙을 유도하였을 때 난핵포 붕괴율이 99%였고 체외성숙률이 88%였다는 보고와 Funahashi와 Day(1993b)가 40시간 체외성숙을 유도하였을 때 체외성숙률이 90%라고 보고한 결과보다는 난핵포 붕괴율 및 체외성숙률이 다소 낮은 결과였다.

난소운반 온도를 38°C로 하여 체외성숙을 유도하였을 때 난핵포 붕괴율과 체외성숙율은 Table 4에서 보는 바와 같다.

성숙배양액에 36, 40, 44 및 48시간동안 성숙시켰을 때 난핵포 붕괴율은 각각 93.9, 96.5, 96.5 및 95.3%로서 각 처리구간에 유의성은 인정되지 않으나 40시간

Table 4. Maturation of porcine oocytes at 38 °C transportation temperature of ovary

Culture time(h)	Total no. of oocytes examined	No. of oocytes at the stages of ¹						Percentage of GVBD	Maturation rate(%) ²
		GV ³	Pro- I	Met- I	Ana- I	Tel- I	Met- II		
36	82	5	1	12	8	5	51	93.9	62.2 ^b
40	86	3	2	5	—	—	76	96.5	88.4 ^a
44	85	3	2	6	2	—	72	96.5	84.7 ^a
48	86	4	3	4	—	1	74	95.3	86.0 ^a

¹ GV ; germinal vesicle stage, Pro I ; first prometaphase, Met I ; first metaphase, Ana I ; first anaphase, Tel I ; first telophase, Met II ; second metaphase.

² Percentage of oocytes reached Met- II.

³ The data included degeneration oocytes.

^{ab} Means in the same column with different superscript differ significantly(P<0.05).

이상의 처리구에서 95% 이상의 높은 난핵포 붕괴율을 나타냈으며, 미성숙난자의 성숙률은 시간별로 62.2, 88.4, 84.7 및 86.0%로서 40시간 동안 성숙을 유도하였을 때 가장 높은 성숙률을 나타냈다.

이와 같은 결과는 Yoshida 등(1993a)이 난소 운반 온도를 35℃로 하여 운반하여 40~44시간 동안 체외 성숙을 유도하였을 때 체외성숙률이 82%라고 한 보고 및 Sawai 등(1997)이 39℃로 난소를 운반하여 36 및 48시간동안 체외성숙을 유도하였을 때 성숙률이 57%와 88%라는 보고와는 일치하는 결과였고, Yoshida 등(1993b)이 난소를 35℃로 운반하여 36시간동안 체외성숙을 유도하였을 때 성숙률이 94%라는 보고 및 Yoshida 등(1992)이 10%의 돼지난포액(porcine follicular fluid, pFF)을 성숙배양액에 첨가하여 성숙을 유도하였을 때 성숙률이 92%라는 보고보다는 다소 낮은 결과였으나, 번 등(1989)이 37~39℃로 난소를 운반하여 40시간동안 체외성숙을 유도하였을 때 성숙률이 58.8%라는 보고 및 가 등(1995)이 39℃로 난소를 운반하여 TCM-199을 성숙배양액으로 하여 42~44시간동안 체외성숙을 유도하였을 때 65.8%가 제2성숙분열 중기에 도달하였다는 연구보고보다는 높은 체외성숙률을 나타냈다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 지금까지의 도축장에서의 난소운반은 38℃에서 실시되어 왔으나 25℃에서의 운반도 가능성을 알

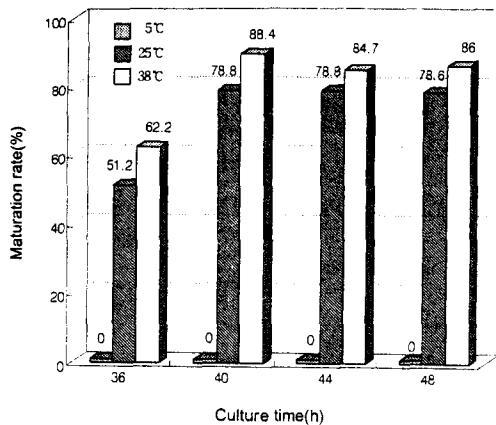


Fig. 1. Effect of *in vitro* maturation of porcine immature oocyte at ovary transportation temperature from slaughter house

수 있었다.

IV. 적 요

본 연구는 돼지 난포의 크기에 따른 난포란의 회수율에 대하여 조사하였고, 도축장에서 난소운반 온도가 난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 구명하고자 실시하였는 바 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 난소 1개당 난포의 수는 22.5개, A·B형 난포란(A형 난포란 : 난구세포층이 전체적으로 넓게 분포된 난포란, B형 난포란 : 난구세포층이 부분적으로 상실된 난포란)의 수는 2.4개였는데, 이는 전체 회수난포란중 29.6%를 차지했다.
2. 5℃로 운반한 난소 채취한 미성숙난포란의 난핵포 붕괴율은 체외성숙배양 36, 40, 44 및 48시간에서 각각 32.5, 28.2, 22.6 및 25.9%로서 시간별로 유의차가 인정되지 않았으며, 대부분의 난포란이 난핵포(geminal vesicle, GV) 단계에서 발달이 정지되었다.
3. 25℃로 운반한 난소에서 채취한 미성숙난포란을 36, 40, 44 및 48시간동안 배양하였을 때 난핵포 붕괴율이 각각 81.0, 90.0, 91.7 및 92.9%였으며, 체외성숙률은 각 처리시간별로 51.2, 78.8, 76.2 및 78.6%였다.
4. 38℃로 운반한 난소에서 채취한 미성숙난포란을 36, 40, 44 및 48시간동안 배양하였을 때 난핵포 붕괴율이 각각 93.9, 96.5, 96.5 및 95.3%였으며, 미성숙난자의 성숙률은 각 처리별로 62.2, 88.4, 84.7 및 86.0%였다.
5. 이상의 결과를 종합해 볼 때 난소를 25℃와 38℃로 운반했을 때 미성숙난포란의 성숙률에는 유의적인 차이가 없었다.

V. 인용문헌

1. Armstrong, D. T., P. Holm, B. Irvine, B. A. Petersen, R. B. Stubbings, D. Mclean, G. Stevens and R. F. Seamark. 1992. Pregnancies and live birth from *in vitro* fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration, *Theriogenology*, 38:667-

- 678.
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. Bousquet, D., C. Milovanov, J. C. Bell, J. Drocher and L. C. Smith. 1994. Nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes aspirated from large follicles in superovulated heifers. *Theriogenology*, 172. Abstr.
 4. Byun, T. H., S. H. Lee and H. B. Song. 1991. Development of a rapid staining method for the oocytes from domestic animals. *Kor. J. Anim. Sci.*, 33:25-31.
 5. Byun, T. H., and S. H. Lee. 1992. Morphological and cellular criteria ovaries, follicles and oocytes for *in vitro* maturation in the pig. *Kor. J. Emb. Trans.*, 7:97-110.
 6. Channing, C. P. and Tsafiri. 1978. Regulation of ovulatory processes : Ovum maturation, follicular rupture and luteinization. Plenum Press, New York.
 7. Edward, R. G. 1965. Maturation of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey, and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-352.
 8. Eng, L. A., E. T. Konegay, J. Huntington and T. Wellman. 1986. Effects incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 76:657-662.
 9. Funahashi, H. and B. N. Day. 1993a. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 98:179-185.
 10. Funahashi, H. and B. N. Day. 1993b. Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 99:97-103.
 11. Funahashi, H. and B. N. Day. 1993c. Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, 39:965-973.
 12. Funahashi, H., T. T. Stumpf, T. C. Cantley, N. H. Kim and B. N. Day. 1995. Pronuclear formation and intracellular glutathione content of *in vitro* matured porcine oocytes following *in vitro* fertilization and/or electrical activation. *Zygotes*, 3:273-281.
 13. Hunter, R. H. and C. Polge. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J. Reprod. Fert.*, 12:525-531.
 14. Kikuchi, K., T. Nagai, J. Motlik, Y. Shioya and Y. Izaike. 1993. Effect of follicle cells on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology*, 39:593-599.
 15. Leibfried, M. L. and N. L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 48:76-86.
 16. Linder, G. M. and R. W. Right, Jr. 1978. Morphological and quantitative aspects of the development of swine embryos *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 46:711-717.
 17. Motlik, J., N. Crozet and J. Fulka. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fert.*, 72:323-328.
 18. Nagai, T., J. Ding and R. M. Moor. 1993. Effects of follicle cells and steroidogenesis on maturation and fertilization *in vitro* of pig oocytes. *J. Exp. Zool.*, 266:146-151.
 19. Naito, K., and Y. Toyoda. 1992. Comparison of histone H1 kinase activity during meiotic maturation between two types of pig oocytes matured in different media *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 47:43-47.
 20. Pincus, G., and E. V. Enzmann. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 62:655-

21. Racowsky, C. 1985. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. *J. Reprod. Fert.*, 74: 9-24.
22. Racowsky, C. 1991. Gamete resources : Origin and production of oocytes. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 22-82.
23. Rosenkranz, C. 1993. Low temperature(20℃) during treatment porcine ovaries improves *in vitro* maturation of COCs. *J. Reprod. Fert.*, 11:64(abstract 118).
24. Sawai, K., H. Funahashi, and K. Niwa. 1997. Stage-specific requirement of cysteine during *in vitro* maturation of porcine oocytes for glutathione synthesis associated with male pronucleus formation. *Biol. Reprod.*, 57:1-6.
25. Wang, Z. K., P. H. Wei, J. Z. Wang, C. Lei and M. Q. Kou. 1992. Maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 37:733-739.
26. Yoshida, M. and Y. Kojima. 1989. Male pronuclear formation by boar spermatozoon with hairpin-curved tail in zona-free hamster egg. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51(2):428-430.
27. Yoshida, M., K. Ishigaki and V. G. Pursel. 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. & Develop.*, 31:68-71.
28. Yoshida, M., K. Ishigaki, T. Nagai, M. Chikyu, and L. G. Pursel. 1993a. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes : Relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol. Reprod.*, 49:89-94.
29. Yoshida, M., Y. Mizoguchi, K. Ishigaki, T. Kojima and T. Naga. 1993b. Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 39: 1303-1311.
30. 가학현, 정구민, 한정호, 임경순. 1995. Gel filtration에 의해 분획된 소태아혈청과 돼지 난포액이 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 효과. *한국가축번식학회지*. 19(4):251-258.
31. 변태호, 심금섭, 송해범. 1989. 배양액의 종류가 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 영향. *한국축산학회지*. 31(6):363-372.
32. 이장희, 김창근, 정영채, 박충생. 1994. 정자처리와 공배양이 체외성숙된 돼지 난포란의 분할에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*. 9:269-277.
33. 정형민. 1993. 형질전환동물의 생산을 위한 돼지난포란의 체외발생에 관한 연구. *건국대학교 박사학위논문*. 13-23.

(접수일자 : 1998. 4. 20. /채택일자 : 1998. 5. 25.)