

## 過排卵處理後의 經過時間이 생쥐 卵子の 核成熟과 體外受精에 미치는 影響

李相鎮·鄭吉生

建國大學校 畜産大學

## Nuclear Maturation and *In Vitro* Fertilization of Mouse Eggs Recovered at Various Times after Superovulation

Lee, S.J. and K.S. Chung

College of Animal Husbandry Kon-Kuk University

### ABSTRACT

Mouse eggs recovered from oviducts at one hourly intervals between 10 and 20 hours after administration of hCG were fixed, stained and then investigated the rate of *in vitro* fertilization and nuclear maturation.

In case of out-bred ICR mice, ovulations were occurred between 11 and 13 hours after hCG injection. The stages of *in vivo* maturation of eggs recovered from female mice at various times after hCG injection were metaphase I, anaphase I, telophase I and metaphase II. However the majority was metaphase I (17.6 to 44.4%) and metaphase II(42.9 to 80.0%) stage. When the eggs were inseminated with epididymal spermatozoa, the fertilization rate was declined as the egg recovery time after hCG administration was delayed. That is, the proportion of eggs undergoing fertilization became higher(68.1 to 77.4%) in the eggs at 12 to 15 hr after injection of hCG than those(17.5 to 56.4%) at 16 to 20 hr after injection of hCG.

Also, when nuclear maturation of the unfertilized eggs was observed at 8 hours after insemination, the majority was in metaphase I and metaphase II and no anaphase I and telophase I were observed.

### I. 緒論

哺乳動物의 體外受精에 必要한 諸般條件 즉 培地의 組成, 培養條件, 精子의 濃度, 精子의 受精能獲得方法 그리고 卵子の 回收方法 등이 確立됨에 따라 排卵된 成熟卵子是 물론 卵巢에서 抽出된 未成熟卵子の 體外成熟과 受精도 可能하게 되어 受精의 經視的 觀察도 容易하게 되었다(Donahue, 1968, 1972; Iwamatsu 와 Chang, 1970, 1971, 1972;

Gates, 1971; Miyamoto 와 Chang, 1973 a, b; Yanagimachi, 1974; Niwa 等, 1975, 1980; Kaleta, 1977; Tsafiriri, 1978; Sato와 Blandau, 1979; Siddiquey와 Cohen, 1982; Choi 等, 1987; Smith와 Lodge, 1987; 豊田·裕 等, 1971).

哺乳動物 卵子の 體外受精에 있어서, 생쥐의 卵子是 操作이 簡單하고 再現性이 높아서 比較的 높은 體外受精率을 얻고 있지만, 使用하는 생쥐의 系統에 따라 體外受精率에는 상당한 差異가 있다. 즉

Parkening과 Chang(1976)은 C 57 BL/6 와 CD-1 系統의 생쥐에서, Fukuda 等(1979)은 北美産 흰발 생쥐에서, 그리고 Kaleta(1977)는 CBA/kw, C57 BL/kw, F<sub>1</sub> hybrid, KP 및 KE 系統의 생쥐에서, 精子和 卵자의 遺傳子型에 따른 體外受精率의 差異를 報告한 바 있다. 또 Polanski(1986)는 CBA와 KE 系統의 생쥐에서 回收된 卵자의 核成熟도가 一定하지 않다고 報告하였다.

이러한 點을 감안할때, 安定된 높은 體外受精率을 얻기 위해서는 發達段階가 一定한, 다시 말해서, 第二減數分裂 中期의 卵자를 體外受精에 供與하는 것이 바람직하다고 하겠다.

本 研究에서는, 생쥐에 있어서 排卵時의 核成熟程度의 差異가 體外受精時, 受精率에 어떤 影響을 미치는지를 糾明하기 위하여, 國內에서 飼育되고 있는 ICR 系統의 생쥐를 過排卵 處理하여 時間別로 回收한 다음, 排卵된 卵자의 核成熟도와 體外受精率과의 關係를 糾明하고자 試圖하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 實驗動物

實驗動物은 韓國科學技術院에서 購入한 ICR 系統의 생쥐로 雌性 생쥐는 4~6 週齡, 體重은 15~25 g 이었으며, 雄性 생쥐는 10~14 週齡, 體重은 30~45 g 이었다.

日照時間은 14 時間(午前 8 時~午後 10 時)으로 調節하였으며, 固型飼料과 食水는 無制限, 給與하였다.

### 2. 培養液

精子處理와 體外受精用 培養液은 NaCl : 5.7190 g/l, KCl : 0.1060 g/l, MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O : 0.0960 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O : 0.1290 g/l, CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O : 0.2620 g/l, NaHCO<sub>3</sub> : 2.1010 g/l, Na-lactate : 4.6510 g/l, Glucose : 1.0000 g/l, Na-pyruvate : 0.0520 g/l 에 抗生劑와 3 mg/ml 의 BSA (Sigma)를 함유한 修正 Tyrode 液을 使用하였다. 이 培養液의 pH는 7.3~7.4, 滲透壓은 290~300 mOSM 로 調整하였으며, 使用直前에 0.45 μm 의 Millipore Filter (German Science, Inc., U.S.A)를 使用하여 濾過除菌한 다음, 少量으로 分

注하여 4°C 냉장고에서 2 週日 동안 保管하면서 使用하였다. 이때 排卵된 卵자의 卵丘細胞를 除去하기 위하여 前述한 修正 Tyrode 液에 1 mg/ml 의 Hyaluronidase (Sigma)를 添加하여 使用하였다.

## 3. 體外受精

### 1) 配偶子の 準備

#### (1) 精자의 處理

雄性 생쥐를 屠殺한 後, 精巢上體尾部만을 剔出하여 培養液 小滴(0.4 ml)이 들어 있는 組織培養用 petri dish (Falcon, U.S.A)내의 流動 Paraffin oil 속의 沈滴한 다음, 40~60 倍의 實體顯微鏡下에서 精巢上體尾部를 切開해서 漏出된 精子塊를 培養液 小滴으로 誘導하여 精자를 浮遊시켰다. 이 精子 浮遊液은, 精자의 受精能獲得을 위하여, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 空氣條件下的 CO<sub>2</sub> 培養器內에서 1.5~2 時間 동안 培養하였다.

#### (2) 過排卵 處理와 卵자의 回收

雌性 생쥐의 腹腔內에 5 IU 의 Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG : Intervet, Holland)을 注射한 다음, 48 時間째에 동일한 方法으로 5 IU 의 Human Chorionic Gonadotropin (HCG : Sigma, U.S.A)을 注射하여 過排卵 處理를 實施하였다. HCG 注射後, 10 時間부터 20 時間까지 每 1 時間 間隔으로 생쥐를 屠殺하여, 外科的인 方法으로 卵管을 剔出した 후, 卵管에 附着된 不純物을 除去하고, 體外受精을 위한 培養液 小滴(0.4 ml)이 들어 있는 組織培養用 Petri dish 내의 流動 Paraffin oil 속으로 옮겨서, 40~60 倍의 實體顯微鏡下에서 解剖針을 使用하여 卵管膨大部에서 卵丘細胞에 둘러쌓인 卵자를 回收하였다.

### 2) 授精

卵丘細胞에 둘러쌓인 卵자塊를 培養液 小滴(0.4 ml)에 1 個씩 옮긴 다음, 미리 準備된 精子 浮遊液 5~10 μl 를 加注하였다. 이때의 最終 精子濃度는 1~5 × 10<sup>6</sup>/ml 이었다. 이어 受精을 위하여 37°C 5% CO<sub>2</sub>, 95% 空氣條件의 CO<sub>2</sub> 培養器內에서 6 時間 동안 培養하였다.

## 4. 未受精卵자 및 受精卵자의 固定과 染色

排卵된 卵자의 一部分은 核成熟도를 觀察하기 위하여 0.1% Hyaluronidase 溶液內에서 5~10 分間 處理하여 卵丘細胞를 除去하였고, 受精에 供試한 卵자

는 培養 6 時間째에 回收하여 新鮮한 培養液으로 3~4 回 洗滌하여 卵子에 附着되어 있는 精子와 不純物을 除去하였다. 卵丘細胞의 精子를 除去한 未受精卵과 受精卵을 2.5% Glutaraldehyde 溶液에 沈澱하여 卵자의 透明帶를 固定하였다. 이어 4°C의 냉장고에서 10% 中性 formalin 溶液에 4~12 時間 沈澱하여 卵자의 細胞質을 固定한 後, 0.25%의 Lacmoid 溶液으로 5~10 分間 染色을 實施하였다.

### 5. 核狀의 判定

未受精卵의 核成熟度의 判定은 Donahue(1968, 1972)의 方法에 準하여 第一減數分裂의 前期(GV 段階), 中期(Metaphase I), 後期(Anaphase I), 終期(Telophase I) 및 第二減數分裂의 中期(Metaphase II)로 分類하였다. 또 卵자의 受精與否는 卵자의 細胞質內에 精子의 侵入이나, 膨化된 精子의 頭部, 雄性前核 및 精子의 尾部 등이 觀察되는 卵자는 受精卵으로 判定하였다.

## III. 結果 및 考察

### 1. 過排卵 및 卵자의 回收

過排卵 處理後, 相異한 時間에 卵자를 回收하였을 경우, 回收된 卵자의 時間別 分布는 Table 1 과 같다.

Table 1. Recovery rates of eggs collected at various times following superovulation

Hours after HCG injection	No. of females	Percentage of animals ovulated	Average no. of recovered eggs(±SE)
10	8	0	0.0
11	8	16.7	3.3
12	8	33.3	11.5±20.4
13	8	83.3	13.5±10.8
14	8	100	15.5±7.9
15	8	100	19.0±8.7
16	8	100	20.7±7.8
17	8	100	19.3±10.8
18	8	100	18.2±12.6
19	8	100	20.9±2.9
20	8	100	14.2±10.3

\* SE: Standard Error

먼저, HCG 注射後 10 時間부터 20 時間까지 每 1 時間 間隔으로 생쥐를 屠殺하여 排卵의 有·無를 觀察한 結果, HCG 注射後 10 時間째에는 어떤 생쥐에서도 排卵이 確認되지 않았다. 그러나 11 時間째 부터는 一部에서 排卵이 誘導되기 始作하였고, 時間의 經過와 더불어 排卵된 個體가 增加하여 14 時間째에는 100%의 個體에서 排卵이 誘導되었다.

한편, 回收된 卵자의 數는 HCG 注射後, 11 時間째에는 平均 3.3 個였으나 12 時間째에는 11.5 個로 增加하였으며 15 時間째 부터는 18.2 個~20.9 個로 거의 一定하게 回收되었다. 이러한 結果는 卵자가 排卵되어 卵管膨大部에 到達하는 時期가 HCG 注射後 11~13 時間째 라고 報告한 Gates(1971), Iwamatsu 와 Chang(1971) 및 Fraser(1979)의 報告와 一致하는 結果였다. 그러나 回收된 卵자數는 Gates(1971)와 Fraser(1979)의 그것보다 적었다.

이러한 差異는 생쥐의 系統上의 差異에 기인하는 것이라고 생각되며, 보다 많은 卵자의 回收를 위해서는, 投與하는 Hormone 의 量을 增加시킬 필요가 있다고 생각된다.

### 2. 回收 卵자의 形態

Table 2 는 回收된 卵자의 形態의 特徵을 나타내고 있다.

形態의 正當인 卵자의 比率은, HCG 注射後, 13~20 時間 사이에 回收한 경우는 90% 이상이

Table 2. Rates of normal eggs recovered at various times after HCG administration.

Hours after HCG injection	No. of eggs subjected to expts.	No. of normal eggs(%)	No. of abnormal eggs(%)
10	—	—	—
11	20	10(50.0)	10(50.0)
12	69	54(78.3)	15(21.7)
13	81	75(92.6)	6( 7.4)
14	93	92(98.9)	1( 1.1)
15	114	108(94.1)	6( 5.3)
16	114	104(91.2)	10( 8.8)
17	106	104(98.1)	2( 1.9)
18	109	94(86.2)	15(13.8)
19	115	70(60.9)	45(39.1)
20	85	79(92.9)	6( 7.1)

었다. 또 非正常的인 卵子는 HCG 注射後 12 時間째까지는 21.7%~50.0% 였지만 그후부터 17 時間째까지는 10% 이하였고 18 時間째 부터는 다시 10% 이상으로 增加하였다. 이상의 結果에서 볼 때, HCG 注射後 11 時間과 12 時間째에는 卵丘細胞가 除去된 退化卵子가 많이 回收되었는데 그 原因은 明確히 알 수 없다. 그리고, 18 時間째와 19 時間째의 異常卵子 比率이 相對적으로 높은 것은 排卵後 時間의 經過가 構體的으로 어떻게 作用하는지는 明確하지 않으나 Thibault 等(1975)과 Moor 等(1985)의 報告에 의하면 外因性 Hormone 이 關與하는 것으로 생각된다.

### 3. 回收된 卵자의 核成熟

回收된 卵자를 固定·染色하여 核의 成熟度를 觀察한 結果를 Table 3 에 提示하였다.

Table 3 에서 보는 바와 같이, 排卵된 대부분의 卵자는 第一減數分裂 中期(Metaphase I)에서 第二減數分裂 中期(Metaphase II)의 核狀을 가지고 있었으며 Germinal vesicle(GV)段階의 卵자는 觀察되지 않았다.

排卵된 卵자가 갖는 一般의인 核狀 즉 第二減數分裂 中期의 核狀을 가진 卵자는, HCG 注射後, 11~20 時間 사이에 42.9~80.0% 가 回收되었으며, 11~15 時間 사이의 것이, 그 이후의 것보다 높은 成績이었다.

한편, Metaphase I, Anaphase I 그리고 Telophase I 의 核狀을 가진 卵자는 HCG 注射後, 卵자를 回收하는 時間에 關係없이 대개 20~50% 程度였으나 HCG 注射後 20 時間째에 回收된 卵자의 그것은 約 10% 水準으로 낮았다. 또, HCG 注射後, 11~14 時間 사이에는 Anaphase I 과 Telophase I 의 核狀을 가진 卵자는 觀察되지 않았으나 그 以後에는 간혹 觀察되었다.

생쥐의 卵자는 排卵 直前に 第一減數分裂을 完了하고 第一極體를 放出하며, 第二減數分裂 中期에서 排卵이 일어난다고 報告(Gates : 1971, Donahue : 1968, 1972, Tsafiriri : 1978)되어 있으나, 排卵된 卵자의 成熟度는 생쥐의 系統에 따라 差異가 있다 (Kaleta : 1977, Polanski : 1986). 즉, CBA 系統의 생쥐에서는, HCG 注射後, 12 時間째에 第一極體를 가진 Metaphase II 의 卵자가 90% 以上인 것으로 觀察되었으나 KE 系統의 경우는, 排卵時에는 Metaphase I 이었지만, 排卵後 3~5 時間째에는 100% 가 Metaphase II 段階로 成熟했다고 한다.

그러나, 本 研究에 使用된 ICR 系統의 경우는, Table 3 에서 보는 바와 같이, HCG 注射後, 17 時間째까지는 Metaphase I 段階의 卵자가 28.2~44.4% 이었으나 그 이후에는 20% 로 줄어들었고, 20 時間째에는 10% 程度로 減少하였는데, 이는 Metaphase I 狀態의 卵자가 體內에서 계속 成熟한다는 것을 示唆한다.

Table 3. *In vivo* maturation of nucleus in mouse eggs recovered at various times after HCG administration

Hours after HCG inj.	No. of eggs examined	Stages of nucleus maturation(%)					No. of pathogenetic eggs(%)	No. of fragmented and degenerated eggs(%)
		GV	Meta. I	Ana. I	Telo. I	Meta. II		
10	—	—	—	—	—	—	—	—
11	5	—	—	—	—	4(80.0)	—	1(20.0)
12	38	—	11(28.9)	—	—	18(47.4)	—	9(23.7)
13	39	—	11(28.2)	—	—	27(69.2)	—	1( 2.6)
14	41	—	16(39.0)	—	—	25(61.0)	—	—
15	67	—	21(31.3)	2(3.0)	2( 3.0)	41(61.2)	—	1( 1.5)
16	63	—	28(44.4)	—	2( 3.2)	27(42.9)	2(3.2)	4( 6.3)
17	51	—	16(31.4)	2(3.9)	5( 9.8)	27(52.9)	—	1( 2.0)
18	60	—	16(26.7)	—	—	32(53.3)	1( 1.7)	11(18.3)
19	35	—	8(22.9)	1(2.9)	2( 5.7)	20(57.1)	—	4(11.4)
20	40	—	7(17.5)	—	—	33(82.5)	—	—



Fig. 1. Sequence of nuclear progression of eggs. All the eggs were recovered at various times after hCG injection and photographed after being stained with lacmoid. ( $\times 1000$ )

A ; Prometaphase I    C ; Anaphase I    E ; Prometaphase II  
 B ; Metaphase I    D ; Telophase I    F ; Metaphase II

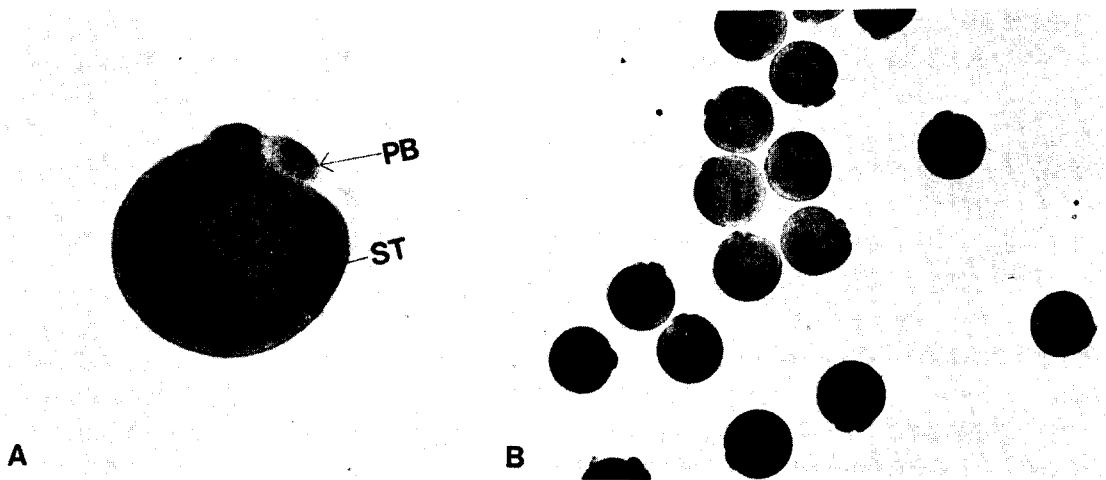


Fig. 2. Eggs with two pronuclei were recovered at 6 hours after insemination and photographed after being stained with lacmoid. (F ; Female pronucleus, M ; Male pronucleus, ST ; Sperm tail, PB ; Polar body) Approx.  $\times 400$  or  $\times 100$

#### 4. 排卵 卵子の 體外受精

排卵된 卵자를 體外에서 授精시킨 後, 6 時間째에 回收하여 受精狀態를 觀察한 結果를 Table 4 에서 보는 바와 같다.

Table 4 에서 보는 바와 같이, 回收된 卵자의 體外受精率은 HCG 注射後, 11 時間째의 卵자는 33.3%로 시작 成績을 보였으나, 12~15 時間째

의 卵자는 68.1~77.4%의 良好한 成績을 보였다. 그리고 16 時間째와 17 時間째의 卵자는 約 55%로 시작 떨어지는 경향을 보였으며, 20 時間째의 卵자는 20.0%로 매우 낮았다. 이와는 반대로 受精되지 않는 卵자의 比率은, HCG 注射後 13 時間째의 그것은 約 10% 水準이었지만 時間이 經過할수록 점차 增加하여 20 時間째의 그것은 66.7%로 높아졌

Table 4. *In vitro* fertilization of mouse eggs recovered at various times after superovulation

Hours after HCG inj.	No. of eggs subjected to expts.	No. of eggs fertilized (%)			No. of eggs unfertilized (%)	No. of pathenogenic eggs (%)	No. of fragmented and degenerated eggs (%)
		Total	Monospermic	Polyspermic			
10	—	—	—	—	—	—	—
11	15	5(33.3)	4(26.7)	1(6.7)	1(6.7)	1(6.7)	8(53.3)
12	31	24(77.4)	21(67.7)	3(9.7)	1(3.2)	—	6(19.4)
13	42	32(76.2)	29(69.0)	3(7.1)	5(11.9)	2(4.8)	3(7.1)
14	52	40(76.9)	39(75.0)	1(1.9)	11(21.2)	—	1(1.9)
15	47	32(68.1)	31(66.0)	1(2.1)	10(21.3)	—	5(10.6)
16	51	28(54.9)	25(49.0)	3(5.9)	19(37.3)	—	4(7.8)
17	55	31(56.4)	30(54.5)	1(1.8)	23(41.8)	—	1(1.8)
18	49	19(38.8)	18(36.7)	1(2.0)	28(57.1)	3(6.1)	—
19	80	14(17.5)	14(17.5)	—	25(31.3)	7(8.8)	34(42.5)
20	45	9(20.0)	8(17.8)	1(2.2)	30(66.7)	1(2.2)	5(11.1)

다.

또한, 單位發生 卵자의 比率은 回收時間에 關係없이 10% 미만이었으며, 退化 혹은 破片化된 卵자의 比率도 HCG 注射後, 13~18 時間 사이에 採取했을 때에는 10% 以下였다. 이러한 成績은 Hoppe 와 Pitts(1973), Niwa 와 Imai(1980), Fukuda(1979) 等 그리고 豊田·裕 等(1971)의 成績보다는 다소 低조하였으나, 이러한 成績의 差異는 體外受精에 使用된 생쥐의 遺傳의 差異 때문이라고 생각된다 (Kaleta ; 1977). 그리고 本 研究의 結果는 Iwamatsu 와 Chang(1977)의 報告와는 一致하는 것이었다.

한편, 授精後 6 時間째에 卵자를 固定·染色하여 受精되지 않은 卵자를 觀察하였던바, 대부분의 卵자는 Metaphase I 과 II의 狀態였다(Table 5). 즉, HCG 注射後, 15 時間 이후에 回收된 卵자중 Metaphase I 狀態에 있는 것의 比率은 15% 以上으로 특히 20 時間째는 30% 나 되었다. 또한, Metaphase II 段階의 卵자도 HCG 注射後, 16 時間 이후에 回收된 것은 15% 以上이었으며, 20 時間째는 35.6% 나 되었다.

이와 같은 結果는 Metaphase I 의 狀態에서, 排卵된 卵자가 排卵된 이후에는 卵管이나 體外에서 계속 成熟하기 때문이라고 생각된다. 그러나 Metaphase I 에서 Metaphase II 로 成熟된 卵자가 受精이 되지 않고 그대로 存在하는 理由는 分明하지 않으나 卵자의 老化和 關係가 있을 것으로 생각된다.

Iwamatsu 와 Chang(1972)에 의하면, 여러 段階의 核狀을 가진 排卵前 卵巢內的 未成熟 卵자를 受精에 供試하면, 精자의 侵入이 일어나고, 精자의 形態의 變化가 誘起되는 등, 前核段階의 受精卵으로 發達한다. 이러한 報告를 생각할 때, 本 研究의 結果에 대한 明確한 說明은 不可能하다. 다만, 排卵後의 卵자는 排卵前의 卵자보다 精자의 侵入을 遮斷하는 透明帶 反應이 強하다는 報告(Iwamatsu 와 Chang ; 1971)는 하나의 可能性을 提示한다고 하겠다.

以上の 結果를 綜合하여 考察할 때, 本 研究에 使用된 ICR 系統의 生쥐는, 多數의 卵자가 Metaphase I 의 狀態로 排卵되며, 이들 卵자의 상당수는 排卵後 6 時間째까지도 成熟이 제대로 일어나지 않는다는 것을 알 수 있다. 또, 排卵된 卵자의 核成熟 程度가 受精率에 대하여 커다란 影響을 미치는 것으로 사료된다.

#### IV. 摘要

過排卵 處理後, 相異한 時間에 回收한 ICR 系統의 生쥐 卵자를 固定·染色하여 核成熟度와 體外受精率을 檢討하였다.

通常, 卵자는 HCG 注射後, 11~13 時間째에 排卵이 誘導되기 始作하여 14 時間째는 모든 生쥐에서 排卵이 誘導되었으며, 排卵된 卵자의 核成熟度는 Metaphase I, Anaphase I, Telophase I 그리

Table 5. Distribution of unfertilized eggs observed at 8 hrs after insemination

Hours after HCG inj.	No. of eggs examined	No. of unfertilized eggs(%)	Stages of unfertilized egg maturation(%)				
			GV	Meta. I	Ana. I	Telo. I	Meta. II
10	—	—	—	—	—	—	—
11	15	1(6.7)	—	1(6.7)	—	—	—
12	31	1(3.2)	—	—	—	—	1(3.2)
13	42	5(11.9)	—	1(2.4)	—	—	4(9.5)
14	52	11(21.2)	—	4(7.7)	—	—	7(13.5)
15	47	10(21.3)	—	8(17.0)	—	—	2(4.3)
16	51	19(37.3)	—	11(21.6)	—	—	8(15.7)
17	55	23(41.8)	—	9(16.4)	—	—	14(25.5)
18	49	28(57.1)	—	9(18.4)	—	—	19(38.8)
19	80	25(31.3)	—	12(15.0)	—	—	13(16.3)
20	45	30(66.7)	—	14(31.1)	—	—	16(35.6)

고 Metaphase II의 핵상을 지니고 있었고, 주로, Metaphase I (17.5%~44.4%)과 Metaphase II (42.9~80.0%)의 卵子가 대부분이었다.

Metaphase I의 핵상을 가진 卵子는 時間의 經過와 더불어, 一部 成熟하는 傾向을 보였으나 約 20% 程度의 卵子는 HCG 注射後, 20 時間이 지나도 Metaphase I의 狀態였다.

한편, 精巢上體 精子를 使用하여 體外受精을 實施한 後, 6 時間째에 受精의 與否를 檢討한 結果, HCG 注射後, 12, 13, 14 및 15 時間째에 回收된 卵子의 그것은, 各各 77.4, 76.1, 76.9 및 68.1% 로 良好한 成績을 보였으며, 이후는, HCG 投與後, 卵子 採取時間의 經過와 더불어 점차 減少하는 傾向을 보였다. 또, 受精이 이루어지지 않은 卵子中에서 Metaphase I의 卵子가 많이 觀察되는 것으로 보아, 本 研究에 使用된 생쥐에서는, 排卵時에 多數의 Metaphase I 狀態의 卵子가 排卵되며, 이들은 卵管이나 *in vitro*에서도 完全한 成熟이 일어나지 않으며, 그로 인하여 體外受精率도 低調한 것으로 생각된다.

## V. 引用文獻

- Canipari, R., F. Palombi, M. Ruminucci and F. Mangia. 1984. Early programming of maturation competence in mouse oogenesis. *Dev. Biol.*, 102 : 519-524.
- Choi, T.S., M. Mori, K. Kohmoto and Y. Shoda. 1987. Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes matured *in vitro*., *J. Reprod. Fert.*, 79 : 565-568.
- Donahue, R.P. 1968. Maturation of the mouse oocyte *in vitro* : 1. Sequence and timing of nuclear progression. *J. Exp. Zool.*, 169 : 237-250.
- Donahue, R.P. 1972. Fertilization of the mouse oocyte : Sequence and timing of nuclear progression to the two-cell stage. *J. Exp. Zool.*, 180 : 305-318.
- Fukuda, Y., M.B. Maddock and M.C. Chang. 1979. *In vitro* fertilization of two species of deer mouse eggs by homologous or heterologous sperm and penetration of laboratory mouse eggs by deer mouse sperm. *J. Exp. Zool.*, 207 : 481-490.
- Fraser, L. R. 1979. Rate of fertilization *in vitro* and subsequent nuclear development as a function of the post-ovulatory age of the mouse eggs. *J. Reprod. Fert.*, 55 : 153-160.
- Gates, A.H. 1971. Maximizing yield and developmental uniformity of eggs. In Daniel, J.C. Jr(ed) : "Methods in mammalian embryology". San Francisco : WH Freeman, pp.64-75.
- Hoppe, P.C. and S. Pitts. 1973. Fertilization *in vitro* and development of mouse ova. *Biol. Reprod.*, 8 : 420-426.
- Iwamatsu, T. and M.C. Chang. 1971. Further investigation of capacitation of sperm and fertilization of mouse eggs *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 175-282.
- Iwamatsu, T. and M.C. Chang. 1971. Factors involved in the fertilization of mouse eggs *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 26 : 197-208.
- Iwamatsu, T. and M.C. Chang. 1972. Sperm penetration *in vitro* of mouse oocytes at various times during maturation. *J. Reprod. Fert.*, 31 : 237-247.
- Kaleta, E. 1977. Influence of genetic factors on the fertilization of mouse ova *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 51 : 375-381.
- Miyamoto, H. and M.C. Chang. 1973 b. Effect of osmolarity on fertilization of mouse golden hamster eggs *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 33 : 481-487.
- Miyamoto, H. and M.C. Chang. 1973 a. The importance of serum albumin and metabolic intermediates for capacitation of spermatozoa and fertilization of mouse eggs *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 32 : 193-205.
- Moor, R.M., Osborn, J.C. and I.M. Crosby. 1985. Gonadotropin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J. Reprod. Fert.*, 74 : 167-



- 172.
16. Niwa, K. and M.C. Chang. 1975. Fertilization of rat eggs *in vitro* at various times before and after ovulation with special reference to fertilization of ovarian oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 43 : 435-451.
  17. Niwa, K., H. Imai, C.I. Kim and A. Iritani. 1980. Fertilization *in vitro* of hamster and mouse in a chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.*, 58 : 109-114.
  18. Parkening, T.A. and M.C. Chang. 1976. *In vitro* fertilization of ova from senescent mice and hamsters. *J. Reprod. Fert.*, 48 : 381-383.
  19. Polanski, Z. 1986. *In vitro* and *in vivo* maturation rate of oocytes from two strains of mice. *J. Reprod. Fert.*, 78 : 103-108.
  20. Sato, K. and R.J. Blandau. 1979. Second meiotic division and polar body formation in mouse eggs fertilized *in vitro*. *Gamete Research*. 2 : 283-293.
  21. Siddiquey, A.D.S. and J. Cohen. 1982. *In vitro* fertilization in the mouse and the relevance of different sperm/egg concentrations and volumes. *J. Reprod. Fert.*, 66 : 237-242.
  22. Smith, A.L. and J.R. Lodge. 1987. Interaction of aged gametes : *in vitro* fertilization using *in vitro* - aged sperm and *in vivo* - aged ova in the mouse. *Gamete Research.*, 16 : 47-56.
  23. Thibault, C., M. Gerard and Y. Menezo. 1975. Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. *J. Reprod. Fert.*, 45 : 605-610.
  24. Tsafiriri, A. 1978. Oocyte maturation in mammals. Eds. Johnes, R.E. "The vertebrate ovary". pp. 409-442.
  25. Yanagimachi, R. 1974. Maturation and fertilization *in vitro* of guinea-pig ovarian oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 38 : 485-488.
  26. 豊田 裕・横山 峯介・星 冬四郎.1971. スウス卵子の 体外受精に 関する研究. I. 精巢上體 精子による 受精成績. 家畜繁殖誌 16 卷四號. 147-151.
  27. 豊田 裕・横山 峯介・星 冬四郎.1971. マウス卵子の 体外受精に 関する 研究. II. 精子 侵入時期に 及ばず 精子 体外培養の 効果. 家畜繁殖誌 16 卷 4 號. 152-157.