

韓牛에 있어서 卵胞卵의 體外成熟에 影響을 미치는 要因에 關한 研究

徐泰光 · 鄭範植 · 金圭鉉 · 全益秀 · 柳在雄 · 朴修奉 · 朴恒均

慶北大學校 農科大學

Study on Factors affecting *in vitro* Maturation of Follicular Oocytes in Korean Native Cattle

Suh, T.K., B.S. Jeong, K.H. Kim, I.S. Jeon, Z.Y. Ryou, S.B. Park and H.K. Park

College of Agriculture, Kyungpook National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the factors affecting maturation *in vitro* of follicular oocytes in Korean Native Cattle.

The bovine ovaries were obtained at a slaughter house and the follicular oocytes were recovered by aspirating the follicular fluid from the visible follicles of 3~6mm. The bovine oocytes were matured *in vitro* in TCM-199 containing FCS and hormones. The effects of TCM-199 salt type, number of oocytes per drop, incubation time and co-culture with granulosa cells on maturation of oocytes, were investigated.

The results obtained are summarized as follows.

1. The maturation rates of follicular oocytes cultured for 22, 25 and 28 hours in Hank's TCM-199 or Earle's TCM-199 were 59.3, 59.6, 80% and 80.0, 90.0, 93.7%, respectively. The maturation rate of follicular oocytes in Earle's TCM-199 was faster and higher than in Hank's TCM-199 ($P < 0.05$).
2. The maturation rates of oocytes were 54.5, 62.5 and 62.0% when cultured the oocytes number 10, 20 and 40 per 200 μ l drop for 18 hours.
3. The maturation of follicular oocytes in the Korean Native Cattle was induced at 14 hours culture, by giving the maturation rate of 90.0% after 20 hours.
4. The maturation rates were 63.3% and 66.7%, respectively when the oocytes were co-cultured with granulosa cells from medium-size follicles used immediately after recovery in the presence or absence of hormones added (0.02AU/ml FSH, 10 μ g/ml LH and 1 μ g/ml estradiol 17- β). When the oocytes were co-cultured with granulosa cells from medium-size follicles cultured for 3 days, the maturation rates were 20.8% and 76.2%, respectively ($P < 0.05$).
5. The maturation rate were 88.0% and 70.0%, respectively when the oocytes were co-cultured with granulosa cells from large-size follicles used immediately after recovery in the presence or absence of hormones added (0.02AU/ml FSH, 10 μ g/ml LH and 1 μ g/ml estradiol 17- β) ($P < 0.05$). When the oocytes were co-cultured with granulosa cells from large-size follicles cultured for 3 days, the maturation rates were 41.2% and 73.3%, respectively ($P < 0.05$).

I. 緒 論

家畜의 繁殖效率을 增進시키기 위한 한 방법으로서 多量의 受精卵을 간편하게 공급할 수 있는 體外受精技術은 生殖細胞에 대한 受精機轉의 究明과 不妊畜의 治療는 물론 이의 移植에 의한 급속한 家畜의 改良과 種雄畜의 受精能의 評價와 특정 品種의 생산, 多胎 생산과 系統保存등에 이용될 수 있다. 卵胞卵을 이용한 소의 體外受精技術에 있어서 卵胞卵 成熟은 受精 및 胚發生에 영향을 미치기 때문에 중요하며 소 卵胞卵의 體外成熟에 관한 研究는 1965년 Edwards의 보고 이후 卵丘細胞의 부착상태에 따른 卵胞卵의 선별, 培養조건 및 培養液의 組成에 관하여 주로 研究되었다.

卵胞卵의 體外成熟培養은 일반적으로 37~39°C, 5% CO₂조건에서 血清, gonadotropin, steroid 호르몬 등을 주로 첨가한 simple media 또는 complex media 를 사용하여 體外成熟을 유기시키며 complex media 로는 Ham's F-10 또는 TCM-199가 널리 이용되고 있다(Park, 1990). TCM-199는 Hank's 鹽液(Parrish 등, 1988) 또는 Earle's 鹽液(Brackett 등, 1989; Fukui, 1989)이 이용되며, 卵胞卵의 培養時間 및 培養液 小滴당 배양되는 卵胞卵의 數도 體外成熟과 受精후의 胚發生에 영향을 미친다(Kajihara 등, 1987; Leibfried-Rutledge 등, 1989). 卵胞卵 成熟에 있어서 顆粒膜細胞의 共培養은 受精率의 향상과 卵子の 發生能 증진에 기여하며(Critser 등, 1986; Lu 등, 1987, 1988), Critser 등(1986)은 顆粒膜細胞를 卵胞卵과 共培養했을 때 成熟率과 受精率은 對照區와 큰 차이가 없으나, 桑實胚期이상으로의 胚發生은 共培養한 경우만 일어났다고 報告하였다.

Motlik 과 Fulka(1981)는 顆粒膜細胞가 核 成熟을 3시간 정도 지연시킨다고 報告하였으며, Sirard와 Bilodeau(1990)는 顆粒膜細胞를 25×10⁶cells/ml 농도로 卵胞卵과 共培養한 경우 卵胞卵 成熟을 억제하며, 5~10×10⁶cells/ml 농도에서는 抑制作用이 적고, 7일간 培養된 顆粒膜細胞를 卵胞卵과 共培養했을 때에는 25×10⁶cells/ml 농도에서 卵胞卵의 成熟抑制作用이 있다고 報告하였다. 이와 같은 소 卵胞卵의 體外成熟에 관한 研究는 乳牛 또는 和牛에 대한 것이 대부분으로 韓牛 卵胞卵의 體外成熟에 관한 보고는 적은 실정이다.

따라서 본 研究는 屠殺 韓牛의 卵巢卵胞로부터 體外受精技術을 이용하여 受精卵移植에 이용할 수 있는 移植用 胚의 확보를 위한 技術確立의 基礎研究로서 卵胞卵의 體外成熟에 관한 實驗을 實施하여 약간의 成績을 얻었으므로 그 結果를 報告한다.

II. 材料 및 方法

1. 卵胞卵의 回收

本 시험에 供試된 卵胞卵은 屠畜場에서 屠殺되는 正常生殖器를 가진 韓牛암소의 卵胞로부터 回收하였으며, 卵巢는 0.9% 滅菌 生理食鹽水가 들어 있는 36~37°C의 保溫瓶에 浸漬하여 2시간 이내에 實驗室로 운반하여 卵胞卵을 회수하였다. 卵巢는 滅菌 生理食鹽水는 2~3회 洗滌後, 3~6mm 크기의 卵胞로부터 18G 주사침이 부착된 주사기로 卵胞液을 흡입하여 사-레에 분주하고, 5~10분간 장치한 다음 實體顯微鏡(Olympus X-Tr, Olympus, Japan)下에서 上層液을 일부 제거한 후 卵胞卵을 回收하였다.

2. 培養液

卵胞卵의 體外成熟을 위한 基本培養液은, 10% FCS(GIBCO, USA), 0.02 AU/ml FSH(Toshiba Pharm. Co., Japan), 10 µg/ml LH(Sigma, USA), 1 µg/ml estradiol-17β(Sigma, USA), 11 µg/ml sodium pyruvate(Sigma, USA), 100 IU/ml penicillin G(Sigma, USA) 및 50 µg/ml streptomycin sulfate(Sigma, USA)가 添加된 TCM-199(Earle's salt, Sigma, No. M5017, USA)를 이용하였으며 사용전 0.2 µm millipore filter(Gelman Sci., USA)로 濾過, 滅菌후 사용하였다.

TCM-199鹽液의 종류에 따른 卵胞卵의 成熟比較를 위한 培養液은 동일 함량의 添加劑를 넣은 TCM-199(Hank's salt, Sigma No. M0393, USA)을 이용하였으며 제조된 배양액은 38.5°C, 5% CO₂ 培養器에서 8~12시간 CO₂평형을 시킨 후 사용하였다.

3. 卵子の 準備

回收된 卵胞卵은 50~80배의 實體顯微鏡下에서 卵丘細胞가 치밀하고 두텁게 부착된 것을 선별하여 實驗에 이용하였다. 卵胞卵은, 사-레에 200 µl의 小滴을 만들고 paraffin oil로 피복하여 CO₂ 培養器내에서 8~12

시간 평형시킨 培養液 小滴내에 10, 20, 40개씩 넣고 38.5°C, 5% CO₂ 培養器에서 18시간 培養하였다. 배양시간에 따른 卵胞卵의 體外成熟은 6, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24시간 培養後 成숙도를 判定하였다.

4. 共培養

顆粒膜細胞는 卵胞의 크기에 따라 中卵胞(3~6mm)와 大卵胞(8~12mm)로 분류하여 채취하였으며(Canning과 Ledwitz-Rigby, 1975), 1×10⁶cells/ml 농도로 卵胞卵과의 共培養에 이용하였다.

顆粒膜細胞의 共培養은 中卵胞 및 大卵胞로부터 채취하여 준비된 顆粒膜細胞를 FSH, LH, estradiol-17β를 첨가하거나 첨가하지 않은 基本培養液에 주입하여, 각 小滴당 20개씩의 卵胞卵과 준비한 후 바로 共培養하거나 또는 顆粒膜細胞를 培養液 小滴에서 3일간 배양후 卵胞卵과 20시간 共培養하였다.

5. 體外成熟의 判定

體外成熟의 判定은 體外에서 배양된 卵胞卵을 0.1% hyaluronidase(Sigma, USA) 처리로 주위의 卵丘細胞를 제거한 다음 acetic alcohol(1:3)로 3일간 固定한 후 1% aceto-orcein(Merck, Germany)으로 染色하여, 核의 成숙도를 位相差顯微鏡(Olympus IMT-2, Japan)하에서 卵核胞期(GV), 제1成熟分裂 中期(MI), 後期(AI), 終期(TI) 및 제2成熟分裂 中期(MII)로 구분하였으며, M II에 도달된 卵子를 成숙난자로 判定하였다(金과 박, 1988; 宋, 1989).

III. 結果 및 考察

1. 成熟培養 鹽液의 種類

韓牛 卵胞卵을 鹽成分을 달리한 Hank's 液과 Earle's 液의 TCM-199培養液에 각각 22, 25, 28시간 體外培養했을 때의 體外成熟率은 Table 1과 같다.

卵胞卵을 Hank's 鹽液 및 Earle's 鹽液의 TCM-199 배양액에서 각각 22, 25, 28시간 배양했을 때 M II까지의 成熟率은 각각 59.3% 및 80.0%, 59.6% 및 90.0%, 80.0% 및 93.7%로서 Hank's 鹽液에서 보다 Earle's 鹽液에서 배양하는 것이 體外成熟 유기의 成熟率이 높았다(P<0.05).

이러한 시험결과는 15%의 ECS 또는 10% ECS, 10% FCS가 첨가된 Earle's 鹽液 TCM-199배양액에서 24시간 卵胞卵을 배양하여 각각 70.9%, 58.9% 및 61.3%의 成熟率을 보고한 Fukui(1989) 및 Fukui와 Ono(1989)의 결과보다 높은 성적으로서, 이는 첨가한 FCS 농도는 같으나 培養條件의 차이에 기인된 것으로 생각된다.

卵胞卵의 體外成熟 배양에는 Hank's 鹽液(Parrish 등, 1988) 또는 Earle's 鹽液(Brackett 등, 1989; Fukui, 1989; Fukui와 Ono, 1989)의 TCM-199 배양액이 이용되고 있으나, 25°C에서의 pH는 각각 6.9와 7.3이며 삼투압은 300mOsm.과 288mOsm.으로서(Sigma Co., 1990) 哺乳動物 卵子の 배양을 위한

Table 1. Effect of TCM-199 salt type on *in vitro* maturation of follicular oocytes

| Incubation time (hrs) | Type of salt | No. of oocytes | No. of oocytes matured to* | | | | | Maturation rate (%)** |
|-----------------------|--------------|----------------|----------------------------|----|----|----|-----|-----------------------|
| | | | GV | MI | AI | TI | MII | |
| 22 | Hank's | 59 | — | 11 | 9 | 1 | 35 | 59.3 ^a |
| | Earle's | 70 | — | 12 | — | 1 | 57 | 80.0 ^b |
| 25 | Hank's | 104 | — | 28 | 1 | 9 | 62 | 59.6 ^a |
| | Earle's | 80 | — | 8 | — | — | 72 | 90.0 ^b |
| 28 | Hank's | 80 | 1 | 14 | — | 1 | 64 | 80.0 ^a |
| | Earle's | 64 | — | 4 | — | — | 60 | 93.7 ^b |

* Oocytes degenerated after fixation were not included in the value.

** Oocytes progressed to M II were classified as matured.

^{a,b} Percentage followed by different letters within incubation time differ significantly (P<0.05).

Table 2. Effect of the number of oocytes per drop on *in vitro* maturation of follicular oocytes cultured for 18 hours

| No. of oocytes /drop | No. of oocytes* | No. of oocytes matured to | | | Maturation rate (%)** |
|----------------------|-----------------|---------------------------|----|-----|-----------------------|
| | | MI | TI | MII | |
| 10 | 99 | 33 | 12 | 54 | 54.5 |
| 20 | 112 | 22 | 20 | 70 | 62.5 |
| 30 | 100 | 32 | 6 | 62 | 62.0 |

* Oocytes degenerated after fixation were not included in the value.

** Oocytes progressed to M II were classified as matured.

No significant difference was found within the same column at the level of $P < 0.05$.

적정 pH는 7.3~7.4(Kane, 1988)이고 滲透壓은 285~310mOsm.(Bavister, 1981)임을 고려할 때, 본 연구결과에서 體外成熟率에 차이가 있는 것은 배양액의 pH, 鹽 조성 및 기타 요인에 기인된 것으로 생각되며, 韓牛 卵胞卵의 成熟培養에는 Hank's 鹽液보다는 Earle's 鹽液의 TCM-199배양액을 이용하는 것이 적합한 것으로 생각된다.

2. 培養液 小滴當 卵胞卵의 數

배양액 小滴當 10, 20, 40개의 卵胞卵을 18시간 배양했을 때 卵胞卵의 體外成熟率은 Table 2와 같다.

200 μ l의 배양액 小滴當 각각 10, 20, 40개의 卵胞卵을 배양했을 때 MII까지의 成熟率은 각각 54.5, 62.5 및 62.0%로서, 1小滴當 20개 및 40개의 卵胞卵의 배양이 小滴當 10개의 卵胞卵을 배양했을 때보다 成熟率이 다소 향상되는 경향을 나타냈으나 小滴當 10~40개 배양시의 成熟率간에는 유의적인 차이는 없었다.

卵胞卵의 體外成熟率에 있어서 배양액의 量과 배양되는 卵子數는 연구자에 따라 다르나, 본 시험결과는 Schellander 등(1990)의 LH, estradiol-17 β 와 20% FCS, 각 20%의 ECS 또는 FCS가 첨가된 TCM-199배양액 小滴當에서 20개의 卵胞卵을 26~28시간 배양했을 때 각각 88.4%, 75.1% 및 83.9%의 成熟率과 Fukuda 등(1990)의 FSH와 FCS가 첨가된 50 μ l의 小滴當 5개와 Sirard 등(1988)의 10개의 卵胞卵을 24시간 배양했을 때 각각 74%와 99%의 成熟率에 비해 낮은 성적이었다. 한편, Leibfried-Rutledge 등(1989)은 50 μ l 小滴當 20개 이상 배양했을 때 成熟率이 저하되며 또한 受精率도 저하된다고 보고하였는데

이는 본 시험결과와는 차이가 있었다.

배양액 小滴當 적합한 卵胞卵의 數는 각 연구자에 따라 다른데, Leibfried-Rutledge 등(1989)은 배양액 小滴當 卵胞卵의 數는 각 연구자에 따라 다른데, Leibfried-Rutledge 등(1989)은 배양액 小滴當 卵胞卵의 數를 증가함으로써 卵丘細胞 또는 顆粒膜細胞의 증가에 의해 M II까지의 成熟率이 지연되며, 이러한 성숙지연과 이에 따른 受精時期의 부적합에 의해 胚發生이 저하되는 결과를 가져올 수 있다고 보고하였다. 이러한 卵胞卵 數의 증가에 따른 성숙지연은 제한된 培養液 小滴當에서 卵胞卵의 성숙을 유지시키는 영양물질 또는 要因의 상대적 감소로 인해 성숙지연의 결과를 가져올 수 있다고 사료되나, 韓牛의 卵胞卵은 200 μ l 소적당 10~40개 범위가 體外成熟率면에서 적합한 것으로 생각된다.

3. 培養時間

한우 卵胞卵의 體外 培養時間에 따른 M II까지의 體外成熟率은 Table 3과 같다.

卵胞卵은 體外培養 후 6시간 이전에 제1成熟分裂이 개시되어 14, 16, 18, 20, 22, 24시간 배양때 M II까지의 成熟率은 각각 30.0%, 42.1%, 82.8%, 90.0%, 93.7% 및 93.3%로서 배양 14시간부터 M II까지의 성숙이 유기되었고 20시간 이후에는 成熟率에 있어서 큰 차이가 없었다.

이러한 결과는 卵胞卵의 體外에서의 成熟分裂의 개시 시간은 6시간 이내였다는 Motlik 등(1978)과 Greve 등(1983)의 결과와 대체로 일치하였다. 그러나, 본 시험결과는 卵胞卵의 體外培養 10시간까지의 대부분 GV 상태였으나 배양 후 16, 18, 20, 22, 24, 26시간의 成

Table 3. Maturation rate of follicular oocytes by incubation time

| Incubation time (hrs) | No. of oocytes | No. of oocytes matured to | | | | | Maturation rate (%)* |
|-----------------------|----------------|---------------------------|----|----|----|-----|----------------------|
| | | GV | MI | AI | TI | MII | |
| 6 | 60 | 8 | 52 | — | — | — | 0 |
| 10 | 64 | — | 64 | — | — | — | 0 |
| 12 | 80 | — | 72 | 8 | — | — | 0 |
| 14 | 80 | — | 36 | 16 | 4 | 24 | 30.0 |
| 16 | 76 | — | 16 | 8 | 20 | 32 | 42.1 |
| 18 | 105 | — | 18 | — | — | 87 | 82.8 |
| 20 | 80 | — | 8 | — | — | 72 | 90.0 |
| 22 | 80 | — | 5 | — | — | 75 | 93.7 |
| 24 | 90 | — | 6 | — | — | 84 | 93.3 |

* Oocytes progressed to M II were classified as matured.

成熟率は 각각 10.5%, 7.7%, 37.1%, 73.7%, 80.0% 및 84.0%로서 배양 19~20시간부터 성숙이 이루어져 23시간 이후에는 약 75.5%의 成熟率을 얻었다는 Süss 등(1988)의 결과와 卵胞卵을 TCM-199배양액에서 25시간 및 24~48시간 배양했을 때 각각 成熟率은 88%와 65.7%였다고 보고한 鄭 등(1990)과 金 등(1990)의 결과에 비해 성숙의 진행이 다소 빠른 경향을 나타냈다. 이는 培養溫度에 있어서 鄭 등(1990)과 金 등(1990)의 39°C, 宋(1989)의 37°C에 비해 본 시험에서는 38.5°C로서 培養溫度의 差異, 韓牛의 特性 등이 그 원인일 것으로 생각된다.

卵胞卵을 TCM-199 培養液에 배양했을 때 King 등(1990)은 65%, Kim 등(1990)은 63%의 體外成熟率을 보고하였으며, Fukuda 등(1990)은 24, 26, 28시간 배양했을 때 각각 74, 76, 84%의 成熟率을, Saeki 등(1990)은 24~26시간 배양시 93%의 成熟率을 보고하였다. 또한, Aoyagi 등(1988)은 16시간 배양했을 때 GV의 核膜이 소실되고 M II까지의 成熟率에는 차이가 없었으나 22시간에는 100%로서 유의적으로 成熟率이 향상되었고, 22~28시간에는 유의적인 차이는 없었으나 26시간 이후 退行하는 卵胞卵이 증가한다고 하였는데 본 시험결과와 비교할 때 卵胞卵의 成熟率은 體外培養 20시간 이후 거의 90% 수준으로서 배양시간의 경과에 따라 증가하는 경향은 대체로 일치하였다.

한편, Kajihara 등(1987)은 소 卵胞卵을 체외에서

20, 22, 24시간 배양후 受精시켰을 때 分割率이 각각 45.6, 59.4 및 59.5%로서 22시간과 24시간 배양한 卵胞卵의 分割率이 20시간 배양한 것에 비해 유의적으로 높다고 하였으며, Leibfried-Rutledge 등(1989)은 卵胞卵의 배양시간과 受精의 適期與否에 따라 胚發生에 영향을 미친다고 보고하였다.

따라서 본 연구 결과로 미루어 볼 때 韓牛 卵胞卵의 體外成熟은 200 μ l TCM-199 培養液 1滴에서 20~24시간 배양하는 것이 成熟率면에서 적합한 것으로 생각된다.

4. 호르몬 添加에 따른 顆粒膜細胞와의 共培養

韓牛 卵胞卵을 호르몬첨가 유무에 따라 中卵胞 및 大卵胞로부터 채취한 顆粒膜細胞와 20시간 共培養했을 때의 體外成熟率은 Table 4와 같다.

中卵胞로부터 회수된 顆粒膜細胞와 0.02AU/ml FSH, 10 μ g/ml LH, 1 μ g/ml estradiol-17 β 가 첨가된 성숙배양액 또는 호르몬이 첨가되지 않은 성숙배양액에서 共培養했을 때의 體外成熟率은 각각 63.3%, 및 66.7%로서 차이가 없었으며, 顆粒膜細胞와 호르몬이 첨가된 성숙배양액 또는 호르몬이 첨가되지 않은 성숙배양액에서 3일간 배양하여 卵胞卵과 共培養했을 때 卵胞卵의 成熟率은 각각 20.8% 및 76.2%로서 中卵胞의 顆粒膜細胞를 3일간 배양후 卵胞卵과 共培養했을 때는 호르몬을 첨가하지 않았을 때가 첨가한 경우보다 成熟率이 유의적으로 높았다(P<0.05).

Table 4. Effect of co-culture with granulosa cells and hormones on *in vitro* maturation of follicular oocytes

| Co-culture treatment* | | | No. of oocytes | No. of oocytes matured to | | | Maturation rate (%)** |
|-----------------------|--------------|----|----------------|---------------------------|-----|----|-----------------------|
| Granulosa cells | Hormones | MI | | TI | MII | | |
| Follicle size | Culture(day) | | | | | | |
| Control | 0 | + | 54 | 18 | 3 | 33 | 61.1 ^c |
| Medium | 0 | + | 90 | 27 | 6 | 57 | 63.3 ^c |
| Medium | 0 | - | 90 | 30 | - | 60 | 66.7 ^c |
| Large | 0 | + | 100 | 8 | 4 | 88 | 88.0 ^d |
| Large | 0 | - | 90 | 18 | 9 | 63 | 70.0 ^c |
| Medium | 3 | + | 96 | 64 | 12 | 20 | 20.8 ^a |
| Medium | 3 | - | 84 | 8 | 12 | 64 | 76.2 ^c |
| Large | 3 | + | 68 | 28 | 12 | 28 | 41.2 ^b |
| Large | 3 | - | 90 | 24 | - | 66 | 73.3 ^c |

* Oocytes were cultured for 20 hours with granulosa cells of 1×10^6 cells/ml concentration used immediately after recovery(0) or after 3-day culture(3), and hormones were added at concentration of 0.02AU/ml FSH, $10 \mu\text{g/ml}$ LH and $1 \mu\text{g/ml}$ E_2 .

** Oocytes progressed to M II were classified as matured.

^{a,b,c,d} Percentage followed by different letters within the same column differ significantly ($P < 0.05$).

大卵胞로부터 회수한 顆粒膜細胞와 호르몬 첨가 또는 첨가하지 않은 성숙배양액에서 共培養했을 때 卵胞卵의 體外成熟率은 각각 88.0% 및 70.0%로서 호르몬을 첨가한 경우 성숙율이 높았으며 ($P < 0.05$), 顆粒膜細胞를 성숙배양액에서 3일간 배양후 共培養했을 때 卵胞卵의 成熟率은 각각 41.2% 및 73.3%로서 호르몬을 첨가하지 않은 것이 첨가한 것보다 成熟率이 높았다 ($P < 0.05$).

卵胞卵의 成熟率 향상을 위한 顆粒膜細胞와의 共培養에 있어서 大卵胞로부터 회수한 顆粒膜細胞와의 共培養이 中卵胞로부터 회수된 顆粒膜細胞에 비해 卵胞卵의 成熟率이 향상되었고 회수후 3일간 배양하여 卵胞卵과 共培養시는 호르몬을 첨가하지 않은 것이 첨가하여 共培養한 것에 비해 卵胞卵의 성숙을 향상시켰다.

卵胞卵의 體外成熟에 있어 FSH, LH, estradiol- 17β 의 첨가는 卵丘細胞의 膨化, 前核 形成率의 향상, 核 및 細胞質성숙의 향상과 發生能 增進을 유기하며 (Ball 등, 1983; Brackett 등, 1989; Fukui 등, 1982), 顆粒膜細胞의 첨가는 胚 發生을 향상시킨다고 알려져 있다 (Critser 등, 1986).

Leibfried-Rutledge 등 (1989)은 卵胞卵을 顆粒膜細胞와 共培養함으로써 體外培養시 發生能의 획득을 야기

하나 共培養 초기에는 제1成熟分裂의 개시를 지연시키며, 顆粒膜細胞를 $1 \sim 5 \times 10^6$ cells/ml 농도로 첨가하여 24시간 卵胞卵과 共培養했을 때 成熟率은 38%로서 共培養하지 않은 경우의 84%에 비해 낮았으나 受精率은 각각 64%와 75%로서 차이가 없다고 하였다.

Critser 등 (1986)은 1~5mm 크기의 난포로부터 회수한 顆粒膜細胞와 1×10^6 cells/ml 농도로 24시간 卵胞卵을 共培養했을 때 成熟率은 70%로서 대조구의 73%에 비해 차이가 없었으나 桑實胚이상으로의 배 발달은 共培養했을 때 유의적으로 높다고 하였으며, King 등 (1990)은 1×10^6 cells/ml 농도로 24시간 共培養했을 때 成熟率은 65% 이상으로서 대조구에 비해 成熟率의 향상을 보고하였다.

Fukui (1989)는 卵胞卵을 5×10^6 cells/ml 농도의 顆粒膜細胞와 24시간 共培養했을 때 70.9%의 成熟率을, Fukui와 Ono (1989)는 10mm의 난포로부터 회수한 顆粒膜細胞와 共培養時 호르몬 첨가 또는 무첨가에 의해 각각 72.3% 및 71.3%의 成熟率을 얻었으며, 顆粒膜細胞의 共培養에 있어서 호르몬 첨가의 영향은 없다고 보고하였다.

Sirard와 Bilodeau (1990)는 卵胞卵을 1~5mm의 난포로부터 회수한 25×10^6 cells/ml의 顆粒膜細胞와

共培養한 경우 卵胞卵의 상숙을 억제하며 $5\sim 10\times 10^3$ cells/ml 농도에서는 억제작용이 적고, 7일간 배양된 顆粒膜細胞와의 共培養시는 25×10^6 cells/ml 농도에서 卵胞卵의 成熟抑制作用이 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 FSH, LH 및 estradiol 17β 를 첨가후 大卵胞로부터 회수한 顆粒膜細胞와 共培養했을 때 成熟率이 가장 좋게 나타나 호르몬의 영향이 없었다고 한 Fukui와 Ono(1989)의 보고와 다르며, 또한 호르몬을 첨가한 후 일간 배양된 顆粒膜細胞와 共培養했을 때만 成熟分裂의 지연 또는 미숙성이 일어났을 뿐 다른 처리구에서는 共培養에 의한 지연효과가 나타나지 않아 共培養 初期에 제1成熟分裂의 개시를 지연시킨다고 한 Leibfried-Rutledge 등(1989)의 보고와도 일치하지 않는 결과를 보였다.

따라서 본 연구결과로 미루어볼 때 卵胞卵의 成熟率과 發生能증진을 위해서는 中卵胞보다는 大卵胞로부터 顆粒膜細胞를 회수후 호르몬을 첨가하여 바로 共培養하는 것이 成熟率을 향상시키는 것으로 생각된다.

IV. 摘要

본 研究는 屠殺韓牛의 卵巢卵胞로부터 回收된 卵胞卵의 體外成熟에 영향을 미치는 要因을 調査하고자 실시하였다. 屠殺牛의 卵巢卵胞(3~6mm)로부터 회수한 卵胞卵을 호르몬과 FCS가 첨가된 TCM-199培養液에서 배양하면서 培養鹽液의 種類, 小滴當 培養 卵子數, 培養時間, 호르몬 첨가 및 顆粒膜細胞와의 共培養에 의한 體外成熟率을 調査하였던 바 얻어진 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 小 卵胞卵을 Hank's 鹽 및 Earle's 鹽의 TCM-199 培養液에서 22, 25, 28시간동안 배양했을 때 體外成熟率은 각각 59.3%와 80.0%, 59.6%와 90.0%, 80.0%와 93.7%로서, Earle's 鹽의 TCM-199 培養液에서 배양하는 것이 成熟의 유기가 빠르고 또한 體外成熟率도 높았다($P<0.05$).
2. $200\mu\text{l}$ 小滴當 각각 10, 20, 40개의 卵胞卵을 넣어 18시간 배양했을 때 體外成熟率은 각각 54.5, 62.5 및 62.0%로서 差異가 없었으나 小滴當 20개 및 40개를 배양했을 때 10개 배양에 비해 成熟率이 向上되는 傾向을 나타내었다.
3. 卵胞卵은 體外培養후 14시간에 M II 로의 成熟이 시작되었으며 20시간 이후는 90%이상이 成熟되었

다.

4. 卵胞卵은 中卵胞로부터 회수한 顆粒膜細胞와 회수후 바로 共培養했을 때 배양액에 0.02AU/ml FSH, $10\mu\text{g/ml}$ LH, $1\mu\text{g/ml}$ estradiol- 17β 의 添加 또는 無添加의 경우 成熟率은 각각 63.3%와 66.7%로서 차이가 없었으며, 顆粒膜細胞를 3일간 배양후 卵胞卵과 共培養했을 때의 成熟率은 각각 20.8%와 76.3%로서 호르몬의 無添加가 成熟率을 높였다($P<0.05$).
5. 卵胞卵은 大卵胞로부터 회수된 顆粒膜細胞와 회수후 바로 共培養했을 때 배양액에 0.02AU/ml FSH, $10\mu\text{g/ml}$ LH, $1\mu\text{g/ml}$ estradiol- 17β 의 添加 또는 無添加의 경우 成熟率은 각각 88.0%와 70.0%로서 호르몬의 添加가 成熟率을 높였으며($P<0.05$), 顆粒膜細胞를 3일간 배양후 卵胞卵과 共培養했을 때의 成熟率은 각각 41.2%와 73.3%로서 호르몬의 無添加가 成熟率을 높였다($P<0.05$).

V. 引用文獻

1. Aoyagi, Y., K. Fujii, 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.W. Lenz, R.L. Ax., B.D. Bavister and N.L. First. 1983. Factor affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.*, 28: 717-725.
3. Bavister, B.D. 1981. Analysis of culture media for *in vitro* fertilization and criteria for success. in-Fertilization and embryonic development *in vitro* (eds., Mastroianni, L. Jr. and J.D. Biggers). Plenum press. New York, pp.41-60.
4. Brackett, B.G., A.I. Younis and R.A. Fayrerhosken. 1989. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentration of luteinizing

- hormone. *Fert. Steril.*, 52 : 319-324.
5. Channing, C.P. and F.Ledwitz-Rigby. 1975. Methods for assessing hormone-mediated differentiation of ovarian cells in culture and in short-term incubations. in-*Methods in enzymology*. Vol. 39. hormone action part D. isolated cells, tissues, and organ systems (eds., Hardman, J.G. and B.W.O'Malley). Acadmic press. London, pp.183-230.
 6. Critser, E.S., M.L. Leibfried-Rutledge, W. H. Eyestone, N.D.L. Northey and N.L. First. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 25 : 150(Abstract).
 7. Fukuda, Y., M. Ichikawa, K. Naito and Y. Toyada. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with 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 : 1318-1323.
 9. Fukui, Y. and H. Ono. 1989. Effects 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. Fukui, Y., M. Fukushima, Y. Terawaki and H. Ono. 1982. Effect of gonadotropins, steroid and culture media on bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 18 : 161-175.
 11. Greve, T., W.A. King, D. Bousquet and K.J. Betteridge. 1983. Chromosomes of the bovine oocyte *in vitro*. *J.Dairy Sci.*, 66(suppl) : 245.
 12. Kajihara, Y., K. Goto, S. Kosaka, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1987. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts *in vitro*. *Jpn. J.Anim. Reprod.*, 33 : 173-180.
 13. Kane, M.T. 1988. Regulation of embryonic development by environmental factors, in *-In vitro* fertilization and embryo transfer (eds., Wolf, D.P.), Plenum press. New York, pp.359-387.
 14. Kim, C.I., J.E. Ellington and R.H. Foote. 1990. Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM 199 and a simple defined medium with co-culture. *Theriogenology*, 33 : 433-440.
 15. King, R.S., T.L. McNutt, M.A. Henault and G.Killian, 1990. Effects of cumulus oophorus and follicular cells on meiotic maturation in bovine oocytes, *Biol. Re prod.*, 42(suppl. 1) : 91.
 16. Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Critser, J. J. Parrish and N.L. First. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes, *Theriogenology*, 31 : 61-74.
 17. 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.
 18. 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.
 19. Motlik, J., H.H. Koefoed- Johnson and J. Fulka. 1978. Breakdown of the germinal vesicle in bovine oocytes cultivated *in vitro*. *J.Exp. Zool.*, 205 : 377-384.
 20. Motlik, J. and J.Fulka. 1981. Fertilization of rabbit oocytes co-cultured with granulosa cells. *J.Reprod. Fert.*, 63 : 425-429.
 21. Park, S.B. 1990. Production of bovine embryos using follicular oocytes matured *in*

- vitro*. Korean J. Emb. Trans., 5: 21-27.
22. Parrish, J.J., J.Susko-Parrish, M.A. Winer and N.L. First. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Reprod., 38: 1171-1180.
 23. Saeki, K., M.L. Leibfried-Rutledge and N.L. First. 1990. Are fetal calf serum and hormones necessary during *in vitro* maturation of cattle oocytes for subsequent development? . Theriogenology, 33: 316 (Abstract).
 24. 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 estrous cow serum. Theriogenology, 33: 477-485.
 25. Sigma cell culture reagents, catalog/price list, 1990.
 26. 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.
 27. Sirard, M.A. and S.Bilodeau. 1990. Live granulosa cells can maintain meiotic inhibition of bovine oocytes *in vitro*, Biol. Reprod., 42(suppl. 1): 90.
 28. Süß, U., K. Wüthrich and G.Stranzinger. 1988. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. Biol. Reprod., 38: 871-880.
 29. 金相根, 朴恒均. 1988. 소 卵胞卵의 體外成熟과 受精에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌, 12: 112-119.
 30. 金昌根, 鄭榮彩, 尹鐘澤, 崔善昊, 柳範龍, 鄭光朝, 金興律, 宋海範. 1990. 소의 體外成熟 卵胞卵의 體外 受精과 發生에 관한 研究. 韓畜誌., 32: 27-36.
 31. 宋海範. 1989. 體外培養한 소 卵胞卵과 햄스터 摘出子宮에서 前培養한 소 精자의 體外受精에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌, 13: 32-39.
 32. 鄭英彩, 金昌根, 柳範龍, 尹鐘澤, 金亨泰. 1990. 家畜의 改良 및 繁殖效率 增進에 관한 研究.VI. 소에 있어서 體外受精 卵胞卵의 發生能 向上에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌, 14(1): 73-83.