

## 소 卵胞卵의 體外成熟 및 體外受精에 影響을 미치는 要因에 관한 研究

李 晚 徽 · 金 相 根

忠南大學校 獸醫科大學

(1991. 2. 19 접수)

### Studies on the detrimental factors affecting *in vitro* maturation and fertilization of bovine follicular oocytes

Man-hee Lee, Sang-keun Kim

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

(Received Feb 19, 1991)

**Abstract:** These studies were carried out to investigate the effects of the size of follicles, semen types, capacitation methods, and additions of hormones, estrous cow serum(ECS), fetal calf serum(FCS), bovine follicular fluid(BFF) and matured cumulus cell(MCC) to the medium on *in vitro* maturation and fertilization of bovine follicular oocytes. The ovaries were obtained from slaughtered Korean native cows. The follicular oocytes surrounded with cumulus cells were recovered by aspirating follicular fluid from the visible follicles of diameter 3~5mm.

The follicular oocytes were cultured in TCM-199 medium containing hormones, FCS, ECS, BFF and MCC for 24~48hrs. in an incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5°C and then matured oocytes were again cultured for 18~20 hrs. with motile capacitated spermatozoas the TCF (Tyrode calcium-free) solution containing 100µg/ml of heparin. The results obtained in these experiments were summarized as follows:

1. The oocytes classified as "A,B,C,D and Degenerative" depending morphological integrity and those 61.4%, 12.1%, 19.2%, 4.2% and 3.0% of the total oocytes recovered, respectively. The maturation and fertilization rate of the A,B,C class follicular oocytes, cultured in the TCM-199 medium supplemented with 10% FCS were 89.1%, 78.0%, 52.6% and 78.1%, 66.1, 33.3%, respectively.
2. The average number of the follicular oocytes recovered from follicles size, 1~2mm, 3~5mm and above 5mm in diameter were 67, 98 and 63, respectively. The maturation and fertilization rate of the follicular oocytes, cultured in the TCM-199 medium were 56.7%, 82.5%, 46.0% and 44.8%, 71.4%, 28.6%, respectively.
3. The fertilization and cleavage rate of the follicular oocytes, inseminated with spermatozoas of epididymal cauda, neat and frozen semen were 63.3%, 73.3%, 70.0% and 32.7%, 37.8% 38.3%, respectively.
4. The fertilization and cleavage rate of follicular oocytes, fertilized with capacitated spermatozoas by heparin, BFF and HIS methods were 70.0%, 53.8%, 34.2% and 38.3%, 23.1%, 17.1%, respectively. And the fertilization and cleavage rate were higher method of heparin.
5. The maturation and fertilization rate of follicular oocytes, cultured in the TCM-199 medium

- supplemented with 5%, 10%, 15%, 20% and FSH, HCG, 17  $\beta$ -estradiol were 76.0~82.3% and 26.2~70.0%, and those values were higher the supplementation than non-supplementation.
6. The maturation and fertilization rate of the follicular oocytes cultured in TCM-199 medium supplemented with 5~20% ECS and FCS were 74.0~80.6%, 26.2~30.0% and 71.7~76.9%, 51.9~58.0%, and the values were higher the supplement of ECS than FCS.
  7. The maturation rate (68.0~64.6%) and fertilization rate(59.6~60.4%) of follicular oocytes cultured in TCM-199 medium supplemented with 10% FCS and 20~30% BFF were higher than those of follicular oocytes cultured TCM-199 medium supplemented with 10% FCS and 10% and 50% BFF.
  8. The maturation rate(76.5%) and fertilization rate (61.7%) of follicular oocytes cultured in TCM-199 medium supplemented with 10% FCS and  $1 \times 10^6$ /ml MCC were higher than those of follicular oocytes cultured in TCM-199 medium supplemented with 10% FCS and  $1 \times 10^{4-5}$ /ml and  $1 \times 10^8$ /ml cumulus cells.

**Key word:** *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, follicular oocytes

## 緒 論

家畜의 繁殖效率을 增進시키기 위한 方案으로서는 體外受精, 雙胎分娩, 遺傳子, 核移植 및 性判別 등의 受精卵 移植分野의 産業的 利用을 위한 새로운 技術開發이 絶실히 要請된다. 이를 위해서는 대량의 受精卵를 간편하게 생산할 수 있는 體外受精 技術의 確立이 필요하다고 하겠다. 近年에는 受精卵 移植分野의 産業的 利用이 가능해짐에 따라 體外受精 분야의 研究도 활발해져 체외에서 受精한 소 受精卵의 移植에 의한 송아지의 出産이 報告되었다. 그러나 이러한 體外受精이 성공적으로 이루어지기 위해서는 卵자의 成熟, 精자의 受精能獲得과 尖體反應 및 卵管내 環境과 동일한 培養條件 등의 技術이 필요하나, 現在로서는 완벽한 體外受精의 技術이 확립되어 있지 못한 實情이다.

1965년 Edward<sup>1</sup>에 의해 소 卵胞卵의 體外成熟이 報告된 이후, 이 분야에 관한 많은 研究들이 遂行되었는데, 이들의 研究들을 살펴보면, 體外에서 受精能獲得을 시킨 精子와의 體外受精과<sup>2-9</sup> 體內에서 受精能獲得을 시킨 精子와의 體外受精<sup>10,11</sup> 및 體外에서 成熟시킨 卵자의 生殖器道내 移植에 의한 體外受精<sup>5,12,13</sup> 등으로 구분할 수가 있다. 그러나 소 卵胞卵의 體外成熟과 體外受精에는 卵자의 形態, 培養方法 및 培養條件에 따라 차이가 있다.<sup>4,12,14-19</sup>

遺傳形質이 우수한 소의 卵胞卵을 채취하여 體外培養을 통해 成熟시킨 후 體外受精에 의해 대량으로 受精卵를 生産할 수 있다면, 이의 移植에 의한 급속한 家畜의 改良은 물론, 種雄畜의 受精能의 評價와 特定品種의 生産, 多胎生産과 品種 및 系統保存에 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 細胞分離에 의한 卵性 複數子

(雙子, 四子)의 生産, 核移植에 의한 clone動物의 生産, chimera動物의 作出, 遺傳子 移植에 의한 新品種 作出 등의 研究와 技術開發에 크게 寄與할 수 있을 것으로 期待된다.

이이, 本 研究은 소 卵胞卵의 體外成熟과 體外受精에 미치는 要因 즉 卵胞卵의 形態와 크기, 精液의 種類, 受精能獲得 方法, 血清, 卵胞液 및 卵丘細胞의 添加 등의 효과를 알아보고져 遂行하였다.

## 材料 및 方法

**卵胞卵의 回收:** 正常生殖器를 가진 屠殺直後의 雌畜 韓牛(體重 270~500kg)의 卵巢를 摘出하여, 100IU/ml의 penicillin G와, 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate를 添加한 38°C의 生理的 食鹽水에 浸漬하여 2時間이 內에 實驗室로 옮겨, 卵巢표면을 洗滌하고 濾過紙로 卵巢표면의 습기를 제거한다음 18 gauge 注射器로 卵胞液을 흡입하여 時計皿에 채취한 후 實體顯微鏡(20~40X)하에서 卵胞卵을 回收하여 培養液으로 3회 洗滌하였다.

**發情牛 血清의 分離:** 發情徵候를 나타낸 雌畜 成牛의 頸靜脈으로부터 채혈한 血液을 3,000 rpm으로 10 分간 2회 遠心分離한 후, 上層液을 回收하여 0.2 $\mu$ m millipore filter로 濾過한 다음, 56°C에서 30分간 非働化 처리후에 -20°C에 보관하면서 이용하였다.

**卵胞液의 準備:** 直徑 10mm 이상의 정상적인 卵巢를 供試하여 卵胞液을 채취한 후 2,000 rpm으로 10分간 遠心分離하여 上層液을 濾過 및 非働化 처리후 -20°C에 보관하면서 이용하였다.

**卵丘細胞의 準備:** 肉眼的으로 투명한 直徑 5~10mm의 卵胞를 摘出하여 實體顯微鏡하에서 微細 pincette을

이용하여 卵胞 주변의 間質組織을 제거한 후 卵丘細胞를 回收하였다. 回收한 卵丘層 細胞는 시험관에 채워하여 500 rpm으로 5분간 遠心分離하여 上層液을 제거한 후 10% FCS를 添加한 TCM-199를 2~3ml 添加하여 2회에 걸쳐 1,700 rpm으로 5분간 遠心分離하여 上層液을 버리고 細胞數를 계산하여 培養液에 添加하였다.

**培養液:** 卵胞卵의 體外成熟 및 體外受精을 위한 基本培養液은 TCM-199(Whittaker, M.A., Bioproducts Co., USA)로 10%(v/v)의 FCS와 1 $\mu$ g/ml의 FSH (Sigma USA), 2IU/ml의 HCG, 1 $\mu$ g/ml의 17  $\beta$ -estradiol (Sigma, USA), 100IU/ml의 penicillin G 및 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate가 添加된 培養液을 이용하였으며, 사용된 0.2 $\mu$ m millipore filter로 濾過滅菌후 사용하였다. 한편, 培養液에 血清, 卵胞液 및 顆粒膜細胞 등의 添加에 따른 體外成熟 및 體外受精率에 미치는 영향을 究明하고자, 基本培養液에 5%, 10%, 15% 및 20%(v/v)의 FCS 및 發情牛血清과 10%, 20%, 30% 및 50%(v/v)의 牛 卵胞液과 1 $\times$ 10<sup>4</sup>/ml, 1 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml, 1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml 및 1 $\times$ 10<sup>8</sup>/ml의 卵丘細胞를 添加하여 시험에 사용하였다.

**卵胞卵의 體外成熟:** 卵胞卵의 體外培養은 體外成熟用 培養液 50 $\mu$ l 小滴을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 培養 2~3時間前에 CO<sub>2</sub> 培養器內(5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 38.5°C)에서 平衡시킨후 小滴當 5개의 卵胞卵을 浸漬하여 24時間 培養하였다.

#### 精子的 受精能獲得

**heparin 處理法:** 凍結精液을 38°C의 恒溫水槽에 약 1시간 浸漬하여 融解한 후, 受精能獲得 培養液 TCF (Tyrode calcium-free) 1ml에 融解한 精液 0.2ml를 試驗管內에서 혼합하여 CO<sub>2</sub> 培養器에서 swim-up 처리 후, 上層液을 受精用 培養液으로 2,000 rpm, 10분간 2회 遠心分離하여 세정하고 精子塊를 同量의 200 $\mu$ g/ml의 heparin(Sigma, USA)과 稀釋하여 15분간 CO<sub>2</sub> 培養器에서 受精能獲得을 誘起하였다.

**소 卵胞液 處理法:** 10~20mm의 卵胞로부터 채취한 卵胞液을 600 rpm으로 10분간 遠心分離한 다음 上層液을 56°C에서 30분간 非働化 처리후 濾過 滅菌하여, 여기에 融解精液을 1:15의 비율로 稀釋한 다음 CO<sub>2</sub> 培養器에서 4시간 前培養하여 受精能獲得을 誘起하였다.

**HIS(high ionic strength) 處理法:** 2ml의 HIS 액 (Brackett, 1982)<sup>20</sup>에 0.1ml의 精液을 稀釋하여 5분간 培養한 다음 2,000 rpm으로 5분간 遠心分離후 精子塊를 1ml의 BO(Brackett와 Oliphant, 1975)<sup>21</sup>액에 稀釋하여 4시간 前培養하였다.

**體外受精:** 體外受精은 成熟培養한 卵胞卵을 受精用 培養液으로 3회 세척 후, 주위의 卵丘細胞를 pipetting에 의하여 일부 제거한 다음 mineral oil로 피복한 45  $\mu$ l의 受精用 培養液 小滴에 5개에 卵胞卵을 주입한 후, 受精能獲得을 誘起시킨 精子 浮遊液 2 $\mu$ l(1.5 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml)로 媒精하였다.

**成熟 및 受精의 判定:** 卵胞卵의 成熟 및 受精의 判定은, 回收한 卵胞卵을 24時間 培養후 0.1% hyaluronidase(Sigma, USA)에 의해 卵丘細胞를 제거한 후 slide glass에 滴下하여 25% acetic acid에 24~48時間 固定한 다음 1% acetic-orcein으로 染色하여 Shea 등 (1976)<sup>22</sup>과 Ball 등(1984)<sup>23</sup>의 判定基準에 준하여 成熟度와 受精與否를 判定하였다.

## 結果 및 考察

**卵胞卵의 形態 및 난구세포층의 부착유무에 따른 효과:** 卵丘細胞層의 附着有無에 따라 소의 卵巢 卵胞로부터 채취한 卵胞卵의 形態의 分類를 실시한 후, TCM-199 培養液에서 배양했을 때의 體外成熟率 및 體外受精率은 Table 1 및 2에 나타난 바와 같다. 總採取卵 1256 卵中 A型卵은 61.5%, B型卵은 12.1%, C型卵은 19.2% 및 D型卵은 4.2%였다. 이러한 결과는, A, B, C 및 D型卵의 비율이 각각 57.2%, 9.6%, 25.7% 및 7.5%였다고 보고한 花田(1985)<sup>24</sup>의 結果와 대체로 유사한 결과였다. 또한, 形態의 分類에 의해 분류된 A, B, C型卵을 培養液에 培養했을 때, 體外成熟率은 각각 89.1%, 78.0%, 52.6%였으며, 體外受精시의 受精率은 각각 78.1%, 66.1%, 33.3%로 나타났다. 이로 미루어 볼 때, 未熟卵胞卵은 形態의 分類를 통해 선별한 후 培養하는 것이 우수한 體外成熟率 및 體外受精率을 얻을 수 있는 것으로 思料된다.

**Table 1.** Morphological classification of bovine follicular oocytes recovered from an ovarian follicle

No. of oocytes examined (%)	Morphological classification of oocytes				Degenerative
	A	B	C	D	
1256 (100)	772 (61.4)	152 (12.1)	241 (19.2)	53 (4.2)	38 (3.0)

A : Oocytes with compact, dense cumulus cells.

B : Partially naked oocytes with thin cumulus layer.

C : Oocytes with foggy cumulus cell and incompletely attached zona pellucida.

D : Naked oocytes.

**Table 2.** *In vitro* maturation and fertilization rate of bovine oocytes classified by cumulus cells

Grade of oocytes	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured (%)**	No. of oocytes fertilized (%)**
A	64	57(89.1)	50(78.1)
B	59	46(78.0)	39(66.1)
C	57	30(52.6)	19(33.3)

\*: The number of oocytes matured to the second metaphase.

\*\* : The number of oocytes fertilized.

卵胞의 크기에 따른 효과 : 소 卵胞卵의 크기를 1~2mm, 3~5mm 및 5mm 이상의 등급으로 분류하여 TCM-199 培養液에서 培養했을 때의 體外成熟率 및 受精率은 Table 3에서 보는 바와 같다. 1~2mm, 3~5mm 및 5mm 이상의 卵胞로부터 채취한 卵胞卵의 수는 총 228個로서 각각 67개, 98개 및 63개로 나타났다. 또한, 이때의 體外成熟率 및 受精率은 각각 56.7%, 82.5%, 46.0% 및 44.8%, 71.4%, 28.6%로서 3~5mm의 卵胞卵의 크기에서 有意的은 아니나 가장 높은 體外成熟率과 受精率을 나타냈다. 以上の 結果는, 卵胞의 크기에 따른 體外成熟率과 受精率은 3~6mm에서 가장 높았으나 有意性이 認定되지 않았다는 Leibfried와 First(1980)<sup>15</sup>, Leibfried-Rutledge 등(1985)<sup>7</sup> 및 Fukui 등(1982)<sup>25</sup>의 結果와 같았다.

**Table 3.** Effects of follicles size on *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes

Size of follicles	No. of oocytes cultured	No. of oocytes matured*	No. of oocytes fertilized**
1~2mm	67	38 (56.7)	30 (44.8)
3~5mm	98	81 (82.5)	71 (71.4)
<5mm	63	29 (46.0)	18 (28.6)

\*: The number of oocytes of oocytes matured to the second phase.

\*\* : The number of oocytes fertilized.

精液의 종류에 따른 효과 : 소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 精液의 종류에 따른 體外受精率과 分割率은 Table 4에서 보는 바와 같이, 精巢上體 尾部 精子를 이용하여 媒精하였을 때의 受精率과 分割率은 73.3%와 32.7%였으며, 稀釋精液과 凍結精液으로 媒精하였을 때의 受精率과 分割率은 각각 73.3%와 37.8%, 70.0%와 38.3%였다. 精巢上體 尾部 精子를 이용하였을 때 受精能獲得 방법은 다르지만, Ball 등(1983)<sup>2</sup>의 受精率

**Table 4.** Effects of semen types on *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro*

types of semen	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized*	No. of oocytes cleaved**
SEC	49	31 (63.3)	16 (32.7)
Neat	45	33 (73.3)	17 (37.8)
Frozen	60	42 (70.0)	23 (38.3)

\*: No. of oocytes fertilized / No. of oocytes cultured

\*\* : No. of oocytes cleaved/No. of oocytes fertilized. SEC: spermatozoas of epididymis cauda.

71.0%보다는 다소 떨어지는 성적이었으나, Bondioli와 Wright(1983)<sup>26</sup>의 凍結精液을 이용한 受精率 44.0%보다는 우수한 成績이었다. 그러나, 精液의 종류에 따른 體外受精率은 有意的 수준이 아니었다는 報告와는 일치되는 結果였다.

受精能獲得 方法에 따른 효과 : 소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 受精能獲得 方法에 따른 體外受精率과 分割率은 Table 5에서 보는 바와 같이, heparin 處理法은 70.0%의 受精率과 38.3%의 分割率을 나타냈으며, BFF處理法과 HIS處理法의 受精率과 分割率은 각각 53.8%와 23.1%, 34.2%와 17.1%였다. 受精能獲得 處理法중 heparin 處理法이 가장 높은 受精率과 分割率을 나타냈다. 이러한 結果는 Parrish 등(1986)<sup>9</sup>이 報告한 heparin 處理시의 受精率 79.0%와, Brackett 등(1982)<sup>20</sup>의 HIS處理에 의한 受精率 40.0%보다 다소 떨어지는 成績이었으나, Fukui 등(1983)<sup>27</sup>의 BFF處理에 의한 46.2%보다 다소 높은 成績이었다. 生體내 卵胞液과 子宮液에 존재하는 heparin과 hyaluronic acid를 함유하는 Glycosaminoglycans(GAGs)는 尖體反應을 촉진시키며, 또한 heparin과 BSA를 동시에 첨가했을 때 보다 강력한 受精能獲得 작용을 가지고 있어 heparin處理에 의한 受精能獲得 방법은 높은 受精率을

**Table 5.** Effects of capacitation method of sperms on *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes

Capacitation method of spermatozoas	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized*	No. of oocytes cleaved**
Heparin method	60	42 (70.0)	23 (38.3)
BFF method	39	21 (53.8)	9 (23.1)
HIS method	35	12 (34.3)	6 (17.1)

\*: No. of oocytes fertilized/No. of oocytes cultured.

\*\* : No. of oocytes cleaved/No. of oocytes fertilized.

**Table 6.** Effects of hormones added to culture media on *in vitro* maturation and fertilization rate of bovine follicular oocytes

Concent. of serum	Hormones	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured**	No. of oocytes fertilized***
5% FCS	—	45	35 (77.8)	13 (28.9)
	+	54	41 (75.9)	15 (27.8)
10% FCS	—	42	33 (78.6)	11 (26.2)
	+	60	49 (81.7)	42 (70.0)
15% FCS	—	47	38 (80.9)	14 (29.8)
	+	45	37 (82.2)	30 (66.7)
20% FCS	—	50	37 (74.0)	15 (30.0)
	+	51	42 (82.4)	35 (68.6)

\* : FSH : 1 $\mu$ g/ml, HCG : 2IU/ml, 17 $\beta$ -estradiol : 1 $\mu$ g/ml.

\*\* : The number of oocytes matured of the second metaphase.

\*\*\* : The number of oocytes fertilized.

얻을 수 있는 것으로 사료된다.<sup>14,26,28)</sup>

**호르몬의 추가에 따른 효과 :** 소 卵胞卵의 體外成熟과 受精에 있어서 각 농도의 牛胎兒血清과 호르몬(1 $\mu$ g/ml의 FSH, 2IU/ml의 HCG, 1 $\mu$ g/ml의 17 $\beta$ -estradiol)을 添加한 TCM-199 培養液에서 培養했을 때의 體外成熟率과 受精率은 Table 6과 같다. 基本培養液에 각 농도 牛胎兒血清과 호르몬을 添加하지 않았을 때와 添加했을 때의 體外成熟率은 각각 77.8~80.6%와 76.0~82.3%로서 큰 차이가 없었으나, 體外受精率에 있어서는 각각 26.2~30.0%와 26.2~70.0%로서 牛胎兒血清과 호르몬의 無添加에 비해 添加했을때가 높은 성적을 나타냈다. 특히, 15%와 20%의 牛胎兒血清과 호르몬을 添加했을 때 각각 66.7%와 68.6%로서 높은 體外受精率을 나타냈다. 이러한 결과는, 牛胎兒血清과 FSH 및 HCG의 첨가가 受精率의 增加를 가져왔다는 Shalgi (1979)<sup>16</sup>, Ball 등(1983)<sup>2</sup> 및 Hensleigh와 Hunter(1985)<sup>6</sup> 등의 報告와 일치되는 결과였다. 그러나, 體外成熟率에 있어서는 FSH와 HCG를 첨가하였을 때 成熟率에 증가를 가져왔다는 Ball 등(1983)<sup>2</sup>과 Hensleigh와 Hunter (1983)<sup>6</sup>의 報告와는 類似한 결과였으나, FSH나 HCG가 成熟에 절대적이 아니라는 Fukui 등(1983)<sup>27</sup>의 報告와는 차이가 있었다.

**發情牛血清 및 牛胎兒血清의 添加效果 :** 소 卵胞卵의 體外成熟과 體外受精에 있어서 發情牛血清과 牛胎兒血清을 각각 첨가한 TCM-199 培養液에서 배양했을 때의 體外成熟率 및 受精率은 Table 6과 같다. 5%의 發情牛血清을 培養液에 첨가했을때의 卵胞卵의 體外成熟率과 受精率은 각각 74.5%와 55.3%를 나타냈으며, 10%의 發情牛血清 첨가시의 體外成熟率과 受精率은 각각 76.9%와 51.9%를 나타냈다. 또한, 15% 및 20%를

첨가했을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 76.0%와 58.0%, 71.7%와 57.8%였다. 한편, 5%의 牛胎兒血清을 TCM-199 培養液에 첨가하여 培養했을 때의 卵胞卵의 體外成熟率과 受精率은 각각 77.8%와 28.9%였으며, 10%의 牛胎兒血清을 첨가했을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 78.6%와 26.2%를 나타냈다. 또한, 15% 및 20%의 牛胎兒血清을 첨가했을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 80.6%와 29.8%, 74.0%와 30.0%로서 대체적으로 높은 體外成熟率과 受精率을 나타냈다. 이러한 結果는, 發情牛血清이 卵胞卵의 體外成熟과 受精

**Table 7.** Effects of a various concentration of estrous cow serum(ECS) and fetal calf serum(FCS) added to culture media on *in vitro* maturation and fertilization rate of bovine follicular oocytes

Concentration of serum	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured (%)*	No. of oocytes fertilized (%)**
5% ECS	47	35 (74.5)	26 (55.3)
10% ECS	52	40 (76.9)	27 (51.9)
15% ECS	50	38 (76.0)	29 (58.0)
20% ECS	45	32 (71.1)	26 (57.8)
5% FCS	45	35 (77.8)	13 (28.9)
10% FCS	42	33 (78.6)	11 (26.2)
15% FCS	47	38 (80.8)	14 (29.8)
20% FCS	50	37 (74.0)	15 (30.0)

\* : The number of oocytes matured to the second metaphase.

\*\* : The number of oocytes fertilized.

에 있어서 우수한 결과를 나타냈다고 한 Sanbuissho와 Threlfall(1985)<sup>29</sup>, Xu 등(1987)<sup>30</sup>, Lu 등(1987)<sup>31</sup>의 보고서와 일치하였으나, 牛胎兒血清이 發情牛血清에 비해 成熟率과 受精率에 있어 다소 높은 성적을 얻었다고 한 Fukui와 Ono(1989)<sup>32</sup>의 보고와는 相異한 결과였다. 그러나, 發情牛血清과 牛胎兒血清간에는 體外成熟率에 있어서는 큰 차이가 없으나, 혈청을 첨가한 培養液에 FSH와 HCG 등의 호르몬의 첨가에 의한 卵丘細胞의 膨化로 精子의 受精能獲得과 受精率의 증진을 가져온다는 Ball 등(1983)<sup>2</sup>의 보고서와 일치하는 것으로 생각된다.

**卵胞液의 添加效果:** 排卵直前の 卵胞에서 채취한 卵胞液을 첨가한 培養液에서 體外培養한 소 卵胞卵의 體外成熟率과 受精率은 Table 7에서 보는 바와 같다. 10%의 卵胞液을 첨가하였을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 67.9%와 54.7%였으며, 20%의 卵胞液을 첨가하였을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 68.0%와 59.6%를 나타냈다. 卵胞液을 30% 및 50%를 첨가하였을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 64.6%와 60.4%, 58.8%와 54.9%를 나타냈다. 本試驗에서 卵胞液을 첨가한 培養液에서 卵胞卵을 培養한 결과, 卵胞卵의 정상적인 成熟率이 증가하였는데, 이러한 결과는 卵胞가 성숙함에 따라 卵胞液의 抑制效果가 감소한

다고 한 Stone 등(1978)<sup>33</sup>의 보고서와 卵胞의 크기 및 顆粒膜細胞의 成熟度에 따라 卵胞液의 組成이 변화된다고 한 Tsafiriri 등(1982)<sup>34</sup>의 보고서와 일치하는 것으로 判斷된다.

**卵丘細胞의 添加效果:** 10%의 牛胎兒血清과 成熟 卵丘細胞를 첨가한 培養液에서 배양했을 때의 卵胞卵의 體外成熟率과 受精率은 Table 8에 나타난 바와 같다. 10%의 牛胎兒血清과  $1 \times 10^4$ /ml의 成熟 卵丘細胞를 첨가하였을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 75.0%와 47.9%였으며, 10%의 牛胎兒血清과  $1 \times 10^5$ /ml의 成熟 卵丘細胞를 첨가하였을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 71.4%와 55.1%였다. 또한, 10%의 牛胎兒血清과  $1 \times 10^6$ /ml 및  $1 \times 10^8$ /ml의 成熟 卵丘細胞를 첨가하였을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 76.5%와 61.7%, 73.0%와 61.5%였다. 이러한 결과는, 培養液에 成熟 卵丘細胞를 첨가했을 때 體外成熟率 및 受精率이 향상된다고 한 Ball 등(1983)<sup>2</sup> 및 Critser 등(1986)<sup>35</sup>의 보고서와 일치하였다. 그러나, Tsafiriri 등(1976)<sup>36</sup>과 Hillensjo 등(1976, 1981)<sup>37, 38</sup>은 卵胞液내에는 卵胞卵의 成熟 抑制物質이 있어 卵胞卵의 성숙을 억제한다고 報告하였으나, Nekola와 Smith(1974)<sup>39</sup> 및 Jagiello 등(1977)<sup>40</sup>은 卵丘細胞와 共培養했을 때 卵胞卵의 成熟을 억제하지 않는다고 報告하였다.

**Table 8.** Effects of a various concentration of bovine follicular fluids added to culture media on *in vitro* maturation and fertilization rate of bovine follicular oocytes

	Concentration of BFF	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%)*	No. of oocytes fertilized (%)**
10% FCS	10%	53	36 (67.9)	29 (54.7)
10% FCS	20%	47	32 (68.0)	28 (59.6)
10% FCS	30%	48	31 (64.6)	29 (60.4)
10% FCS	50%	51	30 (58.8)	28 (54.9)

\*: The number of oocytes matured to the second metaphase.

\*\* : The number of oocytes fertilized.

**Table 9.** Effects of a various concentration of cumulus cell added to culture media on *in vitro* maturation and fertilization rate of bovine follicular oocytes

	No. of cumulus cell	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%)*	No. of oocytes fertilized (%)**
10% FCS	$1 \times 10^4$ /ml	48	36 (75.0)	23 (47.9)
10% FCS	$1 \times 10^5$ /ml	49	35 (71.4)	27 (55.1)
10% FCS	$1 \times 10^6$ /ml	47	36 (76.5)	29 (61.7)
10% FCS	$1 \times 10^8$ /ml	52	38 (73.0)	32 (61.5)

\*: The number of oocytes matured to the second metaphase.

\*\* : The number of oocytes fertilized.

## 結 論

소의 卵胞卵의 體外成熟과 體外受精에 영향을 미치는 要因을 究明하기 위하여 未熟卵胞卵을 채취하여 形態的 分類를 통해 우수한 卵를 供試한 후 卵胞의 크기, 精液의 종류, 受精能獲得 方法, 血清, 호르몬, 卵胞液, 成熟 卵丘細胞 등을 첨가한 TCM-199 培養液에서 培養하면서 體外成熟率과 體外受精率을 조사하였는 마 그 결과는 다음과 같다.

1. 소 卵胞卵을 채취하여 培養을 통해 形態的 分類를 했을 때 A型卵은 61.4%, B型卵은 12.1%, C型卵은 19.2%, D型卵은 4.2%였으며 發生中止 또는 退化卵은 3.0%였다. 또한 A, B, C型卵을 培養液에 배양했을 때 卵胞卵의 體外成熟率은 각각 89.1%, 78.0%, 52.6%였으며, 受精率은 각각 78.1%, 61.1%, 33.3%였다.

2. 소 卵胞의 크기를 1~2mm, 3~5mm 및 5mm 이상으로 分類하여 채취한 卵胞卵의 수는 각각 67개, 98개, 63개였으며, 이를 TCM-199 培養液에서 培養했을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 56.7%, 82.5%, 46.0%와 44.8%, 71.4%, 28.6%였다.

3. 소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 精巢上體 尾部精子, 稀釋精液 및 凍結精液을 이용하여 媒精하였을 때 體外受精率과 分割率은 각각 63.3%, 73.3%, 70.0%와 32.7%, 37.8%, 38.3%였다.

4. 소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 heparin處理法, BFF處理法, HIS處理法으로 각각 受精能獲得을 유기하였을 때 體外受精率과 分割率은 각각 70.0%, 53.8%, 34.2%와 38.3%, 23.1%, 17.1%로서 heparin 處理法이 가장 높았다.

5. 소 卵胞卵의 體外成熟과 受精에 있어서 각 농도의 牛胎兒血清과 FSH, HCG, 17 $\beta$ -estradiol을 첨가한 TCM-199 培養液에서 培養했을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 76.0~82.3%와 26.2~70.0%로서 無添加에 비해 添加가 높았다.

6. 發情牛血清 5~20%를 첨가한 培養液에서 배양했을 때의 體外成熟率은 71.7~76.9%, 受精率은 51.9~58.0%였으며, 牛胎兒血清 5~20%를 첨가한 培養液에서 배양했을 때의 卵胞卵의 體外成熟率은 74.0~80.6%, 受精率은 26.2~30.0%로서, 體外受精率에 있어서는 發情牛血清의 첨가가 牛胎兒血清의 첨가에 비해 높았다.

7. 排卵직전의 卵胞에서 채취한 卵胞液 20~30%를 첨가한 培養液에서 배양했을 때의 卵胞卵의 體外成熟率은 각각 68.0%와 64.6%, 受精率은 각각 59.6%와

60.4%로서 卵胞液 10%, 50%를 첨가한 培養液에서 배양시의 成熟率과 受精率에 비해 높았다.

8.  $1 \times 10^6$ /ml의 成熟 卵丘細胞를 첨가한 培養液에서 배양했을 때의 卵胞卵의 體外成熟率과 受精率은 각각 76.5%와 61.7%로서 FCS 10%와  $1 \times 10^4 \sim 10^5$ /ml와  $1 \times 10^8$ /ml의 成熟 卵丘細胞를 첨가한 培養液에서 배양시의 體外成熟率과 受精率에 비해 높았다.

## 參 考 文 獻

1. Edwards RG. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human oocytes. *Nature* 1965; 208:349~351.
2. Ball GD, Leibfried ML, Lenz W, et al. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol Reprod* 1983; 28:717~725.
3. Fukui Y, Ono H. *In vitro* development to blastocyst of *in-vitro* matured and fertilized bovine oocytes. *Vet Rec* 1988; 122:282.
4. Fukushima M, Fukui Y. Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes cultured *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 1985; 9:232~242.
5. Fulka JJr, Pavlok JA, Fulka J. *In-vitro* fertilization of zona-free bovine oocytes matured in culture. *J Reprod Fert* 1982; 64:495~499.
6. Hensleigh HC, Hunter AG. *In vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. *J Dairy Sci* 1958; 68:1456-1562.
7. Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, First NL. Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle. *Theriogenology* 1985; 23:753~759.
8. Lenz W, Ball GD, Leibfried ML, et al. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes. *Biol Reprod* 1983; 29:173~179.
9. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, et al. Bovine *in-vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986; 25: 591~560.
10. Iritani A, Niwa K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J Reprod Fert*

- 1977; 50:119~121.
11. Iritani A, Kasai M, Niwa K, et al. Fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in chemically defined medium. *J Reprod Fertil* 1984; 70:487~492.
  12. Dooley VD. Follicular oocytes maturation for use in bovine exogenous and *in vitro*. *Metabolism* 1984; 26:413.
  13. Sirard MA, Lambert RD. Birth of calves after *in vitro* fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet Rec* 1986; 119:167~169.
  14. Ball GD, Bellin ME, Ax RL, et al. Glycosaminoglycans in individual preovulatory and cystic bovine ovarian follicles. *J Anim Sci* 1981; 53 (Suppl. 1):285.
  15. Leibfried L, First NL. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. *Biol Reprod* 1980; 23:705.
  16. Shalgi R, Dekel N, Kraicer PF. The effects of LH on the fertilizability and subsequent developmental capacity of rat oocytes matured *in vitro*. *J Reprod Fert* 1979; 55:429~435.
  17. 金相根, 朴恒均. 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 1988; 12(2):112~119.
  18. 金昌根, 鄭英彩, 朴在元, 宋海範. 소 卵胞卵의 體外成熟과 受精能力에 관한 研究. 韓國畜產學會誌 1988; 30(4):224~232.
  19. 尹山鉉, 朴世必, 朴泰均, 高大煥, 鄭吉生. 牛 卵胞卵의 體外成熟에 관한 研究. II. 發情牛血清, 牛卵胞液 및 卵丘細胞가 卵胞卵의 體外成熟과 體外受精에 미치는 影響. 韓國酪農學會誌 1989; 11 (3):139~146.
  20. Brackett BG, Bousquet D, Boice M, et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod* 1982; 27:147~158.
  21. Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod* 1975; 12: 260~274.
  22. Shea BF, Latour JPA, Berdin KN, et al. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. *J Anim Sci* 1976; 43:809~815.
  23. Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, et al. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. *J Dairy Sci* 1984; 67:2275~2785.
  24. 花田 章, 牛 卵胞內 未熟卵子からの 受精卵生産. 臨床獸醫 1985; 9:71~75.
  25. Fukui Y, Terawaki Y, Ono H. Effects of gonadotropins on the *in vitro* maturation of bovine follicular oocytes. *Jap J Fertil Steril* 1982; 27: 179~187.
  26. Bondioli KR, Wright Jr RW. *In vitro* fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated *in vitro*. *J Anim Sci* 1983; 57(4):1001~1005.
  27. Fukui Y, Fukushima M, Ono H. Fertilization *in vitro* of bovine oocytes after various sperm procedure. *Theriogenology* 1983; 20(6):651~660.
  28. Niwa K, Ohgoda O. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 1983; 30(4):733~741.
  29. Sanbuissho A, Threlfall WR. The effects of estrous cow serum on the maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte *in vitro*. *Theriogenology* 1985; 23:226 (abstract).
  30. Xu KP, Greve T, Callensen H, et al. Pregnancy resulting from cattle oocyte matured and fertilized *in vitro*. *J Reprod Fert* 1987; 81:501~504.
  31. Lu KH, Boland MP, Crosby TF, et al. *In vitro* fertilization of cattle oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 1987; 27:251(abstract).
  32. Fukui Y, Ono H. Effects of sera, hormones and granulosa cells and added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J Reprod Fert* 1989; 86:501~506.
  33. Stone SI, Pomerantz SH, Schwartz-Kripner A, et al. Inhibition of oocytes maturation from a porcine follicular fluid; Further purification and evidence for reversible action. *Biol Reprod* 1978; 19:585~592.
  34. Tsafiriri AN, Dekel N, Barami S. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J Reprod Fert* 1982; 54:1~551.
  35. Critser ECS, Leibfried-Rutledge ML, Eyestone



- WH, et al. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology* 1986; 25:150(abstract).
36. Tsafiriri A, Pomerantz SH, Channing CP. Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluidipartical characterization of the inhibitor. *Biol Reprod* 1976; 14:511~516.
37. Hillensjo T, Baumingers S, Ahren K. Effect of LH on pattern of steroid production by preovulatory follicles of MPS-injected immature rats. *Endocrinology* 1976; 99:996~1002.
38. Hillensjo T, Chari S, Magnusson C, et al. Inhibitory effects of low molecular weight fractions of human follicular fluid upon rat granulosa cells and oocytes *in vitro* *Excerpta Medica in press* 1981; 1~24.
39. Nekola MV, Smith DM. Oocyte maturation and follicle cell viability *in vitro*. *Eur J Obstet Gynec Reprod Biol* 1974; 4:125~131.
40. Jagiello G, Graffeo J, Ducayen M, et al. Further studies of inhibitors of *in vitro* mammalian oocyte maturation. *Fert Steril* 1977; 28:476~481.