

돼지 난포내 난모세포의 체외성숙에 관하여

박 미 희·이 효 종*
경상남도 가축위생시험소
경상대학교 수의과대학*
(1991. 9. 5 접수)

In vitro maturation of porcine follicular oocytes

Mi-hee Park, Hyo-jong Lee *

Gyeongnam Veterinary Service Laboratory

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University *

(Received Sep 5, 1991)

Abstract : This experiment was carried out to establish an effective technique of *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes. Porcine ovaries were collected from an abattoir and delivered to the laboratory in phosphate buffered saline in an hour.

Immatured follicular oocytes were collected from the ovaries and divided into groups by the size of follicles and by the attachment of granulosa cells. The follicular oocytes were cultured in m-KRB solution supplemented with FCS(10%), follicular fluid(10%) or hormones of PMSG(10IU/ml), hCG(10IU/ml) and estradiol-17 β (1 μ g/ml) for 48 hours at 39°C under an atmosphere of 5% CO₂ in air.

The results are as follows ;

1. The mean recovery rate of follicular oocytes was 61.8%.
2. The maturation rate was significantly($p < 0.05$) higher when the oocytes were collected from large-sized follicles and under good state of granulosa cell attachment.
3. The maturation rate was significantly($p < 0.01$) promoted when the follicular oocytes were cultured in m-KRB solution supplemented with follicular fluid(74.8%) or hormones and fetal calf serum(70.6%).

Key words : Follicular oocyte, *in vitro* maturation, pig

서 론

포유동물 난자의 성장과 성숙은 간뇌 시상하부의 성선자극호르몬 방출호르몬(gonadotropin releasing hormone; GnRH)의 조절작용으로 뇌하수체에서 난포자극호르몬(follicle stimulating hormone; FSH), 황체형성호르몬(luteinizing hormone; LH)이 분비되어 이들이 난소의 난포 및 난모세포에 작용함으로써 이루어진다. 태생기에 유사분열에 의해 증식된 원시 성세포는 출생전 난조세포(oogonia)로 되었다가 제1차 난모세포상태에서 출생하게 된다. 개체가 태어난 직후부터 난포내 난자는 제1감수분

열 전기(prophase I)에서 성숙이 억제되어 있으며 사춘기와 더불어 뇌하수체에서 분비되는 lutenizing hormone에 의하여 핵막붕괴(germinal vesicle breakdown, GVB-D)가 일어나면서 난자성숙은 재개되고 개와 여우를 제외한 대부분의 포유동물은 난자의 성숙이 지속되어 배란 직전에는 제2감수분열 중기까지 발달한 상태에서 성숙이 머문다. 그후 수정이 일어나면 제2감수분열이 속개되어 성숙이 완료되고 제2극체가 돌출되면 난자의 핵은 전핵을 형성한다. 체외에서 그래프씨 난포로부터 분리한 난자를 적당한 배양액에서 배양하면 자발적 성숙분열(spontaneous maturation)이 일어나는데 이러한 능력은 난

포강(antrum)형성 직전의 시기에 이미 난자가 획득하는 것으로 알려져 있다.

포유동물에서 난모세포의 체외성숙에 관한 연구는 1936년 Pincus와 Enzman¹이 토끼의 난포에서 채집된 난모세포를 가지고 처음 인공배양하여 체외에서의 핵의 성숙과정을 관찰하였고 아울러 난포강이 형성된 이후의 난모세포는 성선자극호르몬의 자극없이도 체외에서 자발적인 성숙분열이 개시됨을 관찰하였다고 한다.^{2,3} Schroeder와 Eppig⁴, Polanski⁵, Dekel et al⁶ 및 Badenas et al⁷이 실험동물에서 미성숙 난모세포의 체외성숙에 관하여 보고하였고, Shea et al⁸, Fukui와 Sakuma⁹, Fukui et al¹⁰, Ball et al¹¹, Iritani et al¹², Younis et al¹³ 및 Fukui¹³는 소에서, Goodrowe et al¹⁴, Johnston et al¹⁵은 고양이에서 보고하였다.

돼지 난포내 난모세포의 체외배양에 관한 연구는 1966년 Hunter와 Polge¹⁶의 시험보고 이래 Motlik와 Fulka¹⁷,¹⁸는 체외에서 난모세포의 핵막붕괴와 감수분열에 관하여, Iritani et al¹⁹는 체외에서 성숙된 난자의 수정에 관하여, Cran과 Cheng²⁰은 난모세포의 성숙과정에서 난막의 변화에 관하여, Naito et al²¹ 및 Mاتيoli et al²²은 체외에서 성숙된 난자의 발생능 및 체외수정능력에 관하여 보고한 바 있으나 돼지 난포내 난모세포의 체외성숙과정 및 그 조절에 관하여 아직도 불명확한 점이 많으며 나아가서 이들의 수정능력 및 체외발생능력의 향상에 관하여도 많은 연구가 수행되어 오고 있다.

본 실험은 경제적으로 유익한 동물에서 미성숙 난자의 체외인공성숙기법을 향상시키고 아울러 도축으로부터 난소를 활용하여 난자의 다량생산 등에 활용코져 도축장에서부터 채취되어온 돼지의 난소로부터 미성숙 난자를 채집하여 난포의 크기, 난구세포의 부착상태별로 분류하여 난자의 성숙을 차이를 조사하였고, 나아가서 효과적인 배양액을 알아보기 위하여 기본배양액은 m-KRB용액에 BSA, FCS, 난포액 또는 몇가지 성선자극호르몬 등을 첨가하여 난자의 성숙율을 조사하였다.

재료 및 방법

공시동물: 본 실험에 사용될 돼지 난포내 난모세포를 채취하기 위하여 진주근교 도축장에서 도살되는 돼지에서 난소를 포함한 생식도관을 일부 채취하여 항생제가 첨가된 37°C의 Phosphate buffered saline(PBS)가 들어 있는 보온병에 담아 1시간 이내에 실험실로 운반하여 실험에 사용하였다.

난포내 난자의 채취: 실험실에 운반된 난소는 난소표면을 멸균된 PBS로 2~3번 세척한 다음, 난포직경에 따라 1~3mm, 4~7mm, 7mm이상의 세 group으로 구분하여 21gauge 주사침으로 난소질내로 찌른후 주사침을 빼지않

고 흡인상태를 유지하면서 난포에서 난포로 연속적으로 난포액을 흡인하였다. 흡인된 난포액을 petri dish에 담아 실험현미경하에서 난구세포층이 충실하게 부착된 것을 Good, 난구세포층이 일부 떨어졌지만 원형을 유지하고 있는 것을 Fair, 난구세포층이 소실된 것을 Poor로 구분하여, BSA(Bovine serum albumin, Sigma Co., Fraction V)가 첨가된 m-KRB(modified Kreb's Ringer bicarbonate, Toyoda & Chang, 1974) solution에 옮겨 5~6회 세척하여 사용하였다.

배양액: 본 실험에 사용된 배양액은 m-KRB solution에 0.4% BSA만 첨가한 것(m-KRB), 10% 우태아혈청(Fetal Calf Serum, FCS)만 첨가한 것(m-KRB+FCS), 10% 난포액만 첨가한 것(m-KRB+FF) 및 10% FCS와 호르몬(Pregnant Mare's Serum Gonadotropin, PMSG, 10IU/ml; Human Chorionic Gonadotropin, HCG, 10IU/ml Estradiol-17 β , 1 μ g/ml)만 첨가한 것(m-KRB+FCS+Hc)등 4종류 이었으며 배양액을 0.22 μ m millipore filter를 통과시켜 제균한후 4°C의 냉장실에 보관하여 7~10일 이내에 사용하였다.

난포내 난모세포의 배양: 난포란을 난포의 크기별로 구분하여 petri dish(60 \times 35mm, 녹십자에) 각종 배양액 소적을 만들어 멸균된 light paraffin oil(Sigma, Co.)로 피복한 다음, CO₂배양기내에서 밤동안 평형시켰다. 난자는 난구세포가 완전히 둘러싸여져 있는 것과, 일부가 떨어져 나갔지만 원형을 유지한 것으로 분류하여, 배양액 소적으로 옮겨 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간동안 배양하였다.

난자의 성숙정도 판정: 배양이 끝난 난자는 300IU hyaluronidase(Sigma, Co.)처리로 난자주위의 난구세포층을 완전히 제거시킨 다음 제1극체가 형성된 것은 성숙된 것으로 판정하고 제1극체가 형성되지 않은 난자는 Hoechst 33342로 염색하여 McGaughey와 Polge²³ 및 Mon²⁴의 방법에 준하여 성숙판정하였다.

통계학적 분석: 각 시험군에서의 성숙율의 유의성 차이는 Microstat program(Lifetree Software Inc., U.S.A 1984)을 이용하여 Chi-square test를 실시하였다.

결 과

난포내 난모세포의 회수율: 돼지의 난소로부터 총 1, 711개의 난포를 천자하여 1.057개의 난포란을 회수하여 평균 61.8%의 회수율을 얻었다(Table 1).

난포의 크기별로 분류하여 보면 직경이 1~3mm인 small 난포에서는 59.3%, 직경이 4~6mm인 medium 난포에서는 60.6% 그리고 직경이 7mm이상인 large 난포에서는 73.8%의 난자 회수율을 얻어 난포의 크기가 클수록 난자의 회수율도 높았다.

Table 1. Morphological classification of porcine oocytes recovered from ovarian follicles

Follicle size(mm)	No. of follicles punctured	No. of oocytes recovered	Quality of oocytes			Recovery rate (%)
			Good	Fair	Poor	
Small(1~3)	361	214	23	164	27	59.3
Medium(4~7)	1,163	705	189	416	100	60.6
Large(>7)	187	138	94	26	18	73.8
Total or mean	1,711	1,057	306	606	45	61.8

Table 2. *In vitro* maturation of porcine follicular oocytes cultured for 48 hours by follicle size

Follicle size	No. of oocytes cultured	No. of oocytes at stage of							Maturation rate (%)
		GV	MI	AI	TI	MII	PBI	Deg	
Small	97	3	19	1	1	10	52	9	63.9 ^a
Medium	212	4	30	4	3	21	129	20	70.8 ^a
Large	61		2				53	5	86.9 ^b

* GV : germinal vesicle, MI : the first metaphase, AI : the first anaphase, TI : the first telophase, MII : the second metaphase, PBI : the first polar body, Deg : degenerated.

* The proportions with different superscript denote the significant difference($p < 0.05$).

Table 3. *In vitro* maturation of porcine follicular oocytes cultured for 48 hours by the quality of oocytes

Quality of oocytes	No. of oocytes cultured	No. of oocytes at stage of							Maturation rate (%)
		GV	MI	AI	TI	MII	PBI	Deg	
Good	122		10		1	4	96	11	82.0 ^a
Fair	126	4	22	4	2	17	63	13	63.5 ^b

* The proportions with different superscript denote the significant difference($p < 0.01$).

Table 4. *In vitro* maturation of porcine follicular oocytes cultured for 48 hours in m-KRB solution supplemented with various substances

Media	No. of oocytes cultured	No. of oocytes at stage of							Maturation rate (%)
		GV	MI	AI	TI	MII	PBI	Deg	
m-KRB	112	5	19	3	1	14	45	18	52.7 ^a
m-KRB+FCS	111	5	24		3	7	65	7	64.9 ^{ac}
m-KRB+FF	115	2	13	1	1	8	78	2	74.8 ^{bc}
m-KRB+FCS+Ho	153	2	21	3	2	13	95	18	70.6 ^{bc}

m-KRB : modified-Kreb's Ringer Bicarbonate soln, FCS : fetal calf serum, FF : follicular fluid, Ho : hormones(PMSG+HCG+E₂)

* The proportions with different superscript denote the significant difference($p < 0.05$).

채취한 난모세포를 McGaughey(1978)의 방법으로 난구세포의 부착상태에 따른 형태학적으로 분류한 결과 난구세포가 두텁고 조밀하게 부착되어 있는 것이 306(34.5%)개, 난구세포가 일부 떨어져 나갔지만 원형을 유지하고 있는 것이 606(57.3%)로 대부분이 이 두 부류에 속하였다.

난포크기별 난모세포의 성숙율 : 난포내 난모세포의 체외배양시 난포의 크기별에 따른 성숙율을 조사하기 위해서 난포의 직경에 따라 소형, 중형, 대형으로 구분하여 동일한 배양조건으로 성숙시킨 바 각각 63.9%, 70.8%, 86.9%의 성숙율을 얻어 난포의 크기가 클수록 성숙율도

높았다(Table 2 참조). 특히 대형난포에서 채취한 난자의 성숙율은 중형 및 소형난포에서 채취한 난자의 성숙율에 비하여 유의적($p < 0.05$)으로 성숙율이 높았다.

난구세포 부착상태에 따른 난모세포의 성숙율 : 난구세포가 두텁고 조밀하게 부착되어 있는 Good 상태의 난포내 난모세포를 체외배양시켰을 경우의 성숙율은 82.0%였으며, 난구세포가 일부 떨어져 나갔지만 원형을 유지하고 있는 Fair 상태의 난포내 난모세포의 성숙율은 63.5%로 난구세포가 조밀하게 붙어 있을수록 성숙율이 유의적으로($p < 0.01$) 높았다(Table 3 참조).

배양액에 첨가된 첨가제에 따른 난모세포의 성숙 : T-

able 4에서는 배양액에 첨가된 첨가제에 따른 난포내 난모세포의 체외배양 성적을 나타낸 것으로 기본배양액인 m-KRB에 BSA 0.4%를 첨가한 것에서 체외성숙율이 52.7%, FCS 10%를 첨가한 것에서 64.9%, 난포액을 10% 첨가한 것에서 74.8%, 성선자극호르몬(PMSG 10IU + HCG 10IU)과 estadiol-17 β (1 μ g/ml)를 첨가한 것에서는 70.6%로 나타나 체외성숙배양액내에 난포액이나 호르몬을 첨가한 것에서 BSA만 첨가한 것에 비하여 성숙율이 유의적($p < 0.05$)으로 높게 나타났다.

고 찰

본 실험에서 난포의 크기별에 따른 난포내 난모세포의 회수율은 소형에서 59.3%, 중형에서 60.6%, 대형에서 73.8%로 그 평균은 61.8%이었다. Kuhel과 Dukelow²⁵는 Squirrel monkey를 사용한 연구보고서에서 26gauge 주사침을 사용하여 34.4%의 채취율을 보고하였으며, 배란전 난포의 난포액은 점조성이 크기 때문에 채취가 어렵다고 하였다. 또한 Leibfried와 First²⁶는 소의 난포에서 20gauge 주사침을 사용하여 난모세포를 채취하였을 때 67.1%의 채취율을 보고하였다. 따라서 본 실험의 결과와 이들의 보고한 난모세포 채취율은 난포의 크기에 상관관계가 있는 것으로 생각된다. 난구세포의 부착상태에 따라 1,057개의 회수된 난모세포를 Good, Fair 및 Poor로 구분하였을 때 각각 306(28.9%), 606(57.3%), 154(13.7%)개였고 이중 난구세포가 부착되어 있는 Good 및 Fair의 난모세포가 912(86.3%)로 채취된 난모세포의 대부분을 차지하였다. 이와같은 결과는 Good에 해당하는 난자가 약 25% 정도 된다고한 McGaughey²⁷의 연구보고와 유사하였다. 또한 채취된 대부분(86.3%)이 난구세포를 가지고 있었는데 이는 Leibfried와 First²⁶가 소에서 직경 3mm의 난포에서 채취된 대부분의 난모세포가 난구세포를 가지고 있었다는 보고와 일치한다.

난포크기별 난자의 체외성숙율은 small 난포에서의 63.9%, medium 난포에서의 70.8%에 비하여 large 난포로부터 채란된 난자의 성숙율이 86.9%로 유의적으로($p < 0.05$) 성숙율이 높았다. 이와같은 결과는 돼지에서²⁸ 뿐만 아니라 양²⁹ 및 토끼³⁰에서도 관찰된 바 있으나 소에서 Thibault et al³¹, Fukui와 Sakuma⁹ 및 Leibfried·Rutledge et al³²이 난포크기에 따라 성숙율에 영향이 없었다는 결과와 차이가 있었다.

McGaughey²⁷의 방법으로 형태적 분류를 실시하여 투명대에 부착된 난구세포층의 유무에 따라 난구세포층이 두껍고 조밀하게 둘러싸여 있고 완전한 구형을 보이는 것을 Good, 부분적으로 난구세포가 떨어져 나갔지만 원형을 유지하고 있는 것을 Fair, 거의 대부분의 난구세포층이 소실되고 난자의 모양도 원형이 아닌 것들을 Poor로

분류하였다. 또한 McGaughey²⁷는 Good보다 Poor로 판명된 난모세포에서 난핵포기(GV)의 형태 이상이 두드러진다고 하였는데 본 실험의 결과에서도 난구세포가 두껍고 조밀하게 부착되어 있는 난모세포에서의 성숙율이 고도의 유의성을 보이며 높게 나타났다. Sato et al³³은 돼지 난포내 난모세포를 체외배양한 실험에서 난구세포를 가지고 있는 난모세포가 난구세포가 없는 난모세포에 비해 난핵포 봉괴율(GVBD)이 높고 MII로 이행율이 현저히 높으며 염색체의 이상양측이나 소실과 같은 퇴행적 변화는 난구세포가 없을 경우 더욱 높게 나타났다고 보고하였다. 또한 Hillenjo et al³⁴도 난구세포로 둘러싸인 돼지 난포내 난모세포의 경우 5%이하의 난자 퇴화율을 보인 반면 난구세포가 없는 경우 난자퇴화율은 20~30%로 증가하였다고 하였으며, Fukui와 Sakuma⁹는 난구세포의 존재는 난포의 크기나 난소의 상태보다 더욱 중요한 요소라고 보고한 바 있다. 그러나 Staggmiller와 Moor³⁵는 면양 난모세포의 배양시 난구세포의 존재가 성숙정도에 별다른 영향을 주지않는다고 보고하였다.

돼지 난포내 난모세포의 체외성숙에 많이 사용된 기본배양액은 Toyoda와 Chang³⁵이 KRB액을 개선하여 사용한 modified-KRB 액이며 근년에는 이것에 우태아혈청이나 난포액을 첨가하여 체외성숙율이 향상되는 결과를 보았으며^{37,3}, 본 실험에서도 m-KRB액에 우태아혈청을 첨가하였을 때의 성숙율(64.9%)이 첨가하지 않았을 때의 성숙율(52.7%)보다 높았으나 통계학적으로는 유의성이 나타나지 않았다. 그러나 상기 보고자들의 실험에 비추어 앞으로 더 실험반복을 늘려 수행하면 유의성 있는 결과가 나오리라 추측된다. m-KRB액에 우태아 혈청보다는 난포액을 첨가하였을 때 더욱 나은 성숙율을 기대할 수 있다고 하는데 본 실험에서도 유의성($p < 0.05$)있는 성숙율의 향상이 관찰되었다. Naito et al³⁸은 난포액으로 돼지난자를 배양하였을 경우 체외성숙율이 향상되었을 뿐만 아니라 체외수정능력도 향상되었다고 한다. 난자성숙에 있어서 난포액의 역할에 대하여는 아직도 명확하게 규명되어 있지는 않다. 박 등³⁹의 연구결과에 의하면 난포액의 첨가농도가 10%일 경우 난자의 성숙효과가 가장 좋았다고 하며, 50% 첨가 농도에서는 오히려 성숙이 억제된다고 하였는데 그 이유에 대하여는 확실하지 않지만 Tsafri와 Channing⁴⁰은 작은 분자량의 단백질 물질인 oocyte maturation inhibitor(OMI)라는 것이 난포내의 과립막세포에서 생성되어 난자의 자발적 성숙을 억제하는 작용이 있다는 것을 발견한 이래 이러한 현상은 소, 토끼, 면양, 햄스타 및 사람에서도 관찰되었고 이 물질은 동물종간에 특이하지 않다고 한다.⁴¹

Pincus와 Enzman(1935)은 토끼의 난자를 난포에서 분리하여 체외에서 배양시키면 호르몬의 첨가 없이도 난

자의 성숙이 재개되는 현상을 관찰하였는데 이러한 결과는 OMI의 존재와 역할을 설명하는데 좋은 자료가 된다.

LH는 포유류 난자의 감수분열의 재개에 관여되어 있고 그리고 FSH는 난포 및 난자의 발육에 관여되어 있으므로 이러한 성선자극호르몬이 난자의 체외배양액에 첨가되어 사용되어 오고 있다.^{3,11,21} 돼지 난포내 난모세포의 체외성숙에 있어서 배양액에 성선자극호르몬을 첨가하여 체외성숙율을 향상시킨 보고는 많지 않아 정확한 비교 검토가 어려우나 Naito et al²¹은 돼지 난포내 난모세포를 FSH가 첨가된 난포액에 인공배양하였던바 약 80%의 성숙율을 얻었다. 본 실험에서는 FCS가 10% 함유된 m-KRB액에 PMSG, hCG 및 estradiol-17 β 를 첨가하였더니 그 성숙율이 70.6%로서 이러한 호르몬들을 첨가하지 않았을 때의 성숙율(64.9%)에 비하여 다소 향상되는 경향을 보였다.

앞으로 이러한 호르몬들의 난자성숙에 있어서 정확한 기능 규명과 적절한 농도에 관하여 더 연구가 수행되어야 할 것으로 보인다. 그리고 체외에서 성숙된 난자의 수정능력과 정상적인 개체발생능력에 관하여도 앞으로 더 추구되어야 할 과제이다.

결 론

돼지의 미성숙 난자를 체외에서 인공적으로 성숙시키기 위하여 도축장에서 채취하여온 난소의 난포로부터 난구세포로 쌓여진 난모세포를 적출하여 난포의 크기별, 난구세포의 부착상태에 따른 형태별로 분류하여 m-KRB액에 FCS, 난포액 또는 여러가지 호르몬을 첨가하여 39°C의 CO₂ 배양기에서 48시간 배양하여 난자의 체외성숙율을 조사하였다.

그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 총 1,711개의 난포를 천자하여 1,057개의 난모세포를 채취하여 회수율은 61.8%였으며 이들을 형태적으로 Good, Fair, Poor의 세가지로 구분하였을 때 각각 306(28.9%), 606(57.3%), 145(13.7%)개였다.

2. 난소에서 채취된 난포내 난모세포를 난포크기별로 소형, 중형 및 대형으로 나누어 배양한 결과 성숙율은 각각 63.9%, 70.8%, 86.9%로 난포크기가 클수록 성숙

율이 유의적으로($p < 0.05$) 증가하였다.

3. 난구세포의 부착상태에 따라 Good과 Fair로 나누어 배양한 결과 성숙율은 각각 82.0%, 63.5%였다.

4. 배양액인 m-KRB액에 난포액만(10%)을 첨가하였을 경우 난자의 성숙율은 74.8%이었고, FCS(10%)와 성선자극 호르몬(PMSG; 10IU/ml, hCG; 10IU/ml) 및 estradiol-17 β (1 μ g/ml)를 첨가하였을 경우에 그 성숙율은 70.6%로서 m-KRB액만으로 배양했을 때의 성숙율(52.7%)에 비하여 유의적($p < 0.01$)으로 높았다.

참 고 문 헌

1. Pincus G, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. 1, The activation of ovarian eggs. *J Exp Med* 1935; 62 : 665~675.
2. Eppig JJ, Downs SM. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol Reprod* 1984; 30 : 1~11.
3. Younis AI, Brackett GB, Fryer-Hosken RA. Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization *in vitro*. *Gam Res* 1989; 23 : 189~201.
4. Schroeder AC, Eppig JJ. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. *Develop Biol* 1984; 102 : 493~497.
5. Polanski Z. *In vivo* and *in vitro* maturation rate of oocytes from two strains of mice. *J Reprod Fert* 1986; 78 : 103~109.
6. Dekel N, Galiani D, Beers WH. Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes : The response to gonadotropins at different stages of follicular development. *Biol Reprod* 1988; 38 : 517~521.
7. Badenas J, Santalo J, Calafell JM, et al. Effect of the degree of maturation of mouse oocytes at fertilization : A source of chromosome imbalance. *Gam*

Legends for figures

Fig 1. Porcine follicular oocytes enclosed with follicle cells($\times 100$).

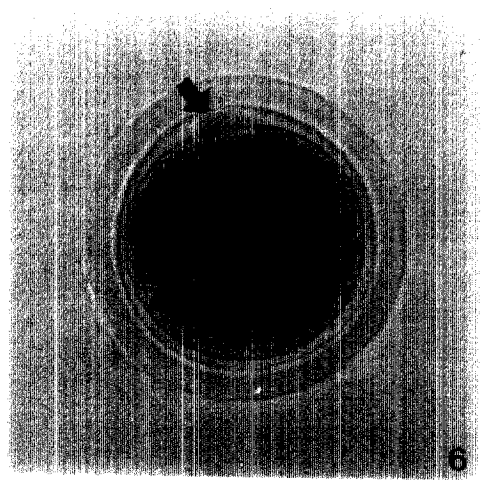
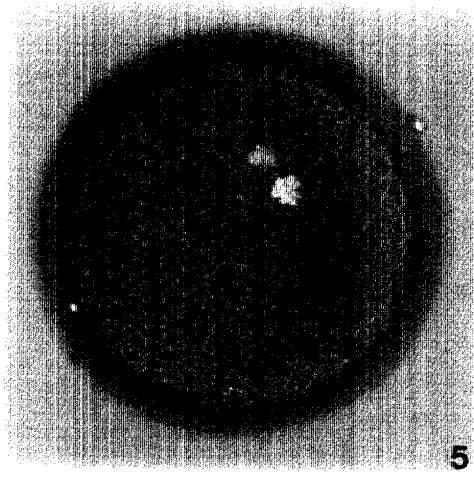
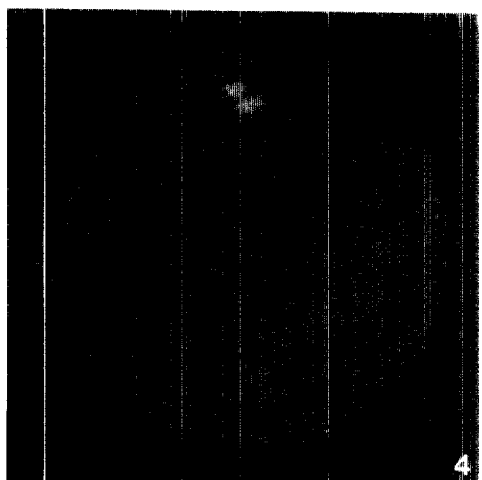
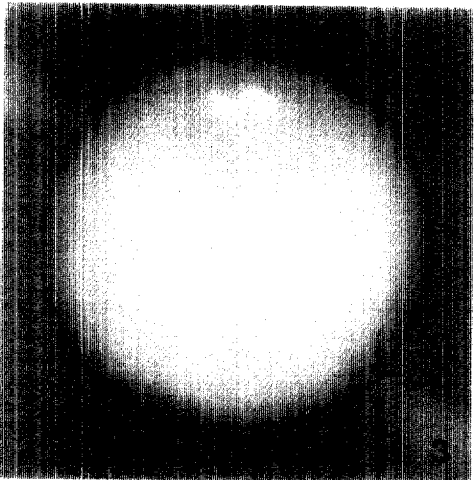
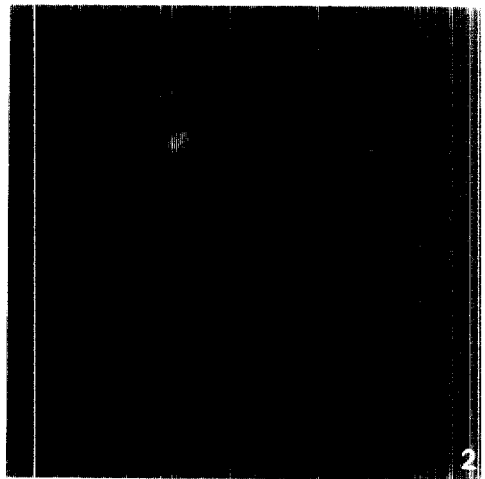
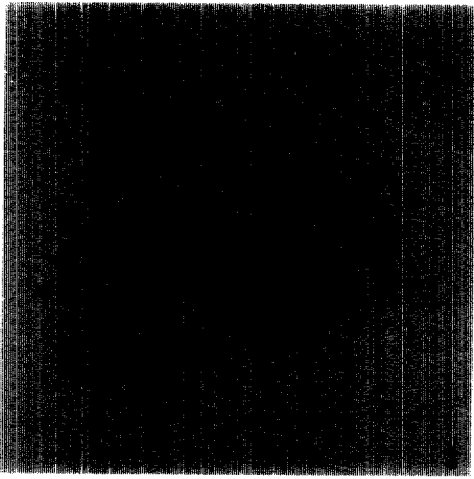
Fig 2. Cultured porcine oocytes at metaphase I stage. Stained with Hoechst 33342 ($\times 200$).

Fig 3. Cultured porcine oocytes at anaphase I stage. Stained with Hoechst 33342 ($\times 200$).

Fig 4. Cultured porcine oocytes at telophase I stage. Stained with Hoechst 33342 ($\times 200$).

Fig 5. Cultured porcine oocytes at metaphase II stage. Stained with Hoechst 33342 ($\times 200$).

Fig 6. Matured porcine oocytes after *in vitro* culture. The first polar body was extruded (arrow indicated) ($\times 200$).



- Res* 1989; 24 : 205~218.
8. Shea BF, Latour JPA, Bedirian KN, et al. Maturation *in vitro* and subsequent penetrability bovine follicular oocytes. *J Anim Sci* 1976; 43 : 809~815.
 9. Fukui Y, Sakuma Y. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*; Relation to ovarian activity follicular size and the presence of cumulus cells. *Biol Reprod* 1980; 22 : 669~672.
 10. Fukui Y, Fukushima M, Ono H. Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation *in vitro*. *J Exp Zool* 1983; 226 : 137~142.
 11. Ball GD, Leibfried ML, Ax RL, et al. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. *Dairy Sci* 1984; 67 : 2775~2785.
 12. Iritani A, Kasai M, Niwa K, et al. Fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *J Reprod Fert* 1984; 70 : 487~492.
 13. Fukui Y. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod & Develop* 1990; 26 : 40~46.
 14. Goodrowe KL, Wall RJ, O'Brine SJ, et al. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 1988; 39 : 355~372.
 15. Johnston LA, O'Brien SJ, Wildt DE. *In vitro* maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. *Gam Res* 1989; 24 : 343~356.
 16. Hunter RHF, Polge C. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotropin. *J Reprod Fert* 1966; 12 : 525~531.
 17. Motlik J, Fulka J. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Zool* 1976; 198 : 155~162.
 18. Motlik J, Fulka J. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 1986; 25 : 87~96.
 19. Iritani A, Niwa K, Imai H. Sperm penetration of pig follicular oocytes matured in culture. *J Reprod Fert* 1978; 54 : 379~383.
 20. Cran DG, Cheng WTK. Changes in cortical granules during porcine oocyte maturation. *Gam Res* 1985; 11 : 311~319.
 21. Naito K, Fukuda Y, Ishibashi I. Developmental ability of porcine ova matured in porcine follicular fluid *in vitro* and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 1989; 31 : 1049~1057.
 22. Matioli M, Bacci ML, Galeati G, et al. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 1989; 31 : 1201~1207.
 23. McGaughey RW, Polge C. Cytogenetic analysis of pig oocytes matured *in vitro*. *J Exp Zool*. 1971; 176 : 383~396.
 24. Mori CH, Hshimoto, Hoshno K. Fluorescence microscopy of nuclear DNA in oocytes and zygotes during *in vitro* fertilization and development of early embryos in mice. *Biol Reprod* 198; 39 : 737~742.
 25. Kuhel TJ, Dukelow WR. Maturation and *in vitro* fertilization of follicular oocytes of the squirrel monkey (*Samiri sciureus*). *Biol Reprod* 1979; 21 : 545~556.
 26. Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci* 1979; 48 : 76~85.
 27. McGaughey RW. In "Methods in Mammalian Reproduction"(J. C. Daniel, Jr., ed), Academic press, New York San Francisco, London. 1978; pp. 1~19.
 28. Motlik J, Crozet N, Fulka J. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J Reprod Fert* 1984; 72 : 323~328.
 29. Moor RM, Trounson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent development capacity. *J Reprod Fert* 1977; 49 : 101~109.
 30. Eae IH, Foote RH. Effects of hormones on the maturation of rabbit oocytes recovered from follicles of various sizes. *J Reprod Fert* 1975; 42 : 357~350.
 31. Thibault C, Gerard M, Monezo Y. Nuclear and cytoplasmic aspects of mammalian oocytes maturation *in vitro* in relation to follicle size and fertilization. In : Sperm action. *Prog reprod Biol* 1976; 1 : 233~240.
 32. 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.
 33. Sato E, Iritani A, Nishikawa Y. Rate of maturation deviation of pig follicular oocytes cultured *in vitro*. *Jap J Zootech Sci* 1978; 49 : 400~405.

34. Hillenjo T, Channing CD, Promerantz SH, et al. Intrafollicular control of oocyte maturation in the pig. *In vitro* 1979;15 : 32~39.
 35. Stagmiller RB, Moor RM. Effect of follicular cells on the maturation and developmental competence of ovine oocyte matured outside the follicle. *Gen Res* 1984;9 : 221~229.
 36. Toyoda Y, Chang MC. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J Reprod Fert* 1974;36 : 9~22.
 37. Kim CK, Chung YC, Park JW, et al. Studies on maturation *in vitro* and fertilizing ability of bovine follicular oocytes. *Korean J Anim Sci* 1988;30 : 224~232.
 38. Naito K, Fukuda Y, Toyoda Y. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. *Gen Res* 1988;21 : 289~295.
 39. 박수봉, 박항균, 入谷明. 체외배양시 과립막세포와 공배양된 돼지 난포란의 성숙과 수정. *한국축산학회지* 1990;32 : 15~19.
 40. Tsafiri A, Channing CP. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1975;13 : 149.
 41. Tsafiri A, Dekel N, Bar-Ami S. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J Reprod Fert* 1982;64 : 541~551.
-