

## 체외성숙 돼지난포란의 체외수정과 배발달에 관한 연구

### II. 각종 배양액, 돼지난포세포 및 생쥐태아간세포와의 공동배양이 체외수정 돼지 난포란의 체외발달에 미치는 영향

정형민 · 엄상준 · 승경록\* · 이상진 · 이훈택 · 정길생

건국대학교 동물자원연구센터

건국대학교 의과대학

## Studies on *In Vitro* Fertilization and Development of *In Vitro* Matured Porcine Follicular Oocytes

### I. Effect of Various Media and Co-culture with Porcine Cumulus Cells or Mouse Fetal Fibroblast Cells on *In Vitro* Development of *In Vitro* Fertilized Oocytes

Chung, H.M., S.J. Uhm, K.R. Seung\*, H.T. Lee, and K.S. Chung

Animal Resources Research Center, \*College of Medicine, Kon-Kuk University

## SUMMARY

To provide the optimal culture conditions for the development of *in vitro* produced embryos, we have been investigated various culture media as well as co-culture systems using porcine cumulus cells or mouse fetal fibroblast cells. Porcine ovaries were brought to the laboratory from local slaughter house within 1 hour after slaughtering and cumulus oocytes complexes were recovered from antral follicles(3~5mm) with 23 gauge needle. To maturate follicular oocytes, cumulus oocytes complexes were washed three times with TCM-199 containing 25mM HEPES and incubated(39°C, 5% CO<sub>2</sub> in air) in various maturation media for 42 hrs. Ejaculated and liquid stored boar spermatozoa capacitated with different sperm capacitation methods and media were prepared for fertilizing of matured follicular oocytes *in vitro*. Fertilization was performed by adding 5~10  $\mu$ l of capacitated spermatozoa containing 1~5  $\times$  10<sup>5</sup> sperm/ml to droplets. Eighteen to twenty-eight hours after sperm insemination, fertilized eggs were washed three times with culture media and transferred to the various culture media, to the culture media with a monolayer of somatic cells. The *in vitro* development rates of 1-cell embryos cultured with three different media, m-KRB, BECM and TCM-HEPES were 0~1.0%, showing extremely lower rates. Especially, most of embryos were observed to arrest the development beyond 4-cell stages. The rates of embryos developed to 2-, 4-, 8-, 16-, 32-cell and morula or blastocyst stage in co-culture with porcine cumulus cells and mouse fetal fibroblast cells were 61.1~67.0%, 59.0~58.0%, 42.5~43.1%, 28.4~30.2% and 20.4~21.0%, respectively. These development rates upto morula or blastocyst stages were significantly higher than those of the embryos cultured in the basic culture medium(P<0.01).

These findings suggest that co-culture of *in vitro* fertilized eggs with porcine cumulus cells or mouse fetal fibroblast cells enhance the development of fertilized eggs to morula or blastocyst stage *in vitro*.

## I. 서 론

체내 혹은 체외에서 수정된 1-세포기 수정란을 체외 배양할 경우 특정 발달단계에서 그 발생이 정지되는 현상이 나타나는데 이를 “*in vitro* cell block” 현상이라 하고 가축의 경우 소에서는 8~16-세포기에서, 돼지의 경우 4-세포기에서 나타나는데 이러한 현상의 원인에 대해서는 정확히 규명되지는 않았지만 대부분 embryonic genome이 활성화되는 시기와 일치한다 (Jarrell 등, 1991). 이러한 현상을 극복할 수 있는 방법으로서서는 수정란 배양액의 조성 변화(Davis와 Day, 1978; Petters 등, 1990; Reed 등, 1992)와 성장촉진 인자(Saito와 Niemann, 1991)나 아미노산의 첨가(Meyen 등, 1989), 각종 체세포와의 공동배양 (Allen과 Wright, 1984; Jin 등, 1991) 또는 이들 세포의 분비산물의 이용(Kane, 1992), 그밖에 난관액이나 복수 등과 같은 체액의 첨가(Archibong 등, 1989; Collas 등, 1991)나, 동종 혹은 타종의 난관 혹은 자궁내 배양(Yoshida 등, 1990; Prather 등, 1991) 및 생쥐난관을 이용한 기관배양(Krishire 등, 1989a,b) 등이 알려져 있다.

초기배의 발달을 유도하기 위한 배양액의 개발에 따라 많은 배양에 미치는 몇몇 요인들이 밝혀졌는데, Bavister 등(1989)은 배양액내에 glucose와 phosphate를 제거함으로써 햄스터 난자의 체외배양을 유도할 수 있었으며 에너지원으로 아미노산의 역할을 강조하였다. 가축 수정란의 배양에 있어서 대부분의 연구자들이 체세포와의 공동배양을 이용하는데 이들 공동배양하는 체세포의 역할에 대해서는 아직까지 확실하지는 않으나 배양액 중에 존재하는 세포독성물질의 제거 혹은 중화나 체세포에서 분비되는 세포분열 촉진 인자에 기인된다고 한다(Kane 등, 1992). 최근에 성장촉진인자의 첨가효과에 대한 연구가 진행되고 있는데 현재의 결과로는 성장촉진인자의 첨가가 가축 수정란의 체외배양에 있어서 결정적인 영향은 아니지만 보완적인 작용을 나타낸다(Herrler 등, 1992). 다만 in-

sulin, transferrin 및 epidermal cell growth factor 등은 소와 산양수정란의 발달을 촉진하는 작용을 수행한다는 것이 확인되었다(Kane 등, 1992).

그러나 상기 서술한 연구결과에도 불구하고 돼지 체외수정란의 체외배양에 관해서는 아직까지 안전한 배양체계가 확립되어 있지 않고 있다. 다만 체내수정이 이루어진 1-세포기 수정란 혹은 “*in vitro* cell block” 단계인 4-세포기 이후의 수정란을 이용하여 배반포기 단계까지 배양하는 기초적인 연구결과만 있을 뿐이다 (Davis와 Day, 1978; Allen과 Wright, 1984; Meyen 등, 1989; Reed 등, 1992). 이에 본 연구에서는 체외성숙과 수정이 이루어진 돼지 1-세포기 수정란의 체외발달을 제고하기 위해 각종 배양액과 돼지 난구세포 및 생쥐태아간세포와 공동배양을 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시동물

난포란은 도축장에서 도살된 돼지로부터 회수하였고, 체외수정란의 기관배양을 위해서는 ICR계통의 자성생쥐를 이용하였는데 이들의 주령은 6~8주였으며 체중은 20~25g의 것을 사용하였다.

### 2. 난포란의 회수

도축장에서 도살되는 돼지로부터 난소를 회수하여 39℃로 조정된 멸균 생리식염수가 충만된 보온병에 담아 1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 채차 멸균 생리식염수로 난소의 이물질과 혈액을 세척한 다음 70% 알콜스폰지를 이용하여 난소의 표면을 소독하였다. 이어 23 gauge의 주사침이 부착된 10ml 주사기를 이용하여 2~6mm 크기의 가시난포를 흡인한 다음 이를 10ml 원심분리관에 분주한 후 10분간 정지시켰다. 이후 원심분리관 하단의 침전물을 채취하여 TCM-HEPES(25mM) 배양액하에서 난포란만을 회수하였다. 회수된 난포란중 난구세포가 치밀하게 부착되고 난자의 세포질이 균일한 것만을 선별하여 실

험에 공시하였다.

### 3. 미성숙 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙은 TCM-HEPES배양액에 10% FCS(fetal calf serum, Gibco BRL, USA)와 1  $\mu$ g/ml FSH, 2IU/ml hCG 및 1  $\mu$ g/ml의 Oestradiol-17 $\alpha$ 가 첨가된 배양액을 제조하고 0.2  $\mu$ m의 membrane filter(Gelman Co., USA)로 여과한 후 4-well culture dish에 1ml 적하한 뒤 2시간 이상 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 공기조건의 배양기내에서 평형시킨 후 각 well당 20개의 미성숙 난포란을 침지하여 42시간 동안 배양함으로써 성숙을 유도하였다(Chung 등, 1992).

### 4. 정자의 수정능 획득과 체외수정

#### 1) 정액의 준비와 수정능 획득

본 연구에서 사용한 정액은 축산시험장의 종돈에서 수음법으로 채취한 정액을 사용하였는데 정액 채취후 실험실에서 현미경적 검사에 의해 운동성이 80%이상이고 기형율이 20%이하의 것만을 사용하였으며, 액상 정액의 보존기간은 3일 이상 경과된 것은 이용하지 않았다.

정자의 수정능 획득은 90%와 45%의 percoll(Pharmacia, Sweden)이 함유된 정자세척용 m-TALP배양액을 제작한 다음 원심분리관에 90% percoll용액 2ml를 하단에 45% percoll용액 2ml를 상단에 혼합되지 않게 층층의 gradient를 제작하였다. 이후 이들 원심분리관 상층에 정액 2ml를 분주한 다음 2,000rpm에서 15분간 원심분리를 실시하여 수정능획득을 유도하였다.

#### 2) 체외수정

체외성숙이 완료된 난포란은 TCM-HEPES배양액으로 5회 세척한 다음 상기 방법에 의해서 수정능이 획득된 정자를 이용하여 수정을 유도하였다. 이때 정자의 농도는 모두 5  $\times$  10<sup>5</sup> /ml로 조정하였으며 이들 정자의 운동성은 80%이상의 것만을 사용하였다. 수정 후 18~20시간째에 난포란을 회수하여 신선배양액으로 세척한 다음 각종 배양액, 공동배양, 합성난관액 및 생쥐난관과의 기관배양을 실시하여 배발생을 유도하였다.

### 5. 체외수정된 난포란의 체외배양

체외성숙 및 체외수정에 의해서 작성된 수정란의 체외발생을 유도하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.

#### 1) 체외배양용 배양액의 효과

체외수정된 난포란의 체외배양을 위하여 다음과 같은 배양액을 제조하여 최적의 배양액을 선정하였다. 사용한 배양액으로는 TCM-199배양액에 10% FCS를 첨가한 것, BECM배양액(Beltsville embryo culture medium, Pursel, Personal commumnication) 및 m-KRB배양액(Petters 등, 1990)이었다. 이들 배양액에 체외수정후 18~20시간째에 회수된 난포란중 제2극체의 방출이 확인된 난자만을 선별하여 1ml당 30개씩 나누어 배양하면서 매 24시간간격으로 배발생 정도를 관찰하였다.

#### 2) 돼지 난구세포와 생쥐태아간세포와의 공동배양이 체외수정란의 체외발생에 미치는 효과

체외수정된 수정란의 체외발생율의 제고와 체외발생 정지현상(*in vitro* cell block)을 극복하기 위하여 돼지난구세포(porcine cumulus cells) 및 생쥐태아간세포(mouse fetal fibroblast cells)를 이용하여 단층세포를 제작한 다음 수정란의 체외배양을 실시하였다. 돼지 난구세포의 경우 난포란의 체외성숙을 유도한 다음 0.1% hyaluronic acid를 이용하여 난구세포를 회수한 다음 이를 1~3  $\times$  10<sup>6</sup> /ml의 농도로 4-well plate에 적하하여 2일간 배양하므로써 단층세포(monolayer)를 작성하였다. Monolayer가 작성된 well상에 수정란을 20개씩 옮겨 5일간 배양하였다. 한편, 생쥐태아간세포의 경우 임신 13~15일령의 생쥐를 도살하여 외과적으로 자궁을 적출한 다음 자궁을 절개하여 태아만을 멸균 생리 식염수에 침지하였다. 이어 내장과 혈액을 제거한 태아조직을 직경 2~5mm 정도로쇄절하여 1% gelatin (Sigma, USA)처리된 50ml culture flask에 적하하여 5일간 배양하므로써 단층세포를 유도한 다음 Trypsin-EDTA처리를 실시하여 세포를 분리시킨 다음 신선배양액으로 3회 원심분리를 실시하여 세척하였다. 이어 이들세포를 1~3  $\times$  10<sup>6</sup> /ml의 농도로 조정하여 4-well plate에 옮겨 3~5

일간 추가 배양하므로서 단층세포를 작성하였다. 상기 모든 단층세포에 체외수정이 이루어진 수정란을 well 당 20개씩 옮겨 6일간 배양을 실시하면서 수정란의 체외발생율을 조사하였으며 이들 모든 배양액은 2일마다 50%씩 신선 배양액으로 교체하여 사용하였다.

### 6. 배양조건

본 연구에서 사용된 난포란의 체외성숙, 수정 및 체외배양을 위해서는 39℃의 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 공기 조건의 배양기(Forma, USA)에서 실험을 실시하였다.

### 7. 통계처리

본 연구에서 얻어진 모든 실험자료의 통계처리는  $\chi^2$  검정을 실시하여 P<0.05이하의 유의성만을 대조구와 처리구간의 통계학적 차이로 인정하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 체외수정 난포란의 체외배양에 미치는 배양액의 영향

체외성숙 및 수정이 이루어진 돼지 난포란의 체외발생에 필요한 최적의 배양조건을 확립하기 위하여 첫째로 m-KRB, BECM 및 TCM-HEPES 배양액을 공시하여 체외수정 돼지 난포란을 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 공시된 전 배양액에서 체외수정 돼지난포란의 발달율은 극히 저조하였다. 특히 4-세포기까지의 발달율은 배양액에 관계없이 34.0~57.8%로 높은 난할율을 나타내었으나 8-세포기 이후의 발달율은 급격히 낮아졌으며, 상실배기 혹은 배반포기로의 발달율은 m-KRB 배양액과 TCM-HEPES 배양액에서는 인정되지 않았으며 BECM 배

양액 처리구에서 1.0%라는 극히 저조한 배발달율을 보였을 뿐이다. 이러한 결과는 체외수정 혹은 체내수정이 이루어진 1-세포기 돼지 수정란을 체외에서 배양할 경우 4-세포기에서 그 발달이 정지된다고한 Jarrell 등(1991)과 Reed 등(1992)의 보고와 일치되는 것이라 하겠다.

일반적으로 수정란을 체외배양할 경우 특정 발달단계에서 그 발달이 정지되고 결국 퇴행하는 현상, 즉 체외발생정지 현상 (*in vitro* cell block)이 나타나는데 돼지의 경우는 4-세포기에서 이런 현상이 일어난다고 알려져 있다. 그러나 이러한 현상이 어떠한 원인에 의해서 일어나는지에 대해서는 알려져 있지 않지만 일반적으로 수정란에서 모체에서 유래한 mRNA에 의한 단백질 합성이 끝나고 수정란 자체로부터 유래된 mRNA에 의해서 단백질 합성이 시작되는 시점과 일치된다고 알려져 있다 (Jarrell 등, 1990). 지금까지 보고된 체외발생정지 현상을 극복하기 위한 방법으로는 난관이나 자궁 등과 같은 생식기도 세포를 포함한 여러가지 체세포와의 공동배양 (Newcomb 등, 1978; Camous 등, 1984; Goto 등, 1988; Fukuda 등, 1990; Pollard 등, 1991)이나 이들 세포의 분비산물의 첨가 (Allen과 Wright, 1984), BSA첨가 농도 조정을 포함한 배양액의 조성변화 (Menino와 Wright, 1982; Petters 등, 1990), 동종 혹은 이종의 난관내 이식 및 기관배양 (Yoshida 등, 1990; Krisher 등, 1989), 난관액이나 복수 등과 같은 생체액의 첨가 (Archibong 등, 1989; Collas 등, 1991) 및 fibronectin이나 skin gelatin 등과 같은 extracellular matrix의 첨가 (Saito와 Niemann, 1991) 등이 알려져 있지만 아직까지 연구의 초기단계에 있는 실정이다. 일반적으로 가축수정란의 체외배양시 에너지원으로 배양액에 첨가되는 glucose의 경우 생쥐와 같은 실험

**Table 1. *In vitro* development of *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes in three different culture media in five repeated experiments**

Media	No. of embryos*		No. of embryos developed to (%)			
	examined	2-cell	4-cell	8~16-cell	32-cell	Mo. or Bl.
m-K R B	459	264(57.5)	193(42.0)	43(9.4)	16(3.5)	-
BECM	306	249(81.4)	177(57.8)	28(9.2)	16(5.2)	3(1.0)
TCM-HEPES	582	267(45.9)	198(34.0)	41(7.0)	6(1.0)	-

\* Ova with 2nd polar body

동물 수정란 뿐만 아니라 가축 초기배의 체외배양에 대해서도 나쁜 영향 (Seshagiri와 Bavister, 1991; Chatot 등, 1989; Ellington 등, 1990; Petters 등, 1990)이 나타난다는 사실이 알려져 있다. 따라서 소, 면양 및 돼지 등과 같은 가축 수정란의 체외배양시에는 glucose를 제거하여 사용한다. Glucose와 함께 phosphate 역시 배발달에 해로운 작용을 한다는 보고가 있다 (Petter 등, 1990). 이와 같이 초기배의 발달에 있어서 glucose와 phosphate의 유해작용은 "Crebtree effect"라는 현상으로 세포내 mitochondria의 산화작용이 억제되어 원활한 에너지 생산이 이루어지지 못하여 배발달이 중지된다고 한다 (Seshagiri 등, 1991). 본 연구에서 사용된 배양액 중에는 glucose와 phosphate가 다량으로 함유되어 있는데 이러한 이유로 인하여 체외수정란의 발생이 억제되었을 것으로 사료되나 정확한 원인규명은 추후에 다시 검토되어야 할것이다.

## 2. 체외수정 난포란의 발생에 미치는 각종 체세포와 의 공동배양의 효과

단층배양이 유도된 돼지 난구세포와 생쥐 태아간세포가 함유된 배지에서 성숙 및 수정이 이루어진 수정란을 배양한 결과는 Table 2와 3에 나타난 바와 같았다. Table 2와 3에서 보는 바와 같이 돼지 난구세포와 공동배양한 경우 체외수정된 난자가 2-, 4-, 8-, 16-, 32-세포기 및 상실배기 및 배반포기로 발달한 비율은 각각 61.1%, 59.0%, 42.5%, 28.4% 및 20.4%였으며 생쥐 태아간세포와 공동배양한 군에서의 배발달율은 각각 67.0%, 58.0%, 43.1%, 30.2% 및 21.0%로서 두 처리군간의 유의차는 인정되지 않았다. 특히 4세

포기 이후의 배발달은 42.5~43.1%의 난할율을 나타내어 Table 1에서 제시된 4-세포기 이후로의 발생정지현상을 상당히 극복하였다. 이러한 결과는 돼지 난구세포나 생쥐 태아간세포와의 공동배양은 체외발생정지 현상을 상당한 수준까지 극복하고 성공적으로 배발생을 유도할 수 있다는 가능성을 시사하는 결과라 하겠다. 이러한 결과는 Wright 등 (1981)이 소수정란을 간세포 (fibroblast cell)와 공동배양할 경우 배반포의 부화율이 촉진되며, trophoblastic vesicle과 소수정란을 체외배양할 경우 8~16-세포기에서 발달이 정지되는 현상이 극복된다고 한 보고, 그리고 Allen과 Wright (1984)가 체내수정이 이루어진 1-세포기 수정란을 자궁내막세포와 공동배양할 경우 성공적으로 배반포까지 발달시킬 수 있다고한 보고 및 Jin 등 (1991)이 체내수정이 이루어진 4-세포기 수정란을 avian retrovirus를 생산하는 세포와 공동배양할 경우 57.7%가 배반포까지의 발달한다고 한 결과와 일치되는 것이라 하겠다. 현재까지의 연구보고에 의하면 생식기도 유래 세포를 포함한 다양한 체세포와 수정란을 공동배양할 경우 일반적으로 수정란의 체외발생을 촉진시키고 배반포의 부화율의 증진과 세포수의 증가가 이루어진다고 알려져 있으나 이들 세포와의 공동배양이 배발달에 어떻게 작용하는지는 분명하지 않다. 다만 체세포와의 공동배양이 배양액내에 존재하는 중금속이온 등과 같은 세포독성물질의 제거(Flood와 Shirley, 1991), 성장촉진 인자의 방출 (Simmen 등, 1993) 및 세포막 표면의 산화를 방지하는 glycine, glutathione 등과 같은 물질의 방출 (Rieger, 1992) 등과 같은 영향을 미치기 때문인 것으로 생각된다.

**Table 2. *In vitro* development of *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes in co-culture with porcine cumulus cells in five repeated experiments**

Exp. No.	No. of embryos examined	No. of embryos developed to (%)				
		2-cell	4-cell	8~16-cell	32-cell	Mor. or Blasto.
I	358	214(59.8)	199(55.6)	146(40.8)	101(28.2)	72(20.1)
II	360	216(60.0)	208(57.8)	154(42.8)	107(29.7)	69(19.2)
III	355	223(62.8)	209(58.9)	135(38.0)	89(25.1)	54(15.2)
IV	350	227(64.9)	220(62.9)	157(44.9)	100(28.2)	78(22.3)
V	360	209(58.1)	216(60.0)	166(46.1)	111(30.8)	91(25.3)
Total	1,783	1,089(61.1)	1,052(59.0)	758(42.5)	508(28.4)	364(20.4)

**Table 3. *In vitro* development of *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes in co-culture with mouse fetal fibroblast cells in five repeated experiments**

Exp. No.	No. of embryos examined	No. of embryos developed to (%)				
		2-cell	4-cell	8~16-cell	32-cell	Mor. or Blast.
I	130	92(70.8)	75(57.7)	56(43.1)	38(29.2)	27(20.8)
II	135	87(64.4)	80(59.3)	59(43.7)	40(29.6)	28(20.7)
III	130	88(67.7)	76(58.5)	58(44.6)	39(30.0)	31(23.8)
IV	140	93(66.4)	78(55.7)	58(41.4)	45(32.1)	27(19.3)
V	150	99(66.0)	88(58.7)	64(42.7)	45(30.0)	31(20.7)
Total	685	459(67.0)	397(58.0)	295(43.1)	207(30.2)	144(21.0)

#### IV. 적 요

본 연구는 체외생산된 돼지 수정란의 체외발생율을 제고하기 위하여 각종 배양액과 돼지난구세포 혹은 생쥐태아간세포와의 공동배양 효과를 조사하였다. m-KRB, BECM 및 TCM-HEPES 배양액을 공시하여 체외수정란을 배양한 결과 배반포기까지 발달하는 비율은 전처리구에서 0~1.0%로써 극히 저조하였다. 특히 대부분의 수정란은 4-세포기 단계에서 발달이 정지되었다.

한편, 단층세포가 유도된 돼지 난구세포나 생쥐 태아간세포와 함께 체외수정란을 공동배양한 결과 2-, 4-, 8~16-, 32-세포기, 상실배기 및 배반포로 발달하는 비율은 각각 61.1~67.0%, 59.0~58.0%, 42.5~43.1%, 28.4~30.2% 및 20.4~21.0%였다. 이러한 결과는 단순배양액에서 체외배양한 수정란의 발달 성적 보다 유의하게 높은 것이었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 1-세포기 수정란을 체외에서 배양할때 체세포와의 공동배양은 수정란의 체외발달을 촉진하는 것으로 생각된다.

#### V. 인용문헌

- Allen, R.L., and R.W. Wright. 1984. *In vitro* development of porcine embryos in co-culture with endometrial cell monolayer or culture supernatants. J. Anim. Sci., 59:1659-1661.
- Archibong, A.E., R.M. Petters, and B.H.

Johnson. 1989. Development of porcine embryos from one- and two-cell stages to blastocysts in culture medium supplemented with porcine oviductal fluid. Biol. Reprod., 41:1076-1083.

- Bavister, B.D. 1989. A consistently successful procedure for *in vitro* fertilization of the golden hamster eggs. Gamete Res., 23:139-158.
- Brackett, B.G., and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12:260-274.
- Camous, S., Y. Heyman, W. Meziou, and Y. Menezo. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. J. Reprod. Fert., 72:479-485.
- Chatot, C.L., R.J. Tasca, and C.A. Ziomek. 1990. Glutamine uptake and utilization by preimplantation mouse embryos in CZB medium. J. Reprod. Fert., 89:335-346.
- Chung, H.M., S.P. Park, J.H. Oh, H.T. Lee and K.S. Chung. 1992. The effect of rabbit peritoneal fluid on *in vitro* maturation of mammalian follicular oocytes. The Proceeding of the 12th International Congress on Animal Reproduction. in Hague, Netherlands. 1:318-320.
- Collas, P., R.T. DUBY, and J.M. Robl. 1991. *In vitro* development of rabbit pronuclear

- embryos in rabbit peritoneal fluid. *Biol. Reprod.*, 44:1100-1107.
9. Davis, D.L. and B.N. Day. 1978. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 46:1043-4053.
  10. Ellington, J.E., E.W. Carney, P.B. Farrell, M.E. Simkin, and R.H. Foote. 1990. Bovine 1~2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell co-culture systems. *Biol. Reprod.*, 43:97-104.
  11. Herrler, A., A. Lucas-Hahn, and H. Niemann. 1992. Effects of insulin-like growth factor-I on *in-vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 37:1213-1224.
  12. Flood, L.P., and B. Shirley. 1991. Reduction of embryotoxicity by protein in embryo culture media. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:226-231.
  13. Fukuda, Y., M. Ichikawa, K. Naito, and Y. Toyoda. 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.
  14. Fukui, Y., T. Sonoyama, H. Mochizuki, and H. Ono. 1990. Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on *in vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 34:579-591.
  15. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi, and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 83:753-758.
  16. Heyner, S., N. Shah, R.M. Smith, A.J. Watson, and G. A. Schultz. 1993. The role of growth factors in embryo production. *Theriogenology*, 39:151-161.
  17. Jarrell, V.L., B.N. Day, and R.S. Prather. 1991. The transition from maternal to zygotic control to development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, *Sus scrofa*: Quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. *Biol. Reprod.*, 44:62-68.
  18. Jin, D.I., R.M. Petters, B.H. Johnson, and R.M. Shuman. 1991. Survival of early pre-implantation porcine embryos after co-culture with cells producing an avian retrovirus. *Theriogenology*, 35: 521-526.
  19. Kane, M.T., E.W. Carney, and J.E. Ellington. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 38:297-313.
  20. Krisher, R.L., R.M. Petters, and B.H. Johnson. 1989a. Effect of oviductal condition on the development of one-cell porcine embryos in mouse or rat oviducts maintained in organ culture. *Theriogenology*, 32:885-892.
  21. Krisher, R.L., R.M. Petters, B.H. Johnson, B.D. Bavister, and A.E. Archibong. 1989b. Development of porcine embryos from one-cell stage to blastocyst in mouse oviducts maintained in organ culture. *J. Exp. Zool.*, 249:235-239.
  22. Menino, A.R. Jr., and R.W. Wright, Jr. 1982. Development of one-cell porcine embryos in two culture systems. *J. Anim. Sci.*, 54:583-588.
  23. Meyen, R.A., C.F. Rosenkrans, Jr., and D.L. Davis. 1989. Development of pig blastocysts *in vitro* is altered by serum, bovine serum albumin and amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 31:463-471.
  24. Newcomb, E., W.B. Christle, and L.E.A. Rowson. 1978. Birth of calves following *in vivo* fertilization of oocytes removed from follicles and matured *in vitro*. *Vet. Rec.*, 102:461-462.
  25. Park, S.B. 1989. Studies on fertilization *in vitro* in the pig. PH. D. Thesis. Kyoto Univer-

- sity. Japan.
26. Petters, R.M., B.H. Johnson, M.L. Reed., and A.E. Archibong. 1990. Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryos *in vitro*. J. Reprod. Fert., 89:269-275.
  27. Petters, R.M., and M.L. Reed. 1991. Addition of taurine or hypotaurine to culture medium improves development of one- and two-cell pig embryos *in vitro*. Theriogenology, 35:253.
  28. Pollard, J.W., J.M. Scodras, L. Plante, W. A. King, and K.J. Bettridge. 1991. Definition of the cleavage stage(s) at which oviductal epithelial cells enable bovine embryos to pass through the *in vitro* 8~16-cell clock. Theriogenology, 35:256.
  29. Prather, R.S., M.M. Sims, and N.L. First. 1991. Culture of porcine embryos from the one- and two-cell stage to the blastocyst stage in sheep oviducts. Theriogenology, 35:1147-1151.
  30. Reed, M.L., M.J. Illera, and R.M. Petters. 1992. *In vitro* culture of pig embryos. Theriogenology, 37:95-109.
  31. Saito, S., and H. Niemann. 1991. Effects of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres. Biol. Reprod., 44:927-936.
  32. Seshagiri, P.B., and B.D. Bavister. 1991. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: Evidence for the "Crebtree effect". Mol. Reprod. Dev., 30:105-111.
  33. Simmen, R.C.M., Y. Ko, and F.A. Simmen. 1993. Insulin-like growth factors and blastocyst development. Theriogenology, 39:163-175.
  34. Tsafiriri, A., N. Dekel, and S. Bar-Ami. 1982. The role of oocytes maturation inhibitor in follicular regulation. J. Reprod. Fert., 64: 541-551.
  35. Willis, P., A.B. Caudle, and R.A. Fayerer-Horsken. 1991. Equine oocyte *in vitro* maturation: Influences of sera, time, and hormones. Mol. Repr. Dev., 30:360-368.
  36. Wright, R.W. Jr., and K.R. Bondioli. 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. J. Anim. Sci., 53:702-729.
  37. Yoshida, M., Y. Ishizaki, and H. Kawagishi. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. J. Reprod. Fert., 86:1-8.