大韓獸醫學會誌(1993) 第33券 第1號
Korean J Vet Res (1993) 33(1) : 179~188

체외성숙 및 체외수정유래 소 수정란의 토끼난관내 배양에 관한 연구

정혜옥·황우석·조충호·이병천
서울대학교 수의과대학
(1993년 2월 22일 접수)

The culture of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes in rabbit oviduct

Hye-ok Chung, Woo-suk Hwang, Choong-ho Jo, Byeong-chun Lee
College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received Feb 22, 1993)

Abstract : The developmental capacity of bovine oocytes under three different culture systems was investigated in this experiment ; One was culture in TCM199 with bovine oviductal epithelial cells (BOEC) for *in vitro* culture, another was culture in TCM199 with BOEC for 2 days and then transfer of 4~8cell embryos to rabbit oviduct(RO) and the other was transfer of 1 or 2cell embryos to RO for *in vivo* culture. And the other concern of this experiment was to investigate the effect of culture period and transfer site on recovery.

Immature bovine oocytes were cultured in TCM199 with granulosa cells for 22-24hrs and then fertilized *in vitro* using frozen-thawed semen treated with BO-caffine and BO-BSA. Fifteen to 18hrs after *in vitro* fertilization oocytes were cultured in TCM199 with BOEC or transferred to RO for 5 days.

The rate of development to the morula or blastocyst was higher in transfer of 1 or 2cell embryos to RO (23.1%) than culture in TCM199 with BOEC(11.7%). But, there was no difference between transfer of 1 or 2cell embryos and transfer of 4~8cell embryos to RO(12.8%). Recovery under different culture periods in RO was significantly higher in 90~95hrs(70.1%) than 122~125hrs(50.9%, $p<0.05$) and recovery significantly increased when oocytes were transferred deeper in RO(2.5cm>, 47.7% ; 2.5~4.5cm, 63.9% ; 4.5cm<, 77.3%, $p<0.05$).

The results show that transfer of 1 or 2cell embryos to RO is an effective means of supporting the further development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes than culture in TCM199 with BOEC or transfer of 4~8cell embryos to RO, and recovery from RO increases when oocytes are transferred deeper and incubated shorter in RO.

Key words : bovine oocytes, bovine oviductal epithelial cells(BOEC), rabbit oviduct(RO), recovery.

서 론

소 난포란의 체외수정을 통한 산자생산이 Brackett et al[1]에 의해 처음으로 보고된 이후 체외성숙, 체외수정 및 체외배양에 관한 연구가 여러 학자에 의해 수행되어 왔다. 또한 체외배양기법에 의한 소 수정란의 대량생산은 수정란이식의 산업적 이용을 가속화하였으며 착상

전 발육에 관한 기초연구에 많은 공헌을 하게 되었다. 그러나 수정란의 체외배양시 8~16세포기에서 발육이 정지되는 *in vitro* block현상[2,3]과 체내발육란에 비하여 세포수가 감소[4,5]되는 등의 문제점이 보고되고 있다. 이를 극복하기 위하여 토끼, 면양 및 소의 난관에서 소 수정란을 일시적으로 체내배양하거나[6~9], 다른 체세포와의 co-culture에 의해[10~12] 후기배로의 발육률을 높이는 방법 등이 연구되어 왔다.

이중에서도 異種난관내 배양법은 種특이성에 관계없이 배발달을 자극하며 체외조작에 의한 기계적 손상을 줄여 생존성이 강한 후기배를 얻을 수 있는 유용성을 제공할 뿐만 아니라[3,13,14] 정상적인 세포수를 나타내어 수란동물에 재이식시 정상적인 착상으로 유도될 수 있다고 보고되었다.[15,16] 특히 토끼난관은 대리모로서의 경제성과 함께 수정란 수송시 단기보존 및 배양장소[17,18], 정자의 수정능획득 및 난자와의 수정장소로 이용가능하며[19~22], 소 수정란의 일시적인 배양장소로 이용된 후 수란우로의 재이식에 의한 산자생산[23,24]이 보고되는 등 그 유용성이 입증된 바 있다. 그러나 체내배양에 수반되는 10~40%의 난 손실률은 체내배양시의 그러한 장점을 반감시킨다. 이에 대해 Lawson et al[17]과 Moore et al[25]은 난관내 배양기간이 길수록 회수율은 떨어지며 정상발육률도 감소한다고 하였으나 Boland[13]는 배양기간의 증가에 따른 회수율에는 차이가 없으며 이식부위가 얕을수록 회수율이 낮다고 보고하였다. 한편 Sirard et al[26]은 배양기간이 길수록 회수율은 감소하나 후기배로의 발육률은 증가한다고 하는 등 학자들에 따라 상이하게 보고되어지고 있다. 토끼난관내 이식시의 수정란의 발육단계에 대하여서도 4~8세포기까지의 체외배양 후 상태가 양호한 수정란을 선별하여 이식시 후기배로의 높은 발육률을 보임이 여러 연구자에 의해 보고되었으나[15,27~30] 생존성이 강한 후기배를 얻기 위해서는 초기배시의 배양상태가 중요하다는 이유로 1, 2세포기이식이 권장되어지기도 한다.[13,26] 또한 체외노출에 대해 민감성을 나타내는 시기는 種에 따라 다르며[21,32], 이에 대해 Eyestone과 First[9]는 소의 경우 4세포기수정란이 체외노출에 가장 민감하므로 난관내 체내배양시 1, 2세포기에 이식함으로써 높은 발육률을 얻을 수 있다고 하였으나 Lawson et al[17]은 이식시의 발육단계는 후기배로의 발육률에 영향을 미치지 않았다고 하였다.

이상에서 살펴본 바와 같이 소 수정란의 토끼난관내 배양의 유용성은 다수 보고되었으나 체내이식에 적합한 수정란의 발육단계와 이식방법에 대하여는 보고자에 따라 상이한 결과를 제시하고 있다.

이에 저자는 소 수정란의 난관상피와의 체외배양과 발육단계별이식에 의한 토끼난관내 체내배양시 후기배로의 발육률을 비교하고 체내배양시 높은 회수율을 얻을 수 있는 체내배양기간과 이식부위를 조사하기 위해 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

난포란의 채취 : 도살된 홀스타인종과 한우암소에서 난소를 채취한 후 100 IU/mℓ의 penicillin과 100 μg/mℓ의 streptomycin이 첨가된 30~35℃의 생리식염수에 보존하여 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난소표면을 38℃의 생리식염수로 세정한 후 18 gauge침이 부착된 주사기로 5% fetal calf serum(Flow laboratories Inc. Australia, 이하 FCS로 약함)이 첨가된 38℃의 tissue culture medium 199(Gibco, USA, 이하 TCM199으로 약함)을 2mℓ정도 흡입한 다음 직경 1~7mm의 小난포로부터 난자를 채취하였다.

회수된 난포란은 Wiemer et al[33]의 기준에 준하여 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균질한 정상난자를 선별하여 실험에 제공하였다.

체외성숙 : 육안적으로 정상이라고 인정되는 직경 10~15mm의 성숙난포로부터 채취된 과립막세포는 5% FCS첨가 TCM199으로 2회 원심(500g, 5분)한 다음 10% FCS 첨가 TCM199이 분주되어 있는 4-well dish(Nunc, USA)에 5.0×10^6개/mℓ의 농도로 첨가하여 前배양을 실시하였다(Fig 1). 선별된 난자는 5% FCS가 첨가된 TCM199으로 2회 세정한 다음 10% FCS첨가 TCM199으로 1회 세정후 과립막세포가 첨가된 4-well dish당 8~10개의 비율로 첨가하여 39℃, 5% CO_2, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO_2배양기내에서 22~24시간동안 성숙배양하였다.

체외수정 : 정액은 0.5mℓ straw당 5×10^7개의 정자가 들어있는 한우의 동결정액을 사용하였으며 기본배양액으로는 Brackett & Oliphant medium[34](1975, 이하 BO로 약함)을 사용하였다.

동결정액은 38℃ 수조내에서 30초간 융해시킨 다음 10mM caffeine(Fulka Chemika, Switzerland)이 첨가된 BO-caffeine액을 넣고 2회 원심분리(500g, 2분)하여 동결보호제 및 희석액을 제거하였다. 그후 10mg/mℓ의 bovine serum albumin(Sigma, USA, 이하 BSA로 약함)및 20mM의 heparin(Gibco, USA)이 첨가된 BO-BSA액과 BO-caffeine액을 각각 동량첨가하여 1×10^7개/mℓ의 최종 정자농도가 되도록 재부유시킨 후 80~100 μℓ 의 미소적을 작성하였다. 미소적은 light white oil(Mineral oil, Sigma, USA)로 도포하여 체외수정에 제공하였다. 성숙난자는 팽대된 난구세포층을 가볍게 벗긴 후 각 미

소적당 8~10개정도씩 첨가하여 15~18시간동안 CO_2배양기내에서 체외수정을 실시하였다.

난관상피세포와의 체외배양 : 출혈체를 보이거나 2g 미만의 황체조직을 나타내는 초기황체기의 난관에서 관류법에 의해 채취된 난관상피세포는 5% FCS첨가 TCM199으로 2회 원심분리(500g, 5분)하였다. 그후 10% FCS가 첨가된 TCM199이 분주되어 있는 4-well dish에 첨가하여 CO_2배양기내에서 co-culture에 제공하기 前 2일간 배양하였다(Fig 2). 수정 15~18시간후의 소 수정란은 3회 세정한 다음 난구세포가 부착된 채로 배양중인 난관상피세포와 co-culture를 실시하였다. 체외배양군은 수정으로부터 140시간 후 후기배로의 발육률을 조사하였으며(Figs 4, 5, 6), 4~8세포기이식군은 난관상피와 약 2일간 co-culture하여 4~8세포기까지 배양한 후 상태가 양호한 수정란을 선별하여 토끼난관내 이식을 실시하였다.

토끼난관에서의 체내배양 : 건강한 성숙 암토끼(New Zealand White종, 2~2.5kg)에 이식 12~15시간전 100 IU의 hCG(대성 미생물연구소, 한국)를 이정맥으로 주사하여 위임신을 유발하였다. Propionyl promazine (Combelen®, 한국바이엘화학(주))과 ketamin(Ketalar®, 유한양행(주))으로 마취후 복정중선을 절개하여 난관을 노출시킨 다음 자궁난관접합부에서 난소쪽으로 1cm되는 부위를 결찰하였다. Micropipette에 curved T-om-cat catheter (Monoject®, USA)를 부착하여 5㎕의 TCM199과 함께 5~10개의 체외수정유래 소 수정란을 유입되는 공기가 최소한으로 되게하여 난관채를 통하여 이식하였다(Fig 3). 수정으로부터 140시간 후 토끼는 살처분하여 난관을 절제하였다. 결찰부위의 봉합사를 조심스럽게 제거하고 5% FCS가 첨가된 TCM199으로 관류하였다. 회수된 수정란중에서 토끼의 미수정란을 분리한 다음 소 수정란의 회수율 및 발육단계를 검사하였다. 이때 상실배는 1~2일간 더 체외배양하여 후기배반포로의 발달여부를 검사하였다(Figs 7, 8, 9, 10).

통계처리 : 실험결과치는 Logistic Regression Analysis를 적용하여 GLIM통계 팩키지 프로그램으로 그 유의성을 검정하였다.

결 과

체외성숙 및 체외수정유래 소 수정란의 난관상피와의 체외배양과 발육단계별 이식에 의한 토끼난관내 체내배양시 후기배로의 발육률을 비교하고 체내배양시 높은 회수율을 얻을 수 있는 체내배양기간과 이식부위를 조사한 결과는 다음과 같다.

체외성숙 및 체외수정유래 소 수정란의 체외배양과 체내배양시 후기배로의 발육률 비교 : 소 초기배로의 난관상피와의 체외배양과 발육단계별 이식에 의한 토끼난관내 체내배양시 후기배로의 발육률을 조사한 결과, 체외배양군에서는 11.7%를, 토끼난관으로의 1, 2세포기 이식군과 4~8세포기이식군은 각각 23.1%와 12.8%를 나타내어 1, 2세포기체내이식군이 체외배양군에 비해 높은 발육률을 나타냈으며($p<0.1$), 체외배양군의 수정란이 1, 2세포기이식군에 비해 확장배반포까지 발육하는데 있어 1~2일간의 시간이 더 경과되었다. 발육단계별 이식시의 후기배로의 발육률은 1, 2세포기이식군이 4~8세포기이식군에 비해 높았으나 유의성은 인정되지 않았으며(Table 1), 체내배양 후 회수된 배반포의 hatching은 토끼난관내 배양시 투명대주위에 형성되는 mucin coat에 의해 억제되었다(Fig 10).

체외성숙 및 체외수정유래 및 소 수정란의 토끼난관내 배양기간과 이식부위에 따른 회수율 : 소 수정란의 토끼난관내 배양기간에 따른 회수율을 조사한 결과 90~95시간과 122~125시간의 체내배양군에서 각각 70.1%와 50.9%를 나타내어 90~95시간군에서 높은 회수율이 인정되었다($p<0.05$). 이식부위에 따른 회수율의 경우도 <2.5cm, 2.5~4.5cm 및 4.5cm<의 각군이 47.

Table 1. *In vitro* and *in Vivo* developmental capacity of *in Vitro* matured and fertilized bovine oocytes

Treatment*	No. of oocytes		No of oocytes developed to				Percentage of
	cultured	cleaved	2~8 cell	9~16 cell	Mo**	Bl**	Mo+Bl/cleaved
Culture in TCM 199 with BOEC	125	94	49	34	7	4	11.7[a]
Transfer of 1 or 2cell to RO	58***	52	17	23	7	5	23.1[b]
Transfer of 4~8cell to RO	47***	47	18	23	5	1	12.8[ab]

* BOEC : Bovine oviductal epithelial cells, RO : Rabbit oviduct.

** Mo : Morula, Bl : Blastocyst.

*** No. of oocytes recovered after transient culture in rabbit oviduct.

a vs b : Different superscripts in the same column are different($p<0.1$).

Table 2. Recovery of bovine oocytes from rabbit oviduct influenced by culture period and transfer site

Transfer site (cm into oviduct)	Culture Period: 90~95hrs* No. (%) of oocytes recovered/ transferred	Culture Period: 122~125hrs** No. (%) of oocytes recovered/ transferred	Total
<2.5cm	21/31(67.7)	21/57(36.8)	42/88(47.7)[a]
2.5~4.5cm	20/30(66.7)	26/42(61.9)	46/72(63.9)[b]
4.5cm<	6/6(100.0)	11/15(73.3)	17/21(77.3)[c]
Total	47/67(70.1)[A]	58/114(50.9)[B]	

* 90~95hrs : Transfer of 4~8cell embryos to rabbit oviduct

** 122~125hrs : Transfer of 1 or 2cell embryos to rabbit oviduct.
Six undeveloped 1-cell bovine embryos were included.

A vs B : Significantly different($p<0.05$).

a, b, c : Significantly different($p<0.05$), a vs b($p<0.05$), b vs c($p<0.1$), a vs c($p<0.01$)

7%, 63.9% 및 77.3%로 나타나 이식부위가 깊어질수록 높은 회수율이 관찰되었으며($p<0.05$), 본 실험에서는 Tom-cat catheter의 끝을 약 120° 정도로 굽히어 사용함으로써 5.5cm 깊이까지의 이식도 무난하게 이루어졌다(Fig 3). 배양기간과 이식부위의 회수율에 대한 교호작용은 없는 것으로 나타났다(Table 2).

고 찰

체외성숙 및 체외수정유래 소 수정란의 난관상피와의 체외배양과 발육단계별 이식에 의한 토끼난관내 체내배양시 후기배로의 발육률을 조사한 결과 1, 2세포기체내이식군(23.1%)이 체외배양군(11.7%)보다 높은 발육률을 나타내었다($p<0.1$). 이와같은 결과는 면양난관내 배양군에서 16.3%, 토끼난관내 배양군에서 22.5% 및 난관상피와의 체외배양군에서 12.2%의 후기배로의 발육률을 보인 Fukui et al[35]의 보고와 면양난관내 8세포기 이식군에서 5%의 후기배로의 발육률을 보고한 Eyestone과 First[9], 체외배양군에서 10.5%의 후기배로의 발육률을 보인 Fukuda et al[36]의 성적과 유사하거나 높은 성적이었으나 4세포기체내이식군에서 51.9%의 배반포로의 발육률을 보인 Kuwayama et al[29]과 난관상피와의 체외배양만으로도 54.8%의 후기배로의 발육률을 보인 Xu et al[15]의 결과에 비해서는 낮은 수준이었다. 수정란의 발육단계별 난관내 이식에 의한 체내배양시 후기배로의 발육률에 있어서는 실험과정의 차이로 직접적인 비교는 할 수 없었지만 Utsumi et al[37]은 3, 4세포기와 6~8세포기 소 수정란을 토끼난관내로 이식하여 각각 5%와 18%의 후기배로의 발육률을 보고하여 발육단계가 진행된 수정란을 이식시 후기배로의 높은 발육률을 보고하였고, Sirard et al[26]는 1세포기와 2~8세포기 소 수정란을 토끼난관내로 이식하여 각각 29%와 19%의 후기배로의 발육률로 초기발육단계의 수정란을 이식시 발육률이 높았다고 하였다. 본 실험에서는 유의적인 차이는 없었지만 1, 2세포기 이식군이 1~2cycle 더 분화해야하는 불리한 조건에도 불구하고 4~8세포기이식군에 비해 높은 후기배로의 발육률을 나타냈으며 이는 Sirard[26]의 보고와 유사한 경향이었다. 4~8세포기이식군과 체외배양군의 저조한 발육률은 초기배시의 불완전한 체외배양에 기인한 듯 하다. 이러한 결과로 보아 후기배로의 발육은 초기배시의 배양상태에 많은 영향을 받는 듯 하며, 토끼난관은 초기배를 배반포까지 발육시키는데 적합한 환경을 제공하는 것으로 사료된다.

토끼난관내 배양기간에 따른 회수율은 90~95시간군(70.1%)이 122~125시간군(50.4%)에 비해 유의성 있게 높은 회수율을 나타내었다($p<0.05$). 이와같은 결과는 99시간이하와 99시간이상 배양군에서 77%와 50%의 회수율을 보인 Sirard와 Lambert[23], 5일간의 토끼난관배양시 65%를 나타낸 Ellington et al[30], 64.2%의 회수율을 나타낸 Iwasaki와 Nakahara[15]의 성적과 비슷하였다. 그러나 5일간의 면양난관내 배양시 35.8%의 회수율을 보고한 Fukui et al[35]의 결과보다는 높은 수준이었으며 2~5일간의 배양기간별 회수율에 있어 통계적 유의성을 볼 수 없었다는 Eyestone과 First[9]의 보고와는 상이한 결과를 나타내었으나 대체적으로 4일이상의 異種난관내 배양시 회수율은 유의성있게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 122~125시간 배양군에 공여된 소 수정란중에는 1세포기시의 이식에 따른 미수정란의 함유가능성이 존재함에도 불구하고 회수란중 단지 일부(6개)만이 미분화상태를 나타내었다. 이에 대해 Hartmann[38]은 모체생식기관으로 보내지는 수정란의 생리적신호(physiological signal)에 의해 난관내에서의 미수정란과 수정란은 다른 이동양상을 보인다고 하였으며 Sirard와 Lambert[26]는 signal에 의해 난관은 미수정란보다 수정란을 더욱 효과적으로 보호하게 된다고 하였으나 signal에

대하여는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았으며, 수정란의 signal과 난관내에서의 이동양상의 관계에 대한 연구가 더 수행되어야 할 것으로 요망된다. 한편 이식부위에 따른 회수율을 비교한 보문 역시 쉽게 접할 수 없어서 타 연구자의 성적과 직접적인 비교는 어려웠으나 본 실험에서 <2.5cm, 2.5~4.5cm 및 4.5cm<의 각군이 47.7%, 63.9% 및 77.3%를 나타내어 이식부위가 깊어짐에 따라 유의성있게 높은 회수율을 나타내었다($p<0.05$). 이러한 결과에 대해 Bourdage와 Halbert[39] 및 Eyestone[40]는 이식깊이가 깊어짐에 따른 복강으로의 난관액유출 가능성의 감소에 기인하는 듯 하다고 하였으며 그러한 주장외에는 아직 평가할 수 있는 타 학설이 없는 실정이다. 또한 좁고 굴곡되어 있는 난관의 형태상 난관채를 통한 수정란이식에는 많은 어려움이 있으며 그로 인해 이식깊이는 2~4cm정도로 제한된다고 보고되었으나[27,30], 본 실험에서는 Tom-cat catheter의 끝을 약 120°정도로 굽히어 사용함으로써 5.5cm깊이까지의 이식도 무난하게 이루어졌다(Fig 3). 난관내의 이식부위에 따라 수정란의 회수율에는 차이가 있으므로 깊이 이식하는 방법이 개발된다면 초기발육단계 수정란의 장기간 체내배양에 따른 난손실을 어느 정도 극복할 수 있을 것으로 사료된다.

한편 체내배양 후 회수된 배반포에 있어 투명대의 단열은 볼 수 있었으나 완전한 탈출은 토끼난관내 배양시 투명대주위에 형성되는 mucin coat에 의해 억제되었으며(Fig 10), 이는 Lawson et al[17]의 보고와 일치되는 사실이었다. 이에 대해 Hafez[41]는 확장 배반포의 hatching 과정이 수정란의 기계적 팽창력에 의한 단독작용이 아닌 세포내의 내세포괴와 자궁내에서 분비되는 융해인자(lytic factor)와의 협동작용이라고 하였으며, Sirard와 Lambert[23]는 토끼난관내 배양후 회수된 수정란의 수란우로의 재이식에 의한 정상산자의 생산을 보고한 바 mucin이 배반포형성 및 착상과는 관련이 없는 듯 하다.[14] 또한 수정란의 발육속도에 대하여 Carney와 Foote[16]는 수정란을 체외배양시 체내배양군에 비해 발육이 지연된다고 하였으며, Xu et al[5]은 초기 발육단계의 수정란을 체외배양시 불완전한 배양조건으로 인해 세포수가 감소되고 후기배로의 발육도 지연된다고 하였다. 본 실험에서도 체외배양군의 수정란이 1, 2세포기 이식군에 비해 확장배반포까지 발육하는데 있어 1~2일간의 시간이 더 경과되었는데, 이는 Carney와 Foote[16], Xu et al[5]의 보고와 일치되는 결과로서 체외배양조건이 수정란의 발육에 불리한 영향을 미친 것으로 생각된다.

이러한 결과로 보아 현재까지의 체외배양체계로는 체내배양에 비해 후기배로의 발육에 있어 만족스럽지 못하며 소 수정란의 토끼난관내 이식에 의한 체내배양시에는 4~8세포기시의 이식보다는 1, 2세포기시의 이식에 의한 배양이 좋은 방법이라 사료된다. 또한 체내배양시 회수율을 높일 수 있는 방법이 연구되어야 하며 체외배양시 수정란의 발육지연, 세포수감소 등의 문제점을 극복하기 위해 체외배양체계에 대한 심도있는 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

체외성숙 및 체외수정유래 소 수정란의 난관상피와의 체외배양과 발육단계별 이식에 의한 토끼난관내 체내배양시 후기배로의 발육률을 비교하고 체내배양시 높은 회수율을 얻을 수 있는 체내배양기간과 이식부위를 조사하기 위해 실행한 실험결과는 다음과 같았다.

1. 토끼난관내로의 1, 2세포기이식군은 난관상피와의 체외배양군보다 높은 후기배로의 발육률을 나타내었다($p<0.1$).

2. 발육단계별 이식시 후기배로의 발육률은 1, 2세포기이식군이 4~8세포기 이식군에 비해 높았으나 유의성은 인정되지 않았다.

3. 토끼난관내 배양기간에 따른 회수율은 90~95시간군이 122~125시간군에 비해 높게 나타났다($p<0.05$).

4. 이식부위에 따른 회수율은 이식부위가 깊을수록 높은 회수율을 나타내었다($p<0.05$).

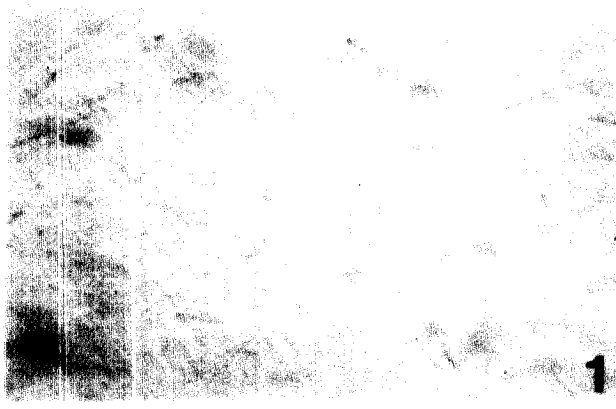
이상의 결과로 보아 체외성숙 및 체외수정유래 소 수정란을 1, 2세포기에 토끼난관내로 이식하는 것이 난관상피와의 체외배양이나 4~8세포기에 이식하는 것보다 후기배로의 높은 발육률을 얻을 수 있을 것으로 생각되며 난관내 배양기간은 짧을수록 이식부위는 깊을수록 회수율은 더욱 향상되는 것으로 사료된다.

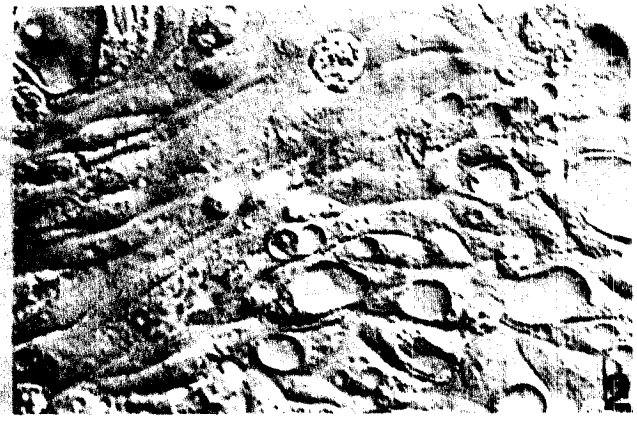
Legends for figures

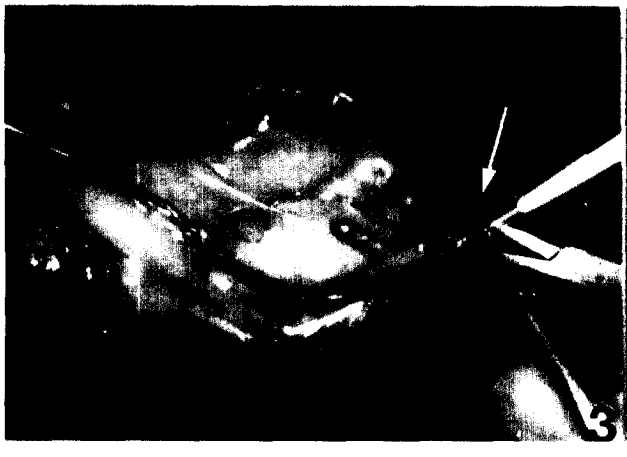
Fig 1. Monolayer of bovine granulosa cells(2 days in culture).
Fig 2. Monolayer of bovine oviductal epithelial cells(BOEC ; 4 days in culture).
Fig 3. Curved Tom-cat catheter was injected inside(5.5cm) via the ampulla(arrow) of ligated rabbit oviduct(RO).
Fig 4. An early blastocyst developed in TCM199 with BOEC(180hrs after *in vitro* fertilization). ×100.
Fig 5. A blastocyst developed in TCM199 with BOEC. Note the blastocele(arrow ; 197hrs after *in vitro* fertilization). ×250.
Fig 6. An expanded blastocyst developed in TCM199 with BOEC(212hrs after *in vitro* fertilization). ×250.
Fig 7. A 16-cell embryo developed in RO after transfer of 4～8cell embryos. Note the typical mucin layer(m ; 110hrs after *in vitro* fertilization). ×100.
Fig 8. A compacted morula developed in RO after transfer of 4～8cell embryos. Isolated cell is seen(arrow ; 141hrs after *in vitro* fertilization). ×400.
Fig 9. A blastocyst developed in RO after transfer of 1 or 2cell embryos. Note the presence of inner-cell-mass (ICM) and trophoblast(T ; 176hrs after *in vitro* fertilization.) ×250.
Fig 10. A hatching blastocyst developed in RO after transfer of 1 or 2cell embryos. Note the rupture of zona pellucida(arrow ; 189hrs after *in vitro* fertilization). ×400.

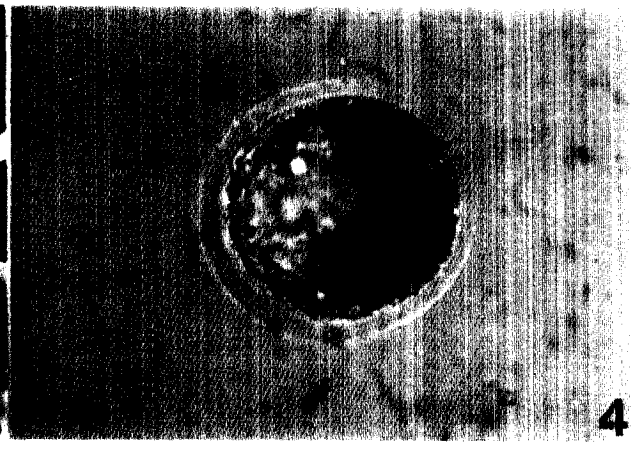
참 고 문 헌

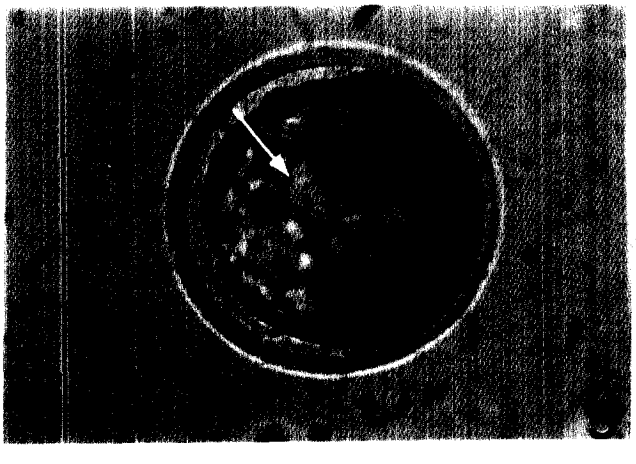
1. Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod* 1982 ; 27 : 147～158.
2. Eyestone WH, Vignieri J, First NL. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. *Theriogenology* 1987 ; 27 : 228(abstr.).
3. Bavister BD. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology* 1988 ; 29 : 143～154.
4. Iwasaki S, Yoshiba N, Ushijima H, et al. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J Reprod Fert* 1990 ; 90 : 279～284.
5. Xu KP, Yadav BR, Rorie RW, et al. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. *J Reprod Fert* 1992 ; 94 : 33～43.
6. Trounson AO, Willadsen SM, Rowson LEA. Fertilization and development capability of bovine follicular oocytes matured *in vitro* and *in vivo* and transferred to the oviducts of rabbits and cows. *J Reprod Fert* 1977 ; 1 : 321～327.
7. Eyestone WH, Norchey DL, Leibfried-Rutledge M-L, et al. Culture of 1-cell bovine embryos in the sheep oviduct. *Biol Reprod Suppl* 1985 ; 32 : 100(abstr.)
8. Xu KP, Greve T, Callesen H, et al. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J Reprod Fert* 1987 ; 81 : 501～504.
9. Eyestone WH, First NL. Characterization of developmental arrest in early bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology* 1991 ; 35 : 613～624.
10. Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, et al. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *J Reprod Fert* 1988 ; 83 : 753～758.
11. Rexoroad JrCE. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology* 1989 ; 31 : 105～114.
12. Kajihara Y, Kometani N, Kobayashi S, et al. Pregnancy by bovine blastocysts developed in co-culture with cumulus/uterine endometrial cells after *in vitro* fertilization. *Jpn J Anim Reprod* 1991 ; 37 : 177～184.
13. Boland MP. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 1984 ; 21 : 126～137.
14. Gandolfi F, Brevini TAL, Moor RM. Effect of oviduct environment on embryonic development. *J Reprod Fert Suppl* 1989 ; 38 : 107～115.
15. Iwasaki S, Nakahara T. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized *in vitro* followed by culture *in vitro* or *in vivo* in rabbit oviducts. *Theriogenology* 1990 ; 33 : 669～675.
16. Carney EW, Foote RH. Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer

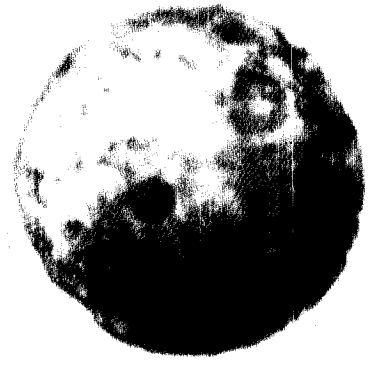


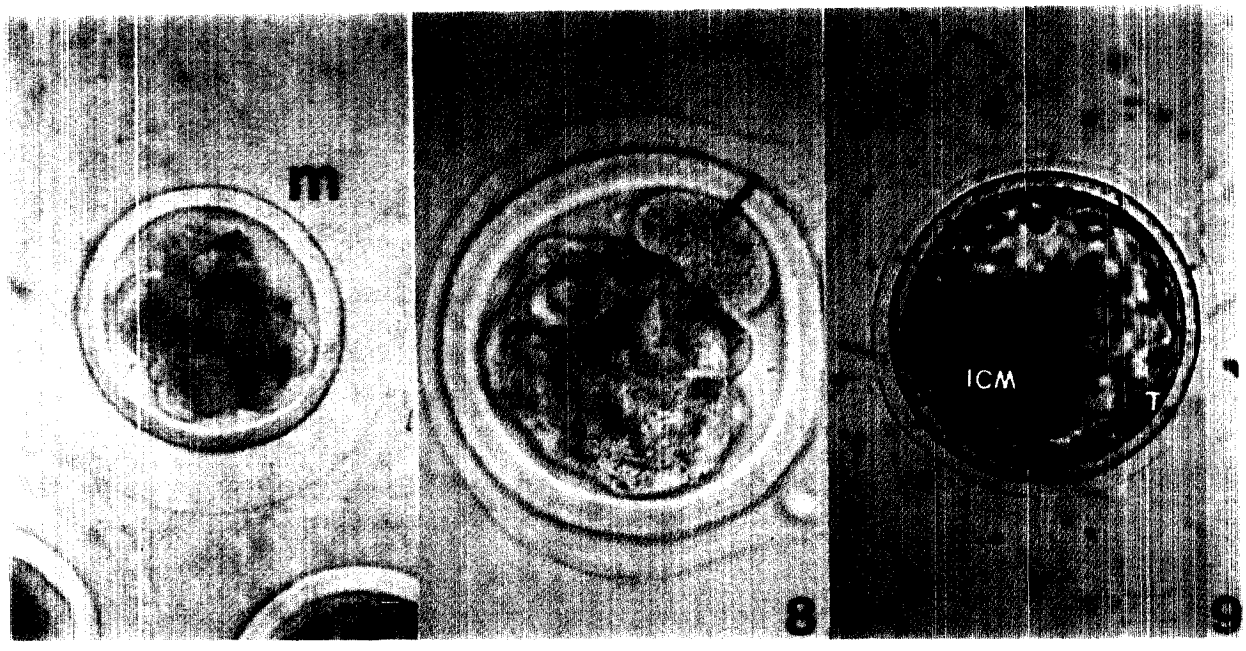


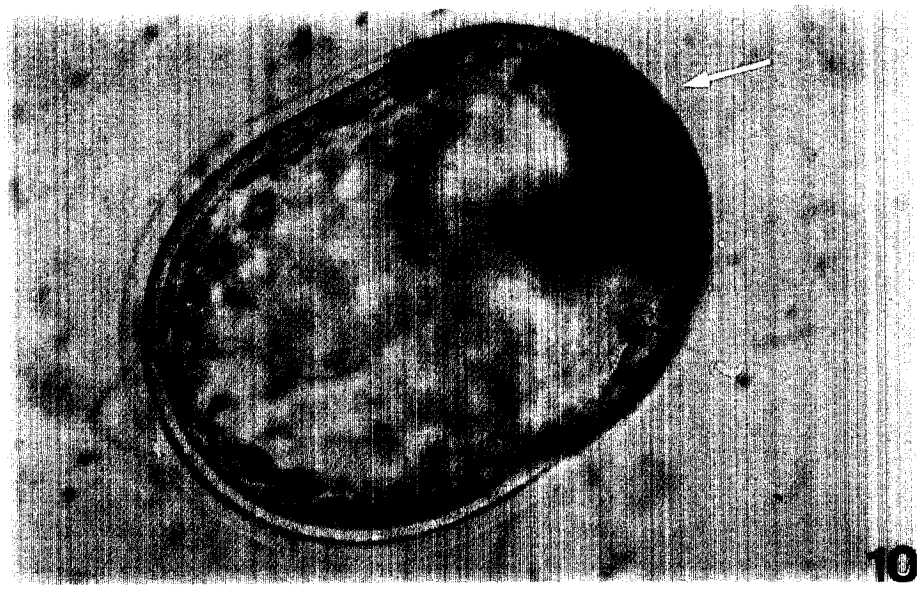









m
8
ICM
T
9


10

on development of rabbit embryos *in vivo* and *in vitro*. *J Reprod Fert* 1990 ; 89 : 543～551.

17. Lawson RAS, Adams CE, Rowson LEA. The development of sheep eggs in the rabbit oviduct and their viability after re-transfer to ewes. *J Reprod Fert* 1972 ; 29 : 105～116.
18. Allen WR, Stewart F, Trounson AO, et al. Viability of horse embryos after storage and long-distance transport in the rabbit. *J Reprod Fert* 1976 ; 47 : 387～390.
19. 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.
20. Hirst PJ, DeMayo FJ, Dukelow WR. Xenogenous fertilization of laboratory and domestic animals in the oviduct of the pseudopregnant rabbit. *Theriogenology* 1981 ; 15 : 67～75.
21. Rao VH, Sarmah BC, Bhattacharyya NK. Xenogenous fertilization of goat ova in the rabbit oviduct. *J Reprod Fert* 1984 ; 71 : 377～379.
22. Aoyagi Y, Fuzii K, Iwazumi Y, et al. Cleavage resulting from intra-rabbit oviduct transfer of bovine gametes. *Jpn J Anim Reprod* 1987 ; 33 : 209～211.
23. Sirard MA, Lambert RD. Birth of calves after *in vitro* fertilisation using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet Rec* 1986 ; 23 : 167～169.
24. Lu KH, Gordon I, Gallagher M, et al. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilisation of oocytes matured *in vitro*. *Vet Rec* 1987 ; 121 : 259～260.
25. Moore NW, Miller BG, Trappl MN. Transport and development of embryos transferred to the oviducts and uteri of entire and ovariectomized ewes. *J Reprod Fert* 1983 ; 68 : 129～135.
26. Sirard MA, Lambert RD, Menard DP, et al. Pregnancies after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus. *J Reprod Fert* 1985 ; 75 : 551～556.
27. Shioya Y, Kuwayama M, Ueda S, et al. Effect of the time between slaughter and aspiration of follicles on the developmental capability of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Jpn J Anim Reprod* 1988 ; 34 : 39～44.
28. Ueda S, Kuwayama M, Shioya Y, et al. Culture of *in vitro* fertilized bovine embryos in a chemically defined medium(BO-medium). *Jpn J Anim Reprod* 1988 ; 34 : 56～60.
29. Kuwayama M, Shioya Y, Iwasaki S, et al. Effects of culture medium and time of transfer to the rabbit oviduct on the developmental capacity of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Jpn J Anim Reprod* 1989 ; 35 : 1～6.
30. Ellington JE, Farrell PB, Simkin ME, et al. Bovine zygote development in oviduct cell coculture versus rabbit oviducts. *Theriogenology* 1990 ; 33 : 224(abstr.).
31. Fischer B, Schumacher A, Hegele-Hartung C, et al. Potential risk of light and room temperature exposure to preimplantation embryos. *Fertil Steril* 1988 ; 50 : 938～944.
32. Bedford JM, Dobrenis A. Light exposure of oocytes and pregnancy rates after their transfer in the rabbit. *J Reprod Fert* 1989 ; 85 : 477～481.
33. Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, et al. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol Reprod* 1991 ; 30 : 330～338.
34. Brackett BG. Oliphant G, Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod* 1975 ; 12 : 260～274.
35. Fukui Y, Urakawa M, Sasaki C, et al. Development to the late morula or blastocyst stage following *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Anim Reprod Sci* 1989 ; 18 : 139～148.
36. Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, et al. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol Reprod* 1990 ; 42 : 114～119
37. Utsumi K, Kato H, Iritani A. Full-term development of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 1991 ; 35 : 695～703.
38. Hartmann JF. Transport of gametes in the reproductive tract of the female mammal. In : Overstreet JW. (eds) Mechanism and animal fertilization. *Academic Press* 1983 ; pp 499～543.
39. Bourdage RJ, Halbert SA. Quantification of intraluminal motion of surrogate ova in the rabbit oviductal isthmus. *Biol Reprod* 1984 ; 30 : 1124～1129.
40. Eyestone WH, Leibfried-Rutledge ML, Notchey DL, et al. Culture of one- and two-cell bovine emb-

ryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology* 1987 ; 28 : 1~7.
41. Hafez ESE. Fertilization, Cleavage and Implantation. In : Bazer FW, Geisert RD, Zavy MT.(eds) Reproduction in farm animals. *Lea & Febiger Press* 1987 ; pp 210~228.