

## 체외수정란 이식시 수태율에 미치는 요인에 관한 연구

김성기 · 노상호 · 이은송\* · 이병천 · 황우석

서울대학교 수의과대학  
日本帶廣畜産大學 肉畜増殖學研究室\*  
(1996년 5월 1일 접수)

### Factors affecting pregnancy rates following transfer of bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*

Sung-ki Kim, Sang-ho Roh, Eun-song Lee, Byeong-chun Lee, Woo-suk Hwang

College of Veterinary Medicine, Seoul National University  
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro 080 Japan

(Received May 1, 1996)

**Abstract** : In the last few years, methods for *in vitro* culture of early embryo stages from oocytes matured and fertilized *in vitro* using suitable cell culture systems have been established. But the factors affecting pregnancy rates following transfer of bovine embryos produced *in vitro* were not evaluated enough. So this study was performed to investigate the effects of quality and stage of embryos, parity and Corpus Luteum quality of recipients on pregnancy rates following non-surgical transfer of bovine embryos produced *in vitro*.

Oocytes aspirated from small antral follicles of ovaries obtained at a local slaughter house were matured, fertilized with frozen-thawed semen and co-cultured for 6-7 days by utilizing co-culture system with bovine oviduct epithelial cell *in vitro*. After co-culture, embryos were transferred to recipients on day 7 (estrus=day 0). Recipients were monitored by ultrasonic scanning method or observation for estrus and rectal palpation after 50 days from transfer.

The results of this study are follows.

1. Of the 70 recipients, 70%(49 of 70) had not showed estrus sign between day 0 and day 50, but 22.9%(16 of 70) was diagnosed not pregnant. Therefore the overall pregnancy rate of this study was 47.1%(33 of 70).
2. The pregnancy rate of recipients transferred with excellent(66.7%) and good(54.5%) embryos were higher than that of recipients transferred with fair embryos(15.8%) ( $p < 0.05$ ).
3. The pregnancy rate of recipients transferred with morula, compacted morula, blastocyst and expanded blastocysts were 46.2, 55.0, 62.5 and 50.0%, respectively.
4. The pregnancy rates of recipients transferred to heifer and cow were 54.5 and 55.2%,

respectively.

5. The pregnancy rates of recipients with CL score I, II(66.7, 63.6%) were higher than those of recipients with CL score III (10%), ( $p < 0.05$ ).

Success of transfer of embryos produced *in vitro* depends on many variables. The important factors identified in this study were the quality of embryos and the CL score of recipient animals after non-surgical transfer of embryos matured, fertilized and cultured *in vitro*.

**Key words :** *in vitro* fertilized embryo, embryo transfer, corpus luteum, parity.

## 서 론

소 수정란 이식에 의한 송아지생산은 1951년 Willett 등<sup>1</sup>이 소 수정란을 얻기 위해 과배란 처리를 한 공란우를 교배시킨 후 5일뒤에 도살하여 생식기관을 적출, 그 소의 혈장을 관류액으로 난관을 관류한 후 여기서 회수한 수정란을 발정동기화된 수란우에 복정중절개를 통해 외과적으로 이식하여 얻게 되었다. 그후 소 수정란 이식 기법은 많은 발전을 거듭하여 현재에 이르고 있으며 특히 비외과적 채란<sup>2,3</sup>, 비외과적 이식<sup>4</sup>과 체외성숙, 체외수정 유래의 수정란의 생산<sup>5-11</sup> 등의 과정은 체외수정 유래 송아지생산으로 이를 산업적 적용에 이르게 되었다. Humblot 등<sup>12</sup>, Leibo<sup>13,14</sup>, Linder와 Wright Jr<sup>15</sup>, Renard 등<sup>16</sup> 및 Baker 등<sup>17</sup>은 과배란처리법에 의하여 회수된 수정란을 이식할 때 수정란의 질이 excellent나 good일 때가 fair일 때보다 수태율이 유의적으로 높았다고 하였으나, Voss 등<sup>18</sup>은 수정란의 질이 좋은 경우 수태율이 증가하는 경향은 있으나 유의적인 차이가 없다고 하였다. 또 Humblot 등<sup>12</sup>, Lindner와 Wright Jr<sup>15</sup> 및 Pettit<sup>19</sup>은 이식시 수정란 발육단계의 차이가 수태율에 영향을 미치지 않는다고 하였으나, Hasler 등<sup>20</sup>, 김 등<sup>21</sup>, Wright<sup>3,22</sup> 및 황과 조<sup>23</sup>는 배반포가 상살배기의 수정란보다 높은 수태율을 나타낸다고 하였고, Shea<sup>24</sup>는 탈출배반포일 때 가장 높은 수태율을 보인다고 하였다. 그리고 이식시 수란우의 황체등급은 Humblot 등<sup>12</sup>, Hasler 등<sup>20</sup>이 직장검사로 황체의 크기에 의한 황체기능평가는 신빙성이 부족하다고 하였고 Wright<sup>3</sup>, 오 등<sup>25</sup>은 수란우의 산차와 수태율과는 유의성이 없다고 하였다.

이와같이 과배란 처리에 의한 수정란 이식시 수태율에 미치는 요인들에 관한 보문은 다양하게 존재하나 체외수정 유래 수정란의 이식시 수태율과 수정란과의 관

계에 대한 보고는 혼치 않는 편이다. 수정란 이식의 산업적 응용은 과배란 처리법에 의한 체내수정란 이식에 이어 근년에 체외수정기법에 의한 체외수정란의 산업적 이용이 활발히 진행되고 있는 바 국내에서도 Hwang 등<sup>26</sup>이 한우정액을 이용한 체외수정란 유래 송아지생산에 성공한 이래 이에 대한 연구가 활기를 띄고 있어 이에 저자는 체외수정 유래 수정란 이식시 수태율과의 관계에 대한 요인들을 분석하여 그 효율성을 제고시키기 위해 본 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

**난포란의 채취 :** 난소는 도축장에서 도살된 암소로부터 외과용 가위를 사용, 채취하여 100IU/ml의 penicillin과 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin이 첨가된 30-35 $^{\circ}$ C의 생리식염수에 보존후 2시간이내에 실험실로 운반하였다. 실험실로 운반된 난소는 38 $^{\circ}$ C의 멸균된 생리식염수로 1회 세정하였다.

난자는 18 gauge needle을 부착한 주사기로 5%의 fetal calf serum(Gibco, USA, 이하 FCS로 약함)을 첨가한 38 $^{\circ}$ C의 tissue culture medium 199(Gibco, USA, 이하 TCM 199로 약함)을 2ml정도 흡입한 후 직경 3-5mm의 소난포로부터 채취하였다. 회수한 난포란은 Wiemer 등<sup>27</sup>의 기준에 준하여 난구세포가 치밀하게 부착된 것만을 선별하여 사용하였다.

**체외성숙 :** 육안적으로 정상이라고 인정되는 직경 10-15mm의 성숙난포로부터 채취된 과립막 세포를 5% FCS 첨가 TCM199으로 3회 세정한 후  $5.0 \times 10^6$  cell/ml의 농도로 각각의 well에 첨가하고 10% FCS첨가 TCM 199을 분주한 4-well dish(Nunc, USA)에 10ng/ml의 epidermal growth factor(Boehringer Mannheim, Germany ; 이하 EGF라 약함)를 첨가하여 전배양을 실시하였다. 선별한 난자는 각각의

well에 10-15개씩 첨가하여 39℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 23-24시간 성숙배양하였다.

**체외수정 :**

1) 정자의 처리 : 정액은 straw당 5×10<sup>7</sup>개의 정자가 들어있는 동결정액(축협중앙회 유우한우개량사업소)을 사용하였으며 기본배양액은 modified Tyrode-medium(Parrish 등<sup>28</sup>; 이하 TALP로 약함)을 사용하였다. 동결정액은 38℃ 수조에 30초간 침지하여 진탕응해시키고, Sperm-TALP(이하 sp-TALP로 약함)를 1ml씩 분주한 11×55mm의 plastic tube (Falcon, USA)에 용해시킨 정액을 pasteur pipette을 이용하여 0.2ml씩 분주한 후 1시간동안 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 swim-up 과정을 실시하였다. 각 시험관의 상층액 약 0.8ml를 micropipette으로 흡입하여 정자를 하나의 원심관에 모아 원심분리하여(700g, 5분) 생존성 있는 활력정자를 선별하였다. 원심분리후 상층액을 제거한 다음 새로운 sp-TALP를 2-3ml 보충해주는 방법으로 3회 세정하여 동결보호제 및 희석액을 제거하였다. 정자는 농도를 1.0×10<sup>6</sup>/ml로 조정한 후 수정능획득을 위해 동량의 heparin (200µg/ml)을 첨가하여 39℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO<sub>2</sub> 배양기에 15분간 정치하였다.

2) 난자의 준비 : 정자를 swim-up시키는 동안 *In vitro* fertilization-TALP 배지(이하 IVF-TALP로 약함)로 35mm perti dish (Costar, USA)에 40µl의 미소적용 작성한 후 light white oil(Mineral oil, Sigma, USA)을 도포하였다. 성숙난자는 세정하여 팽대된 난구세포를 농정도 조심스럽게 벗겨 5µl로 5개씩 각 미소적에 첨가하였다.

3) 체외수정 : 정자는 heparin 처리후 동량의 sp-TALP를 혼합하여 준비한 난자의 미소적에 5µl씩 첨가하여 최종농도가 2.5×10<sup>6</sup>/ml가 되도록 하였다. 준비한 정자와 난자는 18시간동안 39℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 배양하여 체외수정하였다.

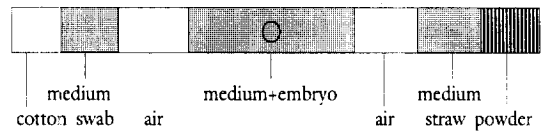
체외배양 : 난소표면에 출혈체를 보이거나 2g 미만의 황체조직을 지닌 초기황체의 난관에서 관류법을 이용하여 난관상피세포를 채취한 후 5% FCS첨가 TCM199으로 3회 원심분리(500g, 5분)하였다. 난관상피세포는 10% FCS첨가 TCM199을 0.5ml씩 분주한 24-well plate(Falcon, USA)에 36-48시간 동안 배양하여 난관상피세포의 monolayer를 형성시켰다. 형성시킨 monolayer는 수정란과 함께 배양하기 3시간이전에 배지를 교환하여 monolayer를 형성하지 못한 세포를 제거하고 배양액을 평형시켰다.

수정이 끝난 수정란은 3회 세정후 배양중인 난관상피세포와 공배양을 시켰고 수정으로부터 120시간 후 후기배를 분류하여 144-168시간 후에 이식에 공여하였다.

**수정란 이식**

1) 수란우의 준비 : 수란우로는 경기도 일대의 목장에서 사육하고 있는 Holstein 유우(이하 수란우라 함)를 사용하였다. 수란우는 공히 생후 18개월 이상이며, 임상적 소견과 임상병리학적 검사에 의하여 건강하다고 인정되고, 처치전까지 3회 이상의 정상적인 발정주기를 보인 미경산우 및 경산우로서 발정 7일째에 최종 이식할 수란우를 선발할 목적으로 직장검사를 실시하여 자궁과 난소의 상태 및 황체의 위치(좌 또는 우)를 확인하였다. 황체의 등급구분은 크기가 정상(15-25mm)이고 좋은 형태의 crown을 지닌 것을 I 등급으로, 황체의 크기는 정상보다 작으나 crown이 있는 것을 II 등급, 정상크기이나 crown이 없는 것을 III 등급으로 하였다.

2) 수정란의 준비 : 상실배 또는 배반포기까지 체외배양시킨 수정란을 실체현미경(Wild M8, Sweden)하에서 50배로 관찰하여 질과 발육단계를 분류하고, 20% FCS가 함유된 phosphate buffered saline(Gibco, USA; 이하 PBS로 약함)으로 수정란을 0.25ml French straw에 흡입하여 봉하고 보온병에 넣어 이식장소까지 1시간내에 운반하여 수란우에의 이식에 공여하였다(Fig 1).



Text-Fig 1. Preparation of straw for transfer.

3) 수정란의 이식 : 모든 수란우는 이식 12시간 전부터 절식시키고, 이식을 용이하게 하기 위해 이식직전에 2% lidocaine액 5ml로 척추경막외마취를 실시하였다. 주사후 꼬리를 묶어 앞으로 고정시킨 후 외음부 주위를 소독액과 멸균생리식염수로 세정하고 멸균된 tissue paper로 물기를 제거하였다. 이식방법은 Rowe 등<sup>4</sup>의 방법에 준하여 straw가 장착된 수정란이식기를 사용, 비외과적 자궁경관경유법에 의해 자궁각선단부의 자궁난관 접합부 5cm 부위에 수정란을 이식하였다.

4) 수태율 판정 : 이식한 후 50일경에 직장검사에 의한 태막 및 태아 촉진법과 초음파 검사법으로 수태여부

를 판정하였다.

통계학적 분석 : 모든 실험결과치는 Chi-square test를 실시하여 각 실험군간의 유의성을 검정하였다.

## 결 과

수란우 70두중 이식후 35일까지 발정정후를 나타낸 소의 숫자는 21두(30%)로 나머지 49두(70%)가 50일까지 발정정후를 보이지 않았으나 그중 16두(22.9%)는 50일째의 직장검사결과 임신이 되지 않은 것으로 진단되었고, 33두(47.1%)만이 임신으로 진단되었다. 이식시 체외수정란의 질에 따른 수태율은 excellent 등급에서 66.7%(12두/18두), good 등급에서 54.5%(18두/33두)로 fair 등급에서의 15.8%(3두/19두)보다 유의적으로 차이를 보였다( $p < 0.05$ , Table 1). 발육단계별로 구분한 각 군간의 수태율은 Morula 46.2%(6두/13두), Compacted Morula 55.0%(1두/20두), Blastocyst 62.5%(10두/16두), Expanded Blastocyst 50.0%(1두/2두)로 각 군간에 유의적인 차이가 없었다(Table 2). 수란우를 경산우와 미경산우로 분리하여 조사한 수태율은 미경산우에서 54.5%(12두/22두), 경산우에서 55.2%(16두/29두)로 두 군간에도 유의적인 차이가 없었다(Table 3). 이식시 수란우의 황체를 3등급으로 나누

Table 1. Effects of morphological quality on pregnancy rates after transfer of bovine embryos produced *in vitro*

Embryo quality	No. of Recipient Cow	No. of Pregnant Cow day 50	Pregnancy Rates(%)
Excellent	18	12	66.7 <sup>a</sup>
Good	33	18	54.5 <sup>a</sup>
Fair	19	3	15.8 <sup>b</sup>
Total	70	33	47.1

a,b : Different superscripts in the same column denote significant differences( $p < 0.05$ )

Table 2. Effects of embryo stage on pregnancy rates after transfer of bovine embryos produced *in vitro*

Embryo stage	No. of Transfer	No. of Pregnant Cow day 50	Pregnancy Rates(%)
Morula	13	6	46.2
Compacted Morula	20	11	55.0
Blastocyst	16	10	62.5
Expanded Blastocyst	2	1	50.0
Total	51	28	54.9

Table 3. Effects of recipient's parity on pregnancy rates after transfer of bovine embryos produced *in vitro*

Recipient	No. of Transfer	No of Pregnant Cow day 50	Pregnancy Rate(%)
Heifer	22	12	54.5
Cow	29	16	55.2
Total	51	28	54.9

Table 4. Effects of Corpus Luteum quality on pregnancy rates after transfer of bovine embryos produced *in vitro*

C.L grade*	No. of Transfer	No. of Pregnant Cow day 50	Pregnancy Rate (%)
I	30	20	66.7 <sup>a</sup>
II	11	7	63.6 <sup>a</sup>
III	10	1	10.0 <sup>b</sup>
Total	51	28	54.9

\* I : normal size(15 to 25mm) with good crown  
 II : small size(<15mm) with palpable crown  
 III : normal size without crown  
 a,b: Different superscripts in the same column denote significant differences( $p < 0.05$ )

어 수태율을 조사한 결과 I 등급의 황체를 가진 군에서 66.7%(20두/30두), II 등급에서 63.6%(7두/11두)로, III 등급에서의 10%(1두/10두)보다 유의적으로 높은 성적을 보였다( $p < 0.05$ ).

## 고 찰

체외성숙, 수정 및 체외배양된 난을 수란우에 이식하여 수태시켰다는 보고는 여러 연구자들에 의하여 이루어졌다<sup>10,26,29-32</sup>.

본 실험에 있어서 excellent, good 및 fair 등급의 체외수정란을 이식한 후의 수태율은 각각 66.7, 54.5 및 15.8%로 Niemann 등<sup>33</sup>이 보고한 난질에 따른 수태율 즉 excellent나 good(56.4%), fair(33.3%) 및 poor(45.0%)와 일치하지 않았으나, 난질의 등급이 향상됨에 따라 수태율도 유의성 있게 증가한다고 한 Coleman 등<sup>34</sup>과 Humblot 등<sup>12</sup>과는 유사하였다. 또한 본 실험과 같은 체외수정란을 이식한 Reichenbach 등<sup>35</sup>의 결과는 본 실험과 유사한 경향을 보였다. 그의 Lindner와 Wright Jr<sup>15</sup>, Renard 등<sup>16</sup> 및 Leibo<sup>13</sup>의 결과도 본 실험과 유사하였다. 따라서 Niemann 등<sup>33</sup>의 결과중 poor 등급에서 높은 수태율을 보인 것은 난질이외

또다른 요인이 개체된 것이 아닌가 생각되며, 체외수정란 이식시에는 수정란의 질이 좋을수록 높은 수태율을 기대할 수 있을 것으로 생각된다. 체외수정란의 발육단계별 수태율은 본 실험에서 각각 상실배 46.3%, 치밀화 상실배 55.0%, 배반포 62.5% 및 확장배반포 60.0%로 유의적인 차이가 나타나지 않아서 Pettit Jr<sup>19</sup>, Lindner와 Wright Jr<sup>15</sup>의 발육단계에 따른 수태율에는 큰 차이가 없다는 보고와 유사하였다. 그러나 Hasler 등<sup>20</sup>, 황과 조<sup>23</sup> 및 Donaldson<sup>36</sup>의 보고에서는 상실배보다는 초기배반포와 증기배반포의 수정란을 이식하였을때 수태율이 높았다고 하여 본 실험의 결과와 상이하였다. 이와같이 보고자에 따라 발육단계별 수태율이 다양하게 나타나는 것은 수란우의 자궁상태, 수정란의 질 등 발육단계 이외의 다른 조건들이 수태율에 영향을 미치기 때문인 것으로 생각되며 특히 초기배반포와 증기배반포의 수정란이식시 높은 수태율을 보였다고 한 경우는 수란우와 공란우의 발정일차의 오차가 가장 적은 상황에서 이식하였기 때문인 것으로 생각한다. 본 실험에서 수란우의 산차에 따른 수태율은 미경산우와 경산우 각각 54.5%와 55.2%로 군간에 유의차가 없었는데 유사한 실험에서 Godkin 등<sup>37</sup>은 각각 35%와 33%, Wright<sup>3</sup>는 58%와 59%로 본 실험의 결과와 유사하였고, De los Santos-Valadez 등<sup>38</sup>과 오 등<sup>25</sup>은 미경산우가 경산우에서보다 높은 수태율을 나타내는 경향이 있다고 하였다. 이러한 견해차이는 경산우에 이식시 경관통과가 미경산우에서보다 용이하기 때문에 높은 수태율을 보였다는 Newcomb 등<sup>39</sup>의 보고와 18개월령 이상된 미경산우의 경관통과는 큰 문제가 되지 않는다는 Wright<sup>3</sup>의 보고 그리고 조기태아사율이 4.5산의 경산우에서보다 미경산우에서 높다는 Erb와 Holtz<sup>40</sup>의 보고들을 보아, 직장검사 또는 임상적 검사로 확인하기 어려운 미약한 수란우의 자궁 및 경관상태차이의 영향에 의하여 초래된 결과로 추정한다. 본 실험에서 황체등급이 I, II, III등급인 군의 수태율은 각각 66.7, 63.6 및 10.0%로 I, II등급군의 수태율이 III등급군의 수태율보다 유의적으로 높은 성적을 보였는데 이것은 황과 조<sup>23</sup>의 각각 59.3, 50.0 및 25.0%인 보고와 유사한 결과로 생각된다. 그런데 Hasler 등<sup>41</sup>은 과배란처리법에 의한 수정란 이식시 수란우의 개체별 혈중 progesterone 농도는 직장검사에 의한 수란우 황체등급에 따른 관련성을 보이지 않았다고 하였고 또 1987년 Hasler 등<sup>20</sup>은 수란우의 황체등급을 crown의 유무를 명시하지 않은채, 크기를 정상인 경우, 작은 경우 및

낭종성인 경우로 나누어 각 군간의 수태율을 보고하였는데 역시 수태율에서도 각 군간의 유의성을 보이지 않았다고 하였고, Humblot 등<sup>12</sup>도 직장검사법에 의한 황체 크기별 혈중 progesterone 농도를 측정된 결과 각 군간에 유의적인 차이가 없었으며 황체의 크기가 2cm 이상인 군과 1-2cm인 군에서의 수태율도 각각 47.6(n=84), 27.3%(n=22)로 나왔으나 유의차가 없었다고 하였으며 또한 Coleman 등<sup>34</sup>도 직장검사법에 의한 황체의 질 판정은 수태율을 추정하는 지표가 될 수 없다고 하였다. 이와같이 여러 보문들에서 황체의 등급과 수태율과의 관련성을 부인하고 있음에도 불구하고 본 실험에서의 결과가 I, II등급군과 III등급군간의 유의적인 수태율 차이를 보인 것은 본 실험에서 황체등급을 황체의 물리적인 크기에 비중을 두지 않고 crown의 존재여부에 비중을 두어, crown의 존재여부가 발정증상 발현으로부터 이식적기까지의 경과기간을 더 잘 확인시켜주는 지표라고 생각하여 분류한 점, 수란우로 공여하기 위해서는 발정 발현날짜와 발현시간을 관찰한 다음 이식시 직장검사로 crown의 존재여부를 확인한 점 등, 이식시 수란우 황체등급분류의 미소한 기준차이 때문인 것으로 생각하며, 본 실험을 통한 판단으로는 체외수정란 이식시 수태율과 수란우의 황체의 질과는 관련성이 없지 않아 I, II등급의 황체를 가진 수란우에서 III등급의 황체를 가진 수란우보다 높은 수태율을 보일 것이라고 생각한다.

이상의 결과로 보아, 체외생산된 소 수정란 이식시 수정란의 난질과 수란우 황체등급이 좋을수록 이식후 수태율에서 높은 성적을 나타낼 것으로 생각하며, 본 실험에 포함되지 않은 요인들 특히 난 자체의 내재적 인자와 체외조작에 의한 수정란의 손상 등이 이식후 수태율에 미치는 영향에 대한 연구가 병행되어야 할 것으로 사료된다.

## 결론

체외성숙, 수정 및 배양유래의 소 수정란을 Holstein 젖소에 비외과적으로 이식한 후 체외수정란과 수란우의 상태 및 이식조건이 수태율에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 체외수정란의 품질을 excellent, good, fair의 3군으로 나누어 이식한 후 수태율을 조사한 결과 excellent(66.7%)와 good(54.5%) 판정을 받은 군이 fair(15.8%) 판정을 받

은 군에서보다 유의적으로 높은 수태율을 보였다( $p < 0.05$ ).

2. 체외수정란의 발육단계를 morula, compacted morula, blastocyst, expanded blastocyst로 나누어 수태율을 조사한 결과 각 군간의 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

3. 수란우를 미경산우와 경산우로 나누어 이식한 후 수태율을 조사한 결과 두 군간의 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

4. 수란우의 황체등급을 3군으로 나누어 이식후 수태

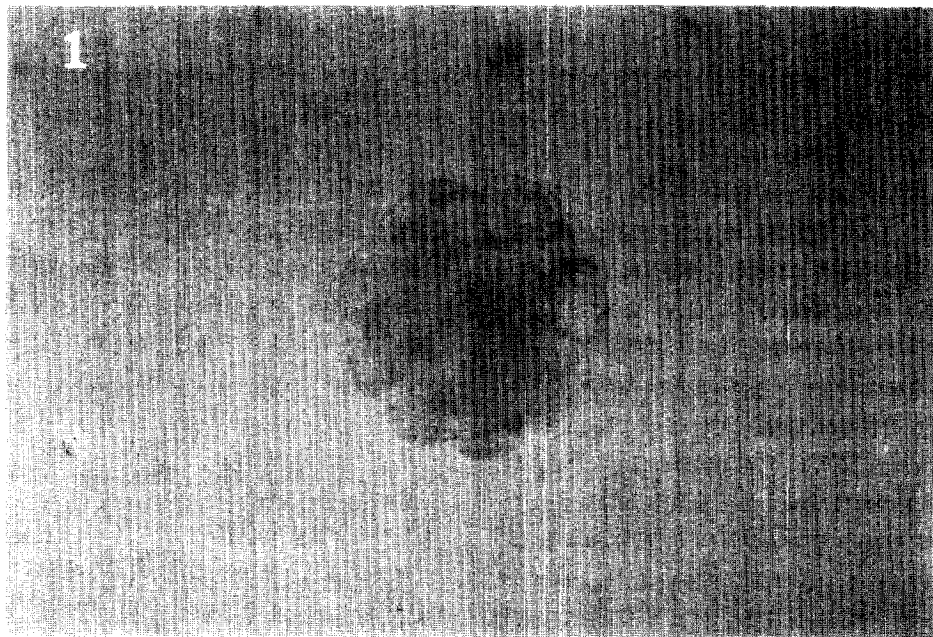
율을 조사한 결과 정상크기에 crown을 지닌 I군(66.7%) 및 황체크기는 작으나 crown이 형성된 II군(63.6%)이 crown 형성이 안된 황체를 가진 III군(10%)보다 유의적으로 높은 수태율을 보였다( $p < 0.05$ ).

이상의 결과로 보아 체외성숙, 수정 및 배양유래 소 수정란 이식시 수정란의 품질이 좋을수록 높은 수태율을 기대할 수 있으며, 수란우가 정상크기에 잘 발달된 crown을 가진 경우에 이식후 높은 수태율을 보일 것으로 사료된다.

### Legends for figures

Fig 1. A morula developed in vitro.  $\times 250$

Fig 2. An early blastocyst developed in vitro. Note the presence of inner cell mass(ICM) and trophoblast.  $\times 250$ .





## 참 고 문 헌

1. Willett EL, Black WG, Casida LE, *et al.* Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science*, 113 : 247, 1951.
2. Newcomb R, Christie WB, Rowson LEA. Non-surgical recovery of bovine embryos. *Vet Rec*, 102 : 414-417, 1978.
3. Wright JM. Non-surgical embryo transfer in cattle. *Theriogenology*, 15 : 43-56, 1981.
4. Rowe RF, Del Campo MR, Crister JK, *et al.* Embryo transfer in cattle. *Am J Vet Res*, 41 : 1024-1028, 1980.
5. Leibfried-Lutledge ML, Crister ES, First NL. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod*, 35 : 850-857, 1986.
6. Fukui Y, Ono H. 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, 1989.
7. Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, *et al.* Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod*, 27 : 147-158, 1982.
8. 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*, 75 : 551-556, 1985.
9. Boland MP. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology*, 21 : 126-137, 1988.
10. Eyestone WH, First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fert*, 85 : 715-720, 1989.

11. Yang BK, Yang X, Foote RH. Effect of growth factors on morula and blastocyst development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, 40 : 521-530, 1993.
12. Humblot P, Perrin J, Jeanguyot N, *et al.* Effects of age and quality of thawed embryos, synchronization and corpus luteum function on pregnancy rates of bovine embryo recipients. *Theriogenology*, 27 : 240(Abst), 1987.
13. Leibo SP. Commercial production of pregnancies from one-step diluted frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 25 : 166, Abstr., 1986.
14. Leibo SP. Field trial of one-step diluted frozen-thawed bovine embryos: An update. *Theriogenology*, 23 : 201, Abstr., 1985.
15. Lindner GM, Wright Jr, RW. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20 : 407-416, 1983.
16. Renard JP, Heyman Y, Leymonie P, *et al.* Surose dilution: A technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. *Theriogenology*, 19 : 145(Abst), 1983.
17. Baker AA, Kobayashi G, Jillella D. A comparison of the pregnancy rate following non-surgical and surgical transfer and visual grading of bovine embryos on farm in South-Eastern Queensland. *Theriogenology*, 19 : 111, Abstr., 1983.
18. Voss HJ, Landmann D, Wilke G, *et al.* Pregnancy rate after surgical transfer of imported frozen bovine embryos. *Theriogenology*, 25 : 209, Abstr., 1986.
19. Pettit WH Jr. Commercial freezing of bovine embryos in glass ampules. *Theriogenology*, 23 : 13-16, 1985.
20. Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF, *et al.* Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, 27 : 139-168, 1987.
21. 김희석, 오성종, 양보석 등. 소에 있어서 이식 수정란의 생존성에 영향을 미치는 요인에 관한 연구. *한축지*, 28 : 578-583, 1986.
22. Wright JM. Commercial freezing of bovine embryos in straw. *Theriogenology*, 23 : 17-29, 1985.
23. 황우석, 조충호. 소의 비외과적 수정란이식에 있어서 수태율에 영향을 미치는 요인. *한국임상수의학회지*, 5 : 1-7, 1988.
24. Shea BF. Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology*, 15 : 31-42, 1981.
25. 오성종, 양보석, 김희석 등. 소의 발정동기화 및 동결수정란 이식에 관한 연구. *한축지*, 28 : 468-473, 1986.
26. Hwang WS, Jo CH, Lee BC, *et al.* Successful calving following transfer of bovine embryos produced by *in vitro* fertilization in Korea. *J Reprod Dev*, 41 : 175-179, 1995.
27. 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*, 18 : 139-148, 1991.
28. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, *et al.* Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod*, 38 : 1171-1180, 1988.
29. Goto K, Kajihara S, Kosaka M, *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*, 83 : 753-758, 1988.
30. Lu KH, Jiang HS, Wang WL, *et al.* Pregnancies established in cattle by transfer of fresh and frozen embryos derived from *in vitro* maturation and fertilization of oocytes and their subsequent culture. *Theriogenology*, 33 : 278, Abstr., 1990.
31. Xu KP, Pollard JW, Rorie RW, *et al.* Pregnancy rates following transfer of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and co-culture. *Theriogenology*, 33 : 351, 1990.
32. Yang NS, Duff R, Lu KH, *et al.* Effect of storage temperature and time on the viability of bovine embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*, 35 : 297, 1991.
33. Niemann H, Sacher B, Elsaesser F. Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 23 : 631-639, 1985.
34. Coleman DA, Dailey RA, Leffel RE, *et al.* Estrous synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. *J Dairy Sci*, 70 : 858-



- 866, 1987.
35. Reichenbach HD, Liebrich J, Berg U, *et al.* Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. *J Reprod Fert*, 95 : 363-370, 1992.
36. Donaldson LE. Day of embryo collection, quality and pregnancy rates in cattle. *Vet Rec*, 118 : 661-663, 1986.
37. Godkin AM, Leslie KE, Wain GM, *et al.* Factors affecting pregnancy rate following non-surgical transfer of frozen bovine embryos. *Theriogenology*, 27 : 230, Abstr., 1987.
38. De los Santos-Valadez S, Seidel Jr GE, Elsdon RP. Effect of HCG on pregnancy rates in embryo transfer recipients. *Theriogenology*, 17 : 85 Abstr., 1982.
39. Newcomb R, Rowson LEA. Investigation of physiological factors affecting non-surgical transfer. *Theriogenology*, 13 : 41-49, 1980.
40. Erb RE and Holtz EW. Factors associated with estimated fertilization and service efficiency of cows. *J Dairy Sci*, 41 : 1541-1552, 1958.
41. Hasler JF, Bowen RA, Nelson LD, *et al.* Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfers. *J Reprod Fert*, 58 : 71-77, 1980.
-