

생식보조기술시 단백질원으로서 인간난포액의 적합성 및 효율성에 관한 연구

III. 인간난포액이 생식보조기술시 임신을 향상에 미치는 효과

한나여성의원 시험관아기센터

구정진 . 지희준 . 김동훈 . 김지연 . 장상식

Studies on the Suitability and Efficiency of Human Follicular Fluid as Protein Supplement in Assisted Reproductive Technology(ART)

III. Effect of Human Follicular Fluid on Improvement of Pregnancy Rates in ART

JJ Koo, HJ Chi, DH Kim, JY Kim and SS Chang

IVF Center, Hanna Women's Clinic

= Abstract =

Through the previous studies(I,II), it was observed that human follicular fluid(HFF) was more effective than human fetal cord serum(HFCS) on promoting meiotic resumption of oocytes and improving embryonic development of mouse *in vitro*. On the basis of these results, we have gradually exchanged HFCS with HFF as protein supplement in human ART. This study was performed to investigate the efficiency of HFF on improving the pregnancy rate in ART. Oocytes were retrieved transvaginally from patients treated with pituitary suppression with GnRH-agonist and ovarian stimulation with human menopausal gonadotro-pin(HMG) and pure follicle stimulating hormone (FSH). Aspirated oocytes were rinsed and cultured in TCM-199 containing HFF, and the concentrations of HFF were adjusted to 10, 20, and 30% according to the use for insemination, embryo growth and embryo transfer, respectively. As possible as, we tried to do embryo transfer into fallopian tube to mimic the coincidence of the cell stage with the place of sojourn *in vivo*, so we performed various ART programs(IVF & ET; *in vitro* fertilization, ZIFT; zygote intra fallopian-tube transfer, ZIFT & ET) according to the tubal conditions of patients. On the while, intra cytoplasmic sperm injection(ICSI) was used to assist IVF of the patients who had shown poor standard IVF results by immunological or severe male factor. Of the 255 cycles of ART programs using HFF as protein supplement, 118 cycles were turn out to be succeeded in pregnancy(46.2%, per cycle, $p < 0.05$), while 21 pregnancies were achieved in the 69 cycles using HFCS(30.4%). The 255 cycles using HFF were subdivided into cycles with the type of ART programs, and each pregnancy rate of the ART programs were 44.7% (IVF & ET, 76/170 cycles), 53.4%(ZIFT, 31/58 cycles) and 40.7% (ZIFT & ET, 11/27 cycles), respectively. In the 61 ICSI cycles using HFF, 28 cycles succeed in pregnancy(45.9%), while 7 pregnancies were obtained in the 17 ICSI cycles using HFCS. Also the ongoing pregnancy rate in the group using HFF(78.8%, 93/118 cycles) was higher than that in the group using HFCS(61.9%). Therefore, we found that the use of HFF as protein supplement was more suitable and effective than the use of HFCS to improve the pregnancy rate in ART.

서 론

단백질원으로서의 혈청은 포유동물의 체세포 및 생식세포의 체외배양뿐만 아니라 불임치료를 위한 생식보조시술시 인간 생식세포의 체외배양에도 가장 널리 사용되어왔다. 그러나 최근 서구나 유럽 등지에서는 혈청의 배발달에 미치는 유해한 효과 (Caro and Trounson, 1986)와 AIDS 등 전염성 질병의 감염위험성으로 인하여 혈청알부민과 합성혈청대용물질등의 사용 (Khan et al., 1991; Holst, 1990)이 점차 확산되고 있으나 혈청의 사용에 비해 배발달 및 임신율의 향상에 있어서 만족할 만한 결과를 얻지 못하고 있다. 한편 혈청의 사용에 있어서 수반되는 양적인 제한성과 시료간 질적인 불균형의 문제점들은 다른 생리적 체액인 양수, 난포액등의 이용을 유도하였고, 임신율이 향상되는 성공적인 체외배양성적을 얻었다 (Gianaroli et al., 1986; 윤등., 1994). 특히 난포액은 생식보조시술의 난자채취과정중 배란직전의 성숙난포로부터 채취한 것으로서, 이들 난포액내에는 gonadotropin surge의 영향으로 활성화된 핵성숙촉진인자 (maturation promoting factor, MPF)와 핵성숙 및 배발달촉진작용이 있는 gonadotropin, Growth factor (Earp 등 1991), 정자의 활성화촉진인자로 알려진 Platelet-activating factor (Amiel et al., 1991), 그리고 착상에 관여한다는 태반단백질 (Seppala et al., 1984) 등 다양한 물질들이 높은 농도로 함유되어있다. 이러한 난포액을 이용하였을 경우, 난자의 핵성숙촉진 (Cha et al., 1991), 정자의 침체반응과 활성화 향상 (Revelli et al., 1995; Amiel et al., 1991), 수정률 (Ralt et al., 1991) 및 임신율 향상 (Fakih and Vijayakumar, 1990) 등 난포액의 유용한 효과에 대한 보고와 생쥐난자를 이용한 예비실험 I, II를 통해 난포액이 난자의 체외성숙 및 수정란의 체외발달에 제대혈청 보다 효과적이라는 결과를 고려하여 인간의 생식보조시술시 난포액을 제대혈청의 대체단백질원으로 교체하여 사용하였다. 이에 본 연구는 생식보조시술시 난포액을 단백질원으로 사용하였을 때 임신율 향상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수행하였고, 본 연구의 결과는 1994년 9월 부터 1995년 10월까지 본원에서 수행된 생식보조시술에 대한 결과를 통계적인 처리 후 제시한 것이다.

1. 난포액 및 제대혈청의 준비

난포액은 AIDS, VDRL, HBS-Ag 등의 검사를 통해 이상이 없는 환자들의 난자채취과정 중 성숙난포란을 함유하고 있었던 난포로부터 채취하였다. 채취한 난포액은 500Xg에서 15분간의 원심분리를 통해 난포액내 혈구 및 난구세포등을 제거시킨 상층액만을 회수하였다. 회수된 난포액은 59℃에서 35분간 불활성화 시킨 후, 0.22µm 여과기를 이용하여 제균하였다. 여과된 난포액은 -82℃에서 사용전까지 냉동보관하여 보관중변성의 가능성을 극소화시켰다. 한편 제대혈청 역시 건강한 정상분만 환자의 제대로부터 얻은 혈액을 원심분리하여 회수하였다. 제대혈청의 비활성화 및 보관은 난포액과 동일한 방법으로 처리하였다.

2. 체외배양 및 난포액 첨가농도

난자 및 수정란의 체외배양용 배양액으로는 TCM-199 (Gibco), 정자세척용 배양액으로는 Ham's F-10 (Gibco)을 각각 사용하였다. 난자의 수정 및 정자의 세척시에는 난포액 첨가농도를 10%로 조정하였고, 수정란의 체외배양용과 이식용의 배양액에는 각각 20, 30%의 농도로 첨가하여 사용하였다.

3. 생식보조시술

불임부부의 가임을 돕기 위해 본원에서 시술하였던 생식보조시술방법은 수정란의 이식단계 및 이식 부위에 따라 체외수정 및 자궁내이식 (IVF & ET)과 접합자 난관내이식 (ZIFT), 그리고 이 두가지 방법을 병합한 형태의 이식방법 (ZIFT & ET)을 사용하였다.

4. 세포질내 정자주입(ICSI)에 의한 미세수정

번역학적 요인, 또는 정자의 운동성 및 형태적 비정상성이 증증인 남성적인 요인등에 의해 표준적인 체외수정방법을 통해서서는 수정의 불가능이 예측되거나, 이전의 시술에서 극히 저조한 수정률을 나타내었던 경우에는 미세조작기구를 이용하여 정자를 직접 난자의 세포질내에 주입시켜 수정을 유도하는 방법을 사용하였다. 이를 위해 holding과 injection pipette의 외경은 80과 6µm, 내경은 각각 10, 5µm로 제작하여 사용하였다. 미

제조작을 위한 배양액은 0.3%의 BSA를 함유한 Modified whittingham's T₆ 배양액과 정자의 운동성의 저하를 위한 10% PVP(polyvinylpolypro-pylene)용액 (Medi-cult)을 사용하였다.

5. 통계처리

본 연구에 대한 실험자료의 통계처리는 X² 검정을 실시하였다.

결 과

1. 단백질원이 생식보조시술의 임신율에 미치는 영향

난자의 체외배양시 단백질원으로서 첨가하는 제대혈청과 난포액이 임신율에 미치는 영향을 비교, 조사하였다 (Table 1).

제대혈청을 단백질원으로 사용하였을 때 보조생식시술 총 69예중 21예에서 임신이 확인됨으로써 30.4%의 임신율을 나타낸 반면, 난포액을 사용하였을 경우 총 255예중 118예가 임신에 성공하여 46.2%의 임신율을 나타냄으로써 유의한 임신율의 향상을 보였다. 이러한 난포액의 사용에 따른 임신율의 향상은 모든 생식보조시술

프로그램(IVF & ET, ZIFT, ZIFT & ET)에서 나타났는데 특히 ZIFT의 경우 58예중 31예가 임신에 성공하여 53.4%의 임신율을 나타냄으로써 제대혈청의 사용 (4/14 cycles, 28.5%)에 비해 2배에 가까운 임신율의 향상을 나타냈다. 이러한 결과는 수정이 확인된 접합자를 난관에 이식하는 것이 난할이 일어난 수정란을 자궁 내에 이식하는 것 보다 이식된 난자의 발달 및 착상에 유익한 영향을 미치는 것으로 사료된다.

2. 단백질원이 미세수정을 이용한 생식보조시술의 임신율에 미치는 영향

중증의 면역학적 요인 또는 남성요인에 의해 체외수정이 불가능하다고 예측되거나 수정률이 극히 저조한 경험이 있던 환자들에게는 미세수정방법을 이용하였으며, 이러한 경우 사용된 단백질원이 임신율에 영향을 미치는지를 조사하였다 (Table 2).

제대혈청을 사용한 군에서 시술 17예중 7예가 임신에 성공함으로써 41.1%의 임신율을 나타내었고, 난포액을 이용한 군에서는 시술 61예중 28예에서 임신이 확인됨으로써 45.9%의 임신율을 나타냈다. 비록 난포액을 이용한 군에서 제대

Table 1. Effects of protein sources on pregnancy rates in ART programs

Protein source	ART programs	Cycles	Pregnancy cycles	Pregnancy rate %
HFCS	IVF&ET	43	14	32.5%
	ZIFT	14	4	28.5%
	ZIFT&ET	12	3	25.0%
	Total	69	21	30.4% ^a
HFF	IVF&ET	170	76	44.7%
	ZIFT	58	31	53.4%
	ZIFT&ET	27	11	40.7%
	Total	255	118	46.2% ^a

^a: P<0.05

Table 2. Effects of protein sources on pregnancy rates of ART programs using ICSI

Protein source	ART programs	Cycles	Pregnancy cycles	Pregnancy rate %
HFCS	IVF&ET	6	2	33.3%
	ZIFT	7	3	42.8%
	ZIFT&ET	4	2	50.0%
	Total	17	7	41.1%
HFF	IVF&ET	27	10	37.0%
	ZIFT	29	15	51.7%
	ZIFT&ET	5	3	60.0%
	Total	61	28	45.9%

Table 3. Effects of protein sources on maintenance of pregnancy

Protein sources	Cycles	Pregnancy cycles(%)	Ongoing cycles(%)	Abortion cycles(%)
HFCS	69	21 (30.4%)	13 (61.9%)	3 (38.1%)
HFF	255	118 (46.2%)	93 (78.8%)	24 (21.2%)

혈청군에 비해 다소 높은 임신율을 나타내었으나 이들 임신율간에 유의차는 인정되지 않았다. 이러한 결과는 미세수정의 이용이 제대혈청을 사용한 군에서의 임신율을 미세수정을 이용하지 않았을 경우 (30.4%, Table 1)에 비해 크게 향상시키는 효과가 있다는 것을 의미하며, 이러한 미세수정에 의한 임신율의 향상은 다른 연구자들의 보고 (Dianna and Matthews, 1995)와도 일치한다.

3. 단백질원이 임신유지에 미치는 영향

난자의 체외배양시 단백질원으로 사용된 제대혈청과 난포액이 임신이 성립된 후 임신의 유지에도 영향을 미치는지를 조사하여 Table 3에 그 결과를 제시하였다.

제대혈청을 사용한 69예에서 21예가 임신이 되었고, 임신 21예중 임상적유산 (7예) 또는 자궁외임신(1예)등에 의해 유산된 8예 (8.1%)를 제외한 13예가 임신이 유지됨에 따라 61.9% (13/21예)의 임신유지율을 나타내었다. 반면 난포액을 사용한 경우, 255예중 118예에서 임신이 확인되었고 이중 24예의 유산 (임상적유산 22예, 자궁외임신에 의한 유산 2예)을 제외한 93예에서 임신이 유지되므로써 78.8% (93/118예)의 임신유지율을 나타내었다. 비록 제대혈청 첨가군의 시술수가 적어 임신유지율에 있어서 통계학적으로는 난포액과 제대혈청 첨가군간에 유의차는 인정되지 않았지만 제대혈청에 비해 난포액의 사용이 임신을 유지하는데 있어서 보다 우월한 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

고 찰

생식보조시술시 수정란의 체외발달을 및 임신 성공률을 보다 높이기 위하여 새로운 배양액의 개발 (Ham, 1963; Quinn et al., 1985; Menezo et al., 1984), 배양첨가제 및 공동배양등에 의한 배양조건 개선 (Sakkas et al., 1994; Wiemer et al., 1989) 및 사용기구등에 대한 연구 (Patton and Sittoelk, 1993)등이 지속적으로 활발히 진행되어 왔다. 그러나 아직까지도 가장 매력적인 연구대

상은 체외배양조건에 대한 개선이라 할 수 있다. 왜냐하면, 현재 사용되는 체외배양조건들이 아직까지는 생체내 조건과는 모든 점에서 상당한 차이가 있기에 합리적인 배양조건 개선은 수정률, 배발달율 및 임신율등의 향상에 가장 커다란 효과를 낼 수 있기 때문이다. 가장 이상적인 체외배양조건은 생체내 조건에 가장 가깝도록 모방한 배양조건이라 할 수 있으며, 따라서 난포와 난관 및 자궁유래의 세포들과의 공동배양을 이용한 체외배양조건이 수정란의 체외발달 및 임신을 향상에 크게 기여한다는 (Bongso et al., 1989; Jayot et al., 1995; Michelle et al, 1993) 것은 당연하다. 이러한 관점에서 본 연구에서는 체외배양액에 첨가하는 단백질원 중 생체내와 가장 유사한 조건을 제공할 수 있는 단백질원으로서 난포액을 선택하게 되었는데 그 이유는 배란시 난포의 파열로 대부분의 난포액이 복강내로 분산되지만 미량이나마 난관채를 통하여 난관내로 유입될 수 있고, 이렇게 유입된 난포액이 정자의 침체반응 및 활성화를 촉진하여 (Revelli et al., 1995; Amiel et al., 1991) 수정을 돕고 (Ralt et al., 1991) 나아가 수정란의 발달과 착상 및 태아의 발달에 까지 영향을 미칠 수 있다는 (Yeung et al., 1992) 가능성 때문이다. 이러한 가능성의 배경은 비록 종이 다른 다태동물인 돼지나 생쥐의 해부학적 구조상 난소와 난관채가 하나의 주머니로 둘러싸여 있으며 배란이 되면 배란된 난자들과 난포액이 이 주머니를 가득 채웠다가 난관채를 통해 난관으로 이동한다는 사실이다. 이러한 난포액의 선택배경위에서 생쥐난자를 이용한 예비실험 (실험 I, II)을 수행하였고, 예상했던 대로 난포액의 핵성숙 및 배발달 촉진효과를 확인함으로써 우리의 선택에 확신을 얻었다. 이에 직접 인간의 생식보조시술시 단백질원으로서 난포액을 사용한 결과, 제대혈청에 비해 약 15%이상의 유의한 임신율의 향상을 얻을 수 있었다 (Table 1). 이러한 임신율의 향상은 특히 ZIFT에서 두드러졌는데 이는 수정란을 이식함에 있어서 수정란의 세포발달단계와 일치하는 체내 체류장소인 난관내에 이식하는 것이 수정란의 이

식 후 체내발달에 도움이 된다 (Frederick et al., 1994; Fakh and Vijayakumar, 1990; Fluker et al., 1993)는 것을 의미하며 이러한 결과는 수정란의 체외배양시 난관상피세포와의 공동배양이 체외발달에 유의한 효과가 있다는 보고 (Bongso et al., 1989)에 의해 뒷받침되고 있다. 한편 미세수정을 이용한 경우, 난포액과 제대혈청간에 임신율이 차이를 나타내지 않았는데 (Table 2) 이러한 결과는 미세수정시 수반되는 난자의 활성화 (Edwards, 1995; Diana and Matthews, 1995) 등 미세수정에 의한 효과도 있을 수 있지만, 이러한 효과가 제대혈청의 사용시에만 특이적으로 나타난다는 것은 역설적으로 난자의 체외배양조건에 결정적인 역할을 하는 단백질원으로서 제대혈청이 난포액에 비해 불안정하다는 해석이 가능하다. 임신유지에 있어서도 제대혈청에 비해 난포액은 탁월한 효과를 나타내었는데, 이러한 결과는 난자의 체외배양시 첨가된 난포액이 이들 난자의 발달능을 증진시켜 이식 후 착상까지의 발달을 향상시킨다는 가능성과 동시에 수정란 이식시 자궁내에 함께 유입되는 난포액이 자궁내막의 기능을 활성화시켜 수정란의 착상 및 착상 이후의 발달에 영향을 미칠 수 있다는 가능성으로 해석하고자 한다.

결 론

본 연구는 이전의 예비실험 I, II를 통해 확인된 난포액의 단백질원으로서의 적합성을 바탕으로 직접 생식보조기술의 단백질원으로서 사용하였을 때, 임신율의 향상에 미치는 영향을 조사함으로써 제대혈청에 대한 난포액의 대체효율성을 확인하고자 수행하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 제대혈청 첨가군에서 총 69예중 21예에서 임신이 확인됨으로써 30.4%의 임신율을 나타낸 반면, 난포액 첨가군에서는 총 255예중 118예가 임신에 성공함으로써 46.2% ($P < 0.05$)의 임신율을 나타냈다.
2. 미세수정을 이용하였을 경우, 제대혈청 첨가군에서 총 17예중 7예가 임신에 성공함으로써 41.1%의 임신율을 나타낸 반면, 난포액 첨가군에서는 총 61예중 28예에서 임신이 확인됨으로써 45.9%의 임신율을 나타냈다.
3. 제대혈청 첨가군에서 임신이 확인된 21예중

임상적 유산 7예와 자궁외 임신 1예를 제외한 13예가 임신이 유지됨에 따라 61.9%의 임신유지율을 나타낸 반면, 난포액 첨가군에서는 임신이 확인된 118예중 임상적 유산 22예와 자궁외 임신 2예를 제외한 93예에서 임신이 유지됨에 따라 78.8%의 임신유지율을 나타냈다.

이상의 결과를 통해, 우리는 생쥐난자를 이용한 실험을 통해 단백질원으로서 난포액의 이용 가능성 및 적합성을 확인하였고, 이를 바탕으로 난포액을 직접 인간 생식보조기술에 사용하여 제대혈청에 비해 유의하게 높은 임신율 및 임신유지율을 얻음으로써 난포액 이용의 효율성도 확인하였다.

인 용 문 헌

- Amiel ML, Testart J, Benveniste J: Platelet-activating factor is a component of human follicular fluid. *Fertil Steril* 1991, 56, 62-65.
- Bongso A, Ng SC, Sathanathan H, Ng PL, Rauffr M, Ratnam SS: Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 1989, 4, 706-713.
- Caro CM, Trounson A: The effect of protein on preimplantation mouse embryos development in vitro. *JIVET* 1984, 1, 183-188.
- Cha KY, Do BR, Chi HJ, Yoon TK, Choi DH, Koo JJ, Ko JJ: Viability of human follicular oocytes collected from unstimulated ovaries and matured and fertilized in vitro. *Reprod Fertil Dev* 1992, 4, 695-701.
- Dianna P, Matthews CD: Intra cytoplasmic sperm injection-clinical results from the reproductive medicine unit, adelaide. *Reprod Fertil Dev* 1995, 7, 219-227.
- Earp S, Huckle W, Raymond V, Petch L, Marts S, Bishop W, McCune B: The epidermal growth factor receptor: control of synthesis and signaling function. In: Schomberg D, ed. *Growth Factors in Reproduction*. New York: Springer-Verlag; PP. 3-22.
- Edwards RG: Cell cycle factors in the human oocyte and the intracytoplasmic injection of spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1995, 7, 143-153.

- Fakih H, Vijayakumar R: Improved pregnancy rates and outcome with gamete intrafallopian transfer when follicular fluid is used as a sperm capacitation and gamete transfer medium. *Fertil Steril* 1990, 53, 515-520.
- Fluker MR, Zouves CG, Bebbigton MW: A prospective randomized comparison of zygote intrafallopian transfer and in vitro fertilization-embryo transfer for nontubal factor infertility. *Fertil Steril* 1993, 60-3, 515-519.
- Frederick JL, Balmaceda JP, Teri Ord, Asch RH, Stone SC: Frozen zygote intrafallopian transfer: a successful approach for transfer of cryopreserved embryos. *Fertil Steril* 1994, 61-3, 504-507.
- Guianaroli L, Seracchioli R, Ferraretti AP, Trouson A, Flamigni C, Bovicelli L: The successful use of human amniotic fluid for mouse embryo culture and human in vitro fertilization, embryo culture, and transfer. *Fertil Steril* 1986, 46, 907-913.
- Ham RG: An improved nutrient solution for diploid chinese hamster and human cell lines. *Exp Cell Res* 1963, 29, 515-521.
- Holst N, Bertheussen K, Forsdahl F, Hakonsen M, Hansen LJ, Nielsen HI: Optimization and simplification of culture conditions in human in vitro fertilization(IVF) and preembryo replacement by serum-free media. *JIVET* 1990, 7, 47-55.
- Jayot S, Parneix I, Verdaguer S, Discamps G, Audibert A, Empeire JC: Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation. *Fertil Steril* 1995, 63-1m, 109-114.
- Khan I, Staessen C, Devroey P, Van Steirteghem AC: Human serum albumin versus serum: a comparative study on embryo transfer medium. *Fertil Steril* 1991, 56, 98-103.
- Menezo YJR, Testart J, Perrone D: Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo culture, and transfer. *Fertil Steril* 1984, 42, 750-754. Michelle P, Antoine JM, Alvarez S, Firmin C, Pfister A, Mandelbaum J, Junca AM, Baroux JS: Granulosa cells improve human embryo development in vitro. *Hum Reprod* 1993, 8-12, 2133-2140.
- Patton PE, Sttoelk EM: Difficult embryo transfer managed with a coaxial catheter system. *Fertil Steril* 1993, 60-1, 182-183.
- Quinn P, Kerin JF, Warnes GM: Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 1985, 44, 493-498.
- Ralt D, Godenberg M, Fetterolf P, Thompson D, Dor J, Mashlach S: Sperm attraction to a follicular factors correlates with human egg fertilizability. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 88, 2840-2844.
- Revelli A, Piffaretti-Yanez A, La Sala GB, Masobrio M, Gallicchio D, Balerna M, Modotti M: Effect of peritoneal fluid, follicular fluid, and their volumetric mixture on acrosomal reactivity in vitro. *Fertil Steril* 1995, 63-1, 200-203.
- Sakkas D, Jaquenoud N, Leppens G, Campana A: Comparison of results after in vitro fertilized human embryos are cultured in routine medium and din coculture on vero cells: a randomized study. *Fertil Steril* 1994, 61-3, 521-525.
- Seppala M, Wahlstrom T, Koskimies AI, Tenhunen A, Rutanan EM, Koistinen R, Huhtaniemi I, Bohn H, Stenman UH: Human preovulatory follicular fluid, luteinized cells of hyperstimulated preovulatory follicles and corpus luteum contain placental protein 12. *J Clin Endocrino Metab* 1984, 58, 505-510.
- Wiemer KE, Cohen J, Wiker SR, Malter HE, Wright G, Godke RA: Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989, 52, 503-508.
- Yeung WSB, Ho PC, Lau EYL, Chan STH: Improved development of human embryos in vitro by a human oviductal cell co-culture system. *Hum Reprod* 1992, 7, 1144-1149.
- 윤혜균, 윤산현, 임진호, 이훈택, 정길생. 난포액이 생쥐 및 인간수정란의 체외발생에 미치는 영향. *한국가축번식학회지* 1994, 18-1, 71-81.