

# 마우스 卵子の 體外受精에 關한 研究

서울大學校 醫科大學 産婦人科學教室

林龍澤 · 崔勝憲 · 金貞求 · 文信容 · 李珍鏞 · 張潤錫

-Abstracts-

## Mouse In Vitro Fertilization

Y.T. Lim, S.H. Choi, J.G. Kim, S.Y. Moon, J.Y. Lee, Y.S. Chang

*Department of Obstetrics & Gynecology, College of Medicine,  
Seoul National University*

The success of human in vitro fertilization (IVF) & embryo transfer (ET) has focused attention on the culture conditions that can provide optimal development of the pre-implantation embryo.

Studies of in vitro fertilization using mouse have direct implications to human IVF, since similar conditions are used for both species. Mouse IVF as a quality control system for human IVF & ET was studied since Feb., 1984.

The results were as follows:

1. Egg retrieval following superovulation in ICR mice was  $15.1 \pm 5.3$  eggs ovulated/mouse (Mean  $\pm$  S.D.)
2. In vitro cleavage rate was 61.7% (1146 eggs cleaved/1858 eggs inseminated) and % blastocyst was 42.6%.
3. In comparison with two media of Ham's F-10 and m-KRB, in vitro cleavage rate were 40.9%/63.1% and % blastocyst were 44.3%/61.2% ( $P < 0.05$ ).
4. It was concluded that mouse IVF system has a valuable place in human IVF & ET as a quality-control system and in human reproductive physiology as a research model.

### I. 緒 論

1965년에 Brinster & Biggers<sup>1)</sup>가 마우스 卵자를 利用한 體外受精에 對해 發表한 以來로 1968년에는 Whittingham<sup>2)</sup>이, 1969년에는 Iwamatsu & Chang<sup>3)</sup> 등의 많은 研究者들 에 依해서 報告된 바 있으며 mammalian embryogenesis의 基本的인 研究모델로 着床前의 마우스 胚兒에 關한 研究는 繼續되어 왔다.

1978년에 人間的 體外受精 및 胚兒의 子宮 內 移植에 依한 試驗管 애기의 誕生으로 産婦

人科學 領域에서의 基礎生殖生理學에 對한 研究 는 刮目할 만한 發展이 있었다.<sup>4)</sup>

이에 서울大學校 醫科大學 産婦人科學 教室에 서는 1984年 2月부터 試驗管애기 프로그램을 始作하면서, 人間的 體外受精 및 胚兒移植에 使用되는 培養液 및 添加物에 對한 quality-control 方法으로 마우스의 體外受精시스템을 利用한 batchtest로서의 有用性을 檢討하고 報告者에 따라 큰 差異가 있는 受精成功率를 調査함과 同時에 本教室의 마우스 體外受精시스템에 對한 標準 實驗方法을 確立하기 爲하여 本 研究를 實施하였다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗動物 및 培養液

實驗動物로는 ICR 系의 成熟한 마우스로 암컷은 生後 6~8 週된 것을 使用하였으며 수컷은 本 實驗에서 生殖力이 證明된 生後 3~6 個月된 마우스를 使用하였다. 培養液은 Ham's F-10(Gibco)에 2.5 mg/% Ca lactate, 100 IU penicillin/ml, 100 IU streptomycin/ml 및 Human Fetal Cord Serum (FCS)은 受精時에 7.5%, 胚兒培養時에는 15%의 濃度로 添加하여 썼으며 m-KRB 培養液은 Toyoda & Chang(1974年)의 方式대로 99.6 mM NaCl, 4.78 mM KCl, 1.71 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.19 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.19 mM MgSO<sub>4</sub>, 25.07 mM NaHCO<sub>3</sub>, 21.58 mM Na lactate, 0.5 mM Na pyruvate, 5.56 mM glucose, 4 mg BSA/ml, 50 IU penicillin/ml 및 50 mg streptomycin/ml의 濃度로 調製하여 pH는 7.3, osmolarity는 280 mOsm에 맞춘 後 37°C의 5% CO<sub>2</sub> in air 狀態로 每實驗 前日에 14~16 時間 동안 培養器內에서 equilibration시킨 後에 實驗에 使用하였다.

### 2. 過排卵處理(Superovulation)

PM SG (Sigma)와 HCG (Serono)를 5 IU씩 48 時間 間隔을 두어 암컷 마우스의 腹腔內에 干後 6 時에 注射하였다.

### 3. 卵子獲得(Oocyte retrieval)

HCG 5 IU 腹腔內 注射 16~18 時間 以後에 마우스의 頸椎腔을 轉位시킨 다음에 開腹하여 卵管의 膨大部를 切除하여 卵子-卵丘細胞複合體(oocyte-cumulus mass)를 受精培養液에 옮겼다.

### 4. 精蟲準備(Sperm preparation)

成熟한 수컷을 같은 方法으로 屠殺하여 副辜丸 末端部를 解剖用 立體顯微鏡 下에서 脂肪組織과 血塊를 除去한 後, 잘게 썰어 培養器內에 1 時間동안 放置하여 생긴 上層液으로 精蟲의

數 및 運動性 등을 檢査하여 活動性 精蟲의 濃度가  $1.0 \times 10^6$  이 되도록 하여 0.1 cc를 受精時 使用하였다.

### 5. 受精(Insemination)

$1.0 \times 10^5$  motile sperm/ml의 濃度로 準備된 精液을 卵子-卵丘細胞複合體에 點滴시킨 後, 4 時間 以後에 成長培養液으로 옮겼다.

### 6. 觀 察

受精시킨 後 24 時間, 48 時間 및 72 時間에 phase-contract stereomicroscope 下에서 肉眼으로 2 細胞期, 4 細胞期, 8 細胞期와 桑實期, 胞胚期 胚兒의 分布를 算定하였다. 均一하게 對稱性으로 分割된 것을 受精된 것으로 看做하였다.

## III. 實驗成績

1984年 2 月부터 2 週에 1 回씩 都合 14 回에 걸쳐서 마우스 卵子를 利用한 體外受精에 關한 實驗을 實施하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

### 1. 마우스 卵子獲得

每回 實驗에서 ICR 系 암컷 7~12 마리와 수컷 2 마리를 使用하여 14 回의 實驗에서 155 마리를 利用하였다. 各各의 實驗에서의 마우스 卵子獲得數는  $12.4 \pm 4.9 \sim 18.3 \pm 6.3$  으로 平均은  $15.1 \pm 5.3$  이었다(表 1 參照).

### 2. In vitro cleavage rate

마우스 卵子의 受精 48 時間 後의 觀察에서 2 細胞期에 到達한 數는 各各의 實驗에서 41.5~77.7%였으며 本實驗의 in vitro cleavage rate는 1858 個의 獲得卵子中 1146 個가 2 細胞期에 到達함으로써 61.7%였다(表 2 參照).

### 3. 胞胚期 胚兒 到達率(%Blastocyst)

1146 個의 2 細胞期 마우스의 胚兒中 受精

Table 1. Egg Retrieval

Experiment No.	No. of animals	Mean No. of eggs/mouse*
1	12	16.1 ± 5.0
2	11	17.7 ± 7.3
3	12	15.0 ± 7.8
4	12	14.3 ± 5.1
5	12	18.3 ± 6.3
6	12	11.8 ± 2.9
7	12	16.0 ± 6.8
8	7	12.4 ± 4.9
9	8	10.4 ± 2.2
10	8	14.9 ± 7.3
11	7	15.1 ± 3.3
12	10	17.0 ± 3.1
Total	123	15.1 ± 5.3

\* Mean ± S.D.

72時間 後에 胞胚期에 到達한 것은 42.6%이었으며 24時間 後의 觀察에서는 變性胚兒, 2細胞期, 4細胞期, 8細胞期 胚兒의 分布가 各各 1.4%, 29.1%, 23.4% 및 46.1%로 나타났으며 48時間 後의 觀察에서는 變性胚兒, 2細胞期, 4細胞期, 8細胞期, 桑實期 및 胞胚期 胚兒의 分布가 3.8%, 7.9%, 10.8%, 26.9%, 42.8% 및 7.8%였고 72時間 後의 觀察에서는 各各 16.4%, 4.9%, 5.2%, 13.3%, 17.6%, 42.6%로 이 中 72時間의 觀察에서 2~4細胞期로 觀察된 胚兒들은 2-cell

Table 2. Development of Two-Cell Stages from Mouse IVF by 48 hours

Experiments No.	No. of animals	Total eggs cleaved (%) Total eggs inseminated
1	12	117/193(60.6)
2	11	109/195(55.9)
3	12	120/180(66.7)
4	12	71/171(41.5)
5	12	171/220(77.7)
6	12	89/142(62.7)
7	12	92/192(47.9)
8	7	56/ 87(64.4)
9	8	58/ 83(69.9)
10	8	82/119(68.9)
11	7	80/106(75.5)
12	10	101/170(59.4)
Total	123	1146/1858(61.7)

및 4-cell arrest를 意味하는 것으로 判斷된다(表 3 參照).

## 4. 培養液의 種類에 따른 比較

上記 實驗과는 別途로 Ham's F-10 및 m-KRB 培養液을 利用하여 各各 16마리의 마우스에서 實驗한 結果, 受精 48時間 後에 2細胞期에 이른 胚兒의 分布는 Ham's F-10 使用群이 149個의 마우스 卵子中 61個가 2細胞

Table 3. Sequential Pattern of Cleavage from Mouse IVF by 72 hours

Time in Culture (hours)	% Embryos *					
	Degenerated	2-Cell	4-Cell	8-Cell	Morula	Blastocyst
24	1.4	29.1	23.4	23.4		
48	3.8	7.9	10.8	10.8	42.8	7.8
72	16.4	4.9	5.2	5.2	17.6	42.6

\* The percentage was based on culture of 1146 two-cell embryos.

胞期에 到達하여 40.9%이었으며 m-KRB 使用群은 160개의 마우스 卵子中 101개가 2細胞期에 이르러 63.1%의 in vitro cleavage rate를 나타내어 統計적으로 有意한 差異 ( $P < 0.05$ )가 있었다 (表 4 參照). 各各의 境遇

에서 觀察時間에 따른 胚兒의 分布는 表 5 및 表 6과 같으며, 受精 72時間 後에 胞胚期까지 到達한 것은 Ham's F-10 使用群이 44.3%, m-KRB 使用群에서는 61.2%로 判明되었다.

Table 4. Development of Two-Cell Stages from Mouse IVF by 48 hours : Comparison of Two Media

Medium	No. of animals	No. of two-cell stage* (%)	
		Total eggs	
Ham's F-10	16	61/149(40.9)	
m-KRB	16	101/160(63.1)	

\*  $P < 0.05$

#### IV. 考 案

性腺刺戟호르몬에 의한 過排卵 誘發率은 여러 가지 因子에 의해 影響을 받는데 같은 strain의 마우스에 同時에 同量의 PMSG를 注射한 境遇에도 排卵되는 卵子의 個數는 0~90 個로 極甚한 差異가 있다.<sup>5)</sup> 마우스의 strain에 따른 差異도 顯著한데 Ackerman 等<sup>5)</sup>은 CD-1의 境遇 마우스 卵子獲得이  $24.2 \pm 5.1$  個, CB6F<sub>1</sub>은  $33.0 \pm 5.8$  個이었으며 B6CBAF<sub>1</sub>은  $16.3 \pm 6.6$  個로 相當히 낮았다. 著者들의 實驗에서는 마우스 1 마리當  $10.4 \pm 2.2 \sim 18.3$

Table 5. Development of Embryos from Two-Cell Stages during Culture with Ham's F-10

Time in culture (hours)	% Embryos *					
	Degenerated	2-Cell	4-Cell	8-Cell	Morula	Blastocyst
24	1.6	37.6	26.2	34.6	-	-
48	7.8	2.3	4.7	36.2	36.3	12.7
72	17.3	-	-	26.3	12.1	44.3

\* The percentage was based on culture of 61 embryos.

Table 6. Development of Embryos from Two-Cell Stages during Culture with m-KRB

Time in culture (hours)	% Embryos *					
	Degenerated	2-Cell	4-Cell	8-Cell	Morula	Blastocyst
24	1.1	54.9	33.2	10.8	-	-
28	6.4	7.2	4.9	23.4	54.7	3.4
72	9.8	-	-	7.8	21.2	61.2

\* The percentage was based on culture of 101 embryos.

± 6.3 個로 平均은 15.1 ± 5.3 個로 Laufer 等<sup>6)</sup>의 26.4 ± 4.1 個 및 Collins 等<sup>7)</sup>의 26.7 ± 2.1 ~ 45.8 ± 5.5 個보다 낮았다.

Ackerman 等<sup>5)</sup>은 實際에 있어서 培養容器 內에 넣은 卵丘細胞 속에 쌓인 卵자의 數를 正確히 算定하는 데에는 難點이 많아 어느 程度의 誤差는 있기 마련이라고 하였다.

또한 마우스 卵자가 2細胞期에 到達하는 *in vitro cleavage rate*를 서로 比較하기에는 使用되는 實驗動物의 strain, 年齡, 排卵誘導 方法, 卵자의 獲得部位, 精蟲의 獲得方法 및 *capacitation* 時의 狀態 即 培養液의 諸條件, *capacitation* 時期, 卵丘細胞의 存在與否 및 副辜丸液의 存在與否 等에 左右되며 受精時의 培養液의 種類, 精蟲의 濃度, 點滴量 및 精蟲에 卵자가 露出되는 時間 等에 影響을 받으므로 困難한 點이 많다. 또한 이러한 比較에는 遺傳的인 面, 胚兒培養 以前의 實驗을 爲한 前處置 및 生理學的인 可變因子 等에 依해서도 影響을 받는다.

특히 strain의 差異에 따라 精蟲의 受精能力, sperm-egg interaction 및 卵자의 受精能力에 影響을 줄 수 있으며 sperm penetration *in vitro*의 時期에 따라 受精過程 및 *in vitro cleavage rate*의 顯著한 差異가 있을 수 있다.<sup>4)</sup> Niwa 等<sup>8)</sup>은 分割에 所要되는 時間이 짧을수록 胞胚期 胚兒로 짧은 時間 內에 到達하게 된다고 하였다.

Spindle 等<sup>9)</sup>은 PMSG의 用量에 따른 2細胞期 胚兒의 獲得率에 관한 *in vivo fertilization* 研究에서 5 IU를 注射한 境遇가 29.8 ± 3.3 個로 가장 높았으며 1.25 IU를 注射한 境遇에는 8.3 ± 0.9 個로 自然排卵群보다도 낮았다고 하였다. 또한 HCG의 注射用量에 따른 變化는 1.25 IU의 PMSG 投與時에만 HCG의 用量과 相關關係가 있다고 하였다. 年齡에 따른 影響은 12 ~ 16 個月된 마우스群과 2 ~ 4 個月된 對照群과의 卵자獲得率을 Collins 等<sup>7)</sup>이 比較하였는데 12 ~ 16 個月된 마우스는 7.7 ± 1.4 ~ 13.3 ± 2.4 個인 反面 2 ~ 4 個月된 마우스는 26.7 ± 2.1 ~ 45.8 ± 5.5 個로 統計的으로 有意한 差異가 있었다. 受精에 必要한

精蟲의 濃度는 Tsunoda and Chang<sup>10) 11)</sup>에 依하면  $1.0 \sim 6.3 \times 10^5$  spermatozoa/ml인 境遇에 60% 以上の 受精率을 나타내어 卵子當 100 ~ 840 spermatozoa가 必要하다고 하였는데 本實驗에서는  $1.0 \times 10^5$  motile sperm/ml로 맞추어서 體外受精시켰다.

2細胞期에 이른 마우스 受精卵이 胞胚期 胚兒에 到達하는 데는 에너지源과 培養液內의 pH의 相互作用이 重要한데 例를 들면 pH의 低下는 卵子發達에 必要한 에너지源이 되는 pyruvate의 適正濃度의 減少를 招來하게 되며 Hoppe 等<sup>12)</sup>은 마우스卵자의 培養에 適切한 pH는 7.3 ~ 8.0이며 osmolarity는 250 ~ 280 mOsm이라고 하였다.

實際에 있어서 受精與否를 決定하는 方法으로는 마우스接合子로부터 桑實期 或은 胞胚期에 이르는 發達過程을 觀察하거나 卵管內에서 體內受精되어 發達하는 正常的인 胚兒와 견줄 수 있을 程度로 經時的인 觀察時에 卵자가 均一하게 對稱性 分割球로 形成되는 가를 보는 方法, 螢光染色法에 依한 viability를 보는 方法 및 體外受精으로 發生한 胚兒를 foster-mother에 移植하여 發育의 正常性을 觀察하는 方法이 있지만 本研究에서는 많은 境遇에서 2個의 前核 및 極體를 觀察할 수 있었지만 모든 例에서 確認할 수는 없기 때문에 受精 72時間 後까지에 걸쳐 受精卵이 桑實期 或은 胞胚期에 이르는 成長을 受精의 基準으로 擇하였다.

Quinn 等<sup>13)</sup>은 精蟲에 依한 卵자의 透明帶通過 (zona penetration) 與否, 前核의 存在與否, 極體의 存在有無 및 精蟲頭部の 膨脹, 卵黃囊內의 精蟲頭部の 存在 與否 等을 受精의 證據로 擇할 수도 있지만 이러한 現象들은 受精을 正確하게 反映하는 것은 아니라고 하였다.

Hoppe 等<sup>12)</sup>은 受精의 證據로 396 個의 卵子中 365 個(95%)가 分割되어 이中 95%가 接合子로 發達되어 299 個의 胚兒를 foster-mother에 移植하여 111(37%)마리의 마우스가 出生했다고 報告하면서 이렇게 함으로서 parthenogenetic cleavage와 判別할 수 있다고 하였다.

마우스 卵자를 體外受精시킨 後에 48時間의

觀察期間에 2細胞期로 正常的인 分割을 한 마우스 卵子的 比率는 61.7%였는데 이는 Ackerman等<sup>5)</sup>의 26.0%, ~66.9%의 成績中 m-KRB培養液을 利用한 68.4% 및 66.9% 보다는 낮았으나 Ham's F-10培養液을 利用한 26.0%, 36.1% 및 47.4% 보다는 좋은 in vitro cleavage rate를 나타내었으며 Hoppe等<sup>12)</sup>의 92% 및 Quinn等<sup>13)</sup>의 70% 이상 보다는 낮았고 Mettler等<sup>14)</sup>의 62.5~65%와 비슷하였다. Laufer等<sup>6)</sup>의 83±17% 보다 낮았지만 初期의 Whittingham<sup>2)</sup>의 20%, Tsunoda & Chang<sup>10)</sup>의 10.4%~40.9%의 成績보다는 좋았다. 2細胞期 胚兒에서 胞胚期에 이르는 比率(% Blactocyst)은 42.6%로 이는 Ackerman等<sup>15)</sup>의 93%, Saito等<sup>16)</sup>의 90.9% 및 Dandekar等<sup>17)</sup>의 43.67~89.67%보다 낮았다.

培養液의 種類에 따른 2細胞期에서 胞胚期 胚兒에 이르는 比率는 Ham's F-10 使用群이 44.3%로 Ackerman等<sup>5)</sup>의 93% 및 Dorfman等<sup>18)</sup>의 73%보다는 낮았으나 Dandekar等<sup>17)</sup>의 43.67%와는 비슷하였으며 m-KRB 使用群은 61.2%로 Mahony等<sup>19)</sup>의 80% 보다는 낮았지만 이들은 in vivo system을 利用하였으므로 差異가 난 것으로 判斷된다. Ackerman等<sup>15)</sup>은 72時間의 培養에서 桑實期 및 胞胚期에 이르는 比率이 75% 以下인 境遇가 Ham's F-10 使用群은 24.1%, m-KRB 使用群은 9.5%였다고 發表하였다. 또한 이들은 培養容器 및 培養液에 따른 in vitro cleavage rate의 比較에서 m-KRB & dish 使用群은 24.6%로 가장 낮았으며 Ham's F-10 & dish 使用群은 28.4%로 著者들의 63.1% 및 40.9%보다 낮았다. 이들에 의하면 m-KRB & tube 使用群이 44.8%로 가장 좋은 in vitro cleavage rate를 나타내었다.

Quinn等<sup>13)</sup>은 人間的 體外受精 및 胚兒移植術을 實施하면서 마우스 體外受精 시스템을 quality-control 方法으로 흔히 쓰이지 않는 理由로서 이의 重要性을 認知하지 못하거나 마우스受精卵으로부터 좋은 分割成績을 얻기가 힘

들며 이에 對한 適切한 實驗方法이 確立되지 않았기 때문이라고 指摘하면서 그들은 實際에 있어서 마우스 卵子的 培養時 viability를 減少시키는 因子에 對한 改善을 하여도 試驗管애기 프로그램에 依한 임신률과 마우스受精卵을 70% 以上 胞胚期에 이르게 하는 培養液使用과는 相關關係를 發見할 수 없었다고 하였다. 그러나 이들은 5名의 患者에서 連續的으로 兒移植을 實施하여도 임신에 이르지 못하거나 임신율이 低下될 때는 全課程에 걸쳐 檢討를 實施하는 것이 바람직하다고 하였다.

## V. 結 論

1984年 2月부터 서울大學校 醫科大學 産婦人科學教室에서 試驗管애기 프로그램을 始作하면서 이에 對한 quality-control 方法으로 마우스 卵자를 利用한 體外受精에 關한 實驗을 하여 아래와 같은 結果를 얻었다.

1. 마우스當 平均 卵자獲得數는 15.1±5.3 個이었다.

2. 48時間의 生體外 培養結果, 마우스 卵자의 分割率은 61.7%이었으며 72時間의 觀察結果는 42.6%가 胞胚期 胚兒狀態로 移行된 것으로 判明되었다.

3. 2細胞期 胚兒를 Ham's F-10과 m-KRB 培養液을 利用하여 培養한 結果, 各各 40.9% (61/149 卵자) 및 63.1% (101/160 卵자)의 卵자가 2細胞期에 到達했으며 胞胚期에 이르는 比率는 各各 44.3% 및 61.2%였으며 이들 兩培養液 間의 受精 및 分割率은 統計的으로 有意한 差異가 있었다 (P < 0.05).

4. 마우스 卵자를 利用한 體外受精시스템은 人間的 體外受精 및 胚兒移植에 使用되는 培養液 및 培養條件에 對한 quality-control의 方法으로 有用하며 生殖生理學의 基礎研究모델로 適合하다.

## REFERENCES

1. Brinster, R.L., and Biggers, J.D.: *In vitro fertilization of mouse ova within the explanted Fallopian tube. J. Reprod.*

- Fertil. 10: 277, 1965.*
2. Whittingham, D.G.: *Fertilization of mouse eggs in vitro. Nature 220: 592, 1968.*
  3. Iwamatsu, T., and Chang, M.C.: *In vitro fertilization of mouse eggs in the presence of bovine follicular fluid. Nature 224: 919, 1969.*
  4. Mastroianni, L., and Biggers, J.D.: *Fertilization and embryonic development in vitro. Plenum Press, New York, 1981.*
  5. Ackerman, S.B., Swanson, R.J., Adams, P.J., and Wortham, J.E.: *Comparison of strains and culture media used for mouse in vitro fertilization. Gamete Res. 7: 103, 1983.*
  6. Laufer, N., Pratt, B.M., DeCherney, A.H., Naftolin, F., Merino, M., and Market, C.L.: *The in vivo and in vitro effects of clomiphene citrate on ovulation, fertilization, and development of cultured mouse oocytes. Am. J. Obstet. Gynecol. 147: 633, 1983.*
  7. Collins, T.J., Parkening, T.A., and Smith, E.R.: *Plasma and pituitary concentration of LH, FSH, and prolactin in aged super-ovulated C57BL/6, CD-1 and B6D2F<sub>1</sub> mice. Exp. Geront. 15: 209, 1980.*
  8. Niwa, K., Araki, M., and Iritani, A.: *Fertilization in vitro of eggs and first cleavage of embryos in different strains of mice. Biol. Reprod. 22: 1155, 1980.*
  9. Spindle, A.I., and Goldstein, L.S.: *Induced ovulation in mature mice and developmental capacity of the embryos in vitro. J. Reprod. Fertil. 44: 113, 1975.*
  10. Tsunoda, Y., and Chang, M.C.: *In vitro fertilization of rat and mouse eggs by ejaculated sperm and the effect of energy sources on in vitro fertilization of rat eggs. J. Exp. Zool. 193: 79, 1975.*
  11. Tsunoda, Y., and Chang, M.C.: *Penetration of mouse eggs in vitro: optimal sperm concentration and minimal number of spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 44: 139, 1975.*
  12. Hoppe, P.C., and Pitts, S.: *Fertilization in vitro and development of mouse ova. Biol. Reprod. 8: 420, 1973.*
  13. Quinn, P., Warnes, G.M., Kerin, J.F., and Kirby, C.: *Culture factors in relation to the success of human in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil. Steril. 41: 202, 1984.*
  14. Mettler, L., Seki, M., Bankloh, V., and Semm, K.: *Different factors influencing mice in vitro fertilization. Infertility 3: 217, 1980.*
  15. Ackerman, S.B., Stokes, C.K., Swanson, R.J., Acosta, A.A., Veeck, L.L., Whitfield, M.M., and Perry, D.O.: *Quality control testing for human in vitro fertilization using a mouse embryo culture system. Fertil. Steril. 41: 12S (abstracts), 1984.*
  16. Saito, H., Berger, T., Mishell, D.R., and Marrs, R.P.: *The effect of serum fractions on embryo growth. Fertil. Steril. 41: 761, 1984.*
  17. Dandekar, P.V., Spindle, A.I., Martin, M.C., and Gease, R.H.: *Development of mouse embryos in five different media. Fertil. Steril. 41: 61S (abstracts), 1984.*
  18. Dorfman, A., Stillman, R.J., Littman, B.A., and Schulman, J.D.: *Mouse embryo culture in evaluation of media and condition for human IVF. Fertil. Steril. 41: 61S (abstracts), 1984.*
  19. Mahony, M.C., Wortham, J.E., Bundren, J., and Witmyer, J.: *Evaluation of human fetal cord sera, Ham's F-10 medium, and in vitro culture materials using a mouse in vivo fertilization system. Fertil. Steril. 41: 62S (abstracts), 1984.*