大韓不姙學會雜誌 : 第18卷 第2號 1991
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 18, No. 2, 1991, 12

인간 양수에 의한 생쥐 전핵기 1-세포배의 체외발생 촉진효과에 관한 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

정구민 · 문신용 · 이진용 · 장윤석

A Study on in Vitro Developmental Promoting Effect of Pronucleate 1-Cell Mouse Embryos by Human Amniotic Fluid

Ku Min Chung, Ph.D., Shin Yong Moon, M.D., Jin Yong Lee, M.D. and Yoon Seok Chang, M.D.

Department of Obstretrics and Gynecology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

=Abstract=

The purpose of this study was to evaluate the in vitro developmental promoting effect of human amniotic fluid (AF) on pronucleate 1-cell mouse embryos. The AF was obtained from five patients undergoing amniocentesis for the routine diagnosis of fetal abnormality. The supernatant was filtered (0.22 μm) after centrifugation and stored at -20℃. One-cell embryos were cultured in four study groups (10% AF, 0.4% BSA, 10% AF+0.4% BSA & no-supplement in Ham's F10) for 6 days (EXP. 1). Significantly more embryos hatched in 10% AF ($P<0.01$), although no difference was found among other three groups. The embryos were also cultured in varous concentration of AF (0, 10, 50 & 100%) for 7 days (EXP. 2). The rate of hatched blastocysts was significantly higher in 10%- and 50%- group than in 0%- and 100%- one at day 6 ($P<0.05$) and day 7 ($P<0.005$), although no difference was found between 10%- and 50%- group.

서 론

인간을 비롯한 포유동물 배아의 체외배양은 생명체의 초기발생과정을 인위적으로 조절함으로써 불임부부에게 임신의 기회를 높여 주고, 유전적인 배경이 우수한 동물의 증식을 촉진하고 있다. 아울러 이 기법은 수정을 전후한 초기발생 메카니즘의 규명과 그 응용에 훌륭한 수단이 되고 있다.

배아의 체외배양은 배양기기와 배양액 및 그 첨가제의 3박자가 배아의 생리에 적합할 때 비로서 가능하다. 배양기기는 배양기의 온도, 습도 및 가스분압, 그리고 배양용기의 무독성과 안정성이 배아의 발생생리에 적합하여야 한다. 배양액은 물과 각종 무기이온 및 에너지원으로 구성되므로, 물의 순수도 (Whittingham, 1971 ; Fukuda et al., 1987 ; 정, 1990)와 각 이온의 종류 (Whitten, 1957b ; Biggers et al., 1971 ; Quinn et al., 1985a)와 혼합비율 (Wale et al., 1970 ; Fishel, 1980) 그리고 용액의 생리적 조건 즉, 수소이온농도 (Bavister, 1965a ; Davidson et al., 1988)와 삼투압 (Brinster, 1965a ; Naglee et al., 1969)이 배아의 발생생리에 적합하여야 한다. 특히 수소이온농도는 배양액의 완충제와 에너지 및 배양기의 CO_2농도간에 상호효과를 고려하여야 한다 (Quinn & Wales. 1973 ; Mabadevan, 1986 ; Carny & Bavister, 1986 ; Minhas et al., 1989).

첨가제는 배양액에 첨가되는 체액 (body fluids) 또는 그 정제물 (purified materials)로써 성장촉진인자 또는 미지인자의 주요 공급원이며 (McKeehan et al., 1981 ; Ogawa et al., 1987), 체외에서 배아의 생리적기능을 잘 유지할 수 있도록 배양환경을 개선시켜 주는 효과도 있다 (Cholewa & Whitten, 1970 ; Choi et al., 1987 ;

Kane, 1988 ; 정, 1991). 배양액에 사용해 온 체액은 혈청이 그 대표적이다. 혈청은 난자(oocyte)의 체외성숙(Brackett et al., 1982)과 수정(Choi et al., 1987) 및 상실배와 배반포의 발생(Steptoe et al., 1971 ; Wright et al., 1976)에 성공적으로 사용되어 왔지만, 초기배의 배양에서 유해효과(harmful effect)가 있음이 보고되고 있다(Caro & Trounson, 1984 ; Ogawa et al., 1987 ; 정, 1990 ; 정과 임, 1991). 또한 혈청은 batch-to-batch variation이 심한 것으로 알려져 있다(Condon-Mahony et al., 1985 ; 문 등, 1989). 혈청의 이러한 문제점을 극복하기 위하여 각종 정제물이 이용되고 있다. 그 대표적인 것이 혈청으로부터 정제된 알부민이다. 이 알부민은 초기배의 체외배양에 매우 성공적으로 이용되어 왔다(Quinn & Whittingham, 1982 ; Menezo et al., 1984 ; Kane, 1985). 반면에 알부민은 난자의 체외성숙(정, 1990)과 부화배반포의 발달에는 혈청보다 그 효과가 미약하다. 또한 최근에는 혈액으로부터 정제된 각종 성장인자가 배아의 발생에 미치는 효과에 관하여 연구가 진행되고 있다.

이와 같이 혈액과 관련된 첨가제의 효과에 관하여 많은 연구가 진행되어 왔지만, 기타 난관액, 자궁액(Menino, 1988) 및 복강액(Morcos et al., 1985, 김, 1990)이 배아의 발생에 미치는 효과에 관한 연구는 매우 제한되어 있다. 각 체액에 관한 연구의 필요성은 각 체액에 존재하는 특정인자가 배아의 발생생리에 결정적인 영향(critical affection)을 줄 수 있을 뿐 아니라, 이들 인자의 정제는 곧 체외배양의 발전을 초래할 수 있기 때문이다. 이러한 측면에서 양수가 배아의 체외발생에 미치는 효과에 관한 연구보고(Gianaroli et al., 1986)는 매우 제한되어 있다. 양수는 기타 체액보다 그 순수도가 높고, 혈청보다 구성분의 변이가 적으며, 다량의 성장인자가 함유되어 있으므로(Gianaroli등, 1986) 배아의 생리에 가장 적합한 체액이 될 수도 있다. 이러한 관점에서 본 연구는 인간의 양수가 전핵기 1-세포 생쥐배의 체외발생에 미치는 효과를 검토하게 되었다.

재료 및 방법

실험 설계

실험 1은 Ham's F10배양액에 소혈청알부민(0.4%, w/v), 양수(10%, v/v) 또는 두 단백질원을 모두 첨가하여 1-세포배의 체외발생능을 대조군(무첨가군)과 비교하였다(5반복). 실험 2는 양수의 농도(0, 10, 50, 100%)가 1-세포배의 발생능에 미치는 효과를 검토하였다(3반복).

실험 동물

F1(C57BL/6×CBA) hybrid계통의 생쥐(암수)를 자체 생산하여 실험동물로 사용하였다. 생쥐는 온도(22-24℃)와 광량(light : dark=12 : 12)이 자동조절되는 사육실에서 사료와 물을 자유급식 시켰으며, 암컷은 5-6주령, 수컷(교배용)은 10-16주령에 실험에 사용하였다.

과배란유도 및 1-세포배의 준비

Pregnant Mare Serum Gonadotropin(Sigma, Cat. No. G-4877)을 복강주사 후 50시간째 Human Chorionic Gonadotropin(Sigma, Cat. No. CG-2)(HCG)을 역시 복강주사하여 과배란을 유도하였다. HCG주사 후 암수를 짝짓기 시켰으며, 그로부터 20-22시간째 난관으로부터 전핵기 1-세포를 관류하였다. 배아에 부착된 난구세포(cumulus cells)는 0.1%(w/v) hyaluronidase가 함유된 인산완충액(d-PBS+0.1% BSA)에 노출시켜 제거하였다. 그 다음 제2극체와 전핵이 확인된 1-세포배(pronucleate 1-cell embryos)를 선별하여 0.4% BSA가 함유된 d-PBS용액에서 3회 세척후 배양하였다.

양수, 알부민 및 배양액의 준비

서울대학교 병원 산부인과에 태아의 유전병 질환을 검사받기 위해 내원한 임신부(17-18주령, 5명)에서 채취한 양수(amniotic fluid)로부터 양수세포를 원심분리(800 r.p.m., 10 min)에 의해 제거(이 때 양수세포는 염색체 검사를 위해 사용)한 후 남은 상층액의 양수를 본 연구에 이용하였다. 양수액은 채취 후 즉시 4℃에서 냉장보존되었으며, 적어도 4시간 이내에 미세여과기(Acrodisk, Gelman, Product No. 4192, 0.2 um)로 여과한 후 냉동보존(-20℃)하여 1개월 이내에 실험에 이용하였다. Ham's F10 배양액은 IL용 Nutrient Mixture F-10(HAM ; Gibco, Cat. No. 430-1200)분말을 정제수(purified water)(Baxter ; Burick & Jackson, Cat. No.365-4)에 녹여 2.1 g sodium bicarbonate, 0.242 g Ca-lactate 및 항생제를 첨가하여 제조(정, 1990)하였다. 배양액은 생쥐 1-세포배아에 의해 품질검사(정, 1990)를 거쳐 합격된 것을 냉장보존(4

℃)하였으며, 배양액은 14-16시간동안 탄산가스배양기에서 전배양(preincubation)한 후 배아를 배양하였다.

체외배양, 발생관찰 및 결과분석

실험마다 5-8마리 생쥐로부터 회수한 80-120개의 1-세포배를 무작위로 섞어서 각 처리군에 일정수로 배치하였다. 1-세포배는 Organ Tissue Culture Dish (Falcon, Cat. No. 3037)의 inner well에 넣어 탄산가스배양기 (10% CO_2+90% air, 36.5℃, 100% moisture)에서 6-7일간 배양하였다. 이때 배양액은 교환하지 않았다. 발생관찰은 배양 후 4, 5 및 6일 (또는 7일)에 실체현미경 (40-80x)하에서 실시하였다. 결과는 백분율로 표시하였으며, 통계분석은 x^2-test로 실시하였다.

결 과

실험 1 : 생쥐 1-세포배의 체외발생에서 양수, 알부민 및 이들의 상호효과

Ham's F10 배양액에 0.4% 소혈청알부민, 10% 양수 및 이들 두 단백질원을 모두 첨가한 처리군과 대조군(무첨가군)에서 1-세포배를 6일간 체외발생한 결과는 표 1과 같다.

배양 4-일째 발생율(expnaded-& hatching-blastocysts 비율)은 "양수" 첨가한 두 처리군이 "알부민" 단독첨가군과 대조군보다 다소 높았지만 5% 수준에서 통계적 유의성은 없었다. 그러나 배양 5일 째 발생율(Hatching-& hatched blastocysts 비율)은 "양수" 단독첨가군이 다른 세 처리군보다 현저히 높았으며, 이들간에는 통계적인 유의차가 있었다($p<0.01$). 배양 6일째 발생율(hatched & attached blastocysts비율)에 있어서도 배양 5일째와 동일한 결과를 보였다.

그러므로 양수는 알부민보다 생쥐 1-세포배의 체외발생을 더욱 촉진시켰다. 이러한 효과는 배양 4일째까지는 명확하지 않았지만, 부화과정과 그 이후에 명확히 나타났다. 한편, 양수와 알부민을 함께 첨가한 경우에 양수의 성장촉진효과는 나타나지 않았으며, 그 효과는 알부민 단독첨가군에서와 비슷한 경향을 보였다.

실험 2 : 양수의 첨가농도가 전핵기 1-세포배의 체외발생에 미치는 효과

Table 1. Effect of human amniotic fluid, bovine serum albumin and their interaction on the in vitro development of pronucleate 1-cell mouse embryos

Supplements		No. of 1-cell	% Expanded & hatching	% Hatching & hatched	% Blastocysts (Day 6)**	
BSA[1]	AF[2]	embryos cultured*	blastocysts (day 4)*	blastocysts (day 5)**	Hatching -ACD[3]	Hatched -ACD[3]
−	−	108	78.7	68.3[a]	5.0	53.3[c]
+	−	110	75.5	66.7[a]	6.7	45.0[c]
−	+	110	82.7	90.0[b]	10.0	76.7[d]
+	+	105	85.7	73.3[a]	26.7	48.3[c]

*: Five replicates, **: Three of 5 replicates (n=60)
1. Bovine serum albumin (0.4%, w/v), 2. human amniotic fluid (10%, v/v), 3. Attached on culture dish.
a, b : Significant ($p<0.01$), c, d : Significant ($p<0.01$).

Table 2. Effect of amniotic-fluid concentration on the in vitro development of pronucleate 1-cell mouse embryos

Percent of AF added in medium	No. of 1-cell embryos cultured	% Expanded & hatching blastocysts at day 4	% Blastocysts at day 6		% Hatched-ACD blastocysts at day 7 of culture
			Hatching -ACD	Hatched -ACD	
0	52	46 (88.5)	1 (1.9)	12 (23.1)[a]	18 (34.6)[d]
10	51	45 (88.2)	9 (17.6)	22 (43.1)[b]	32 (62.8)[e]
50	51	45 (88.2)	3 (5.9)	29 (56.9)[c]	34 (66.7)[e]
100	50	37 (74.0)	5 (10.0)	9 (18.0)[a]	17 (34.0)[d]

a, b : Significant ($p<0.05$), a, c : Significant ($p<0.001$), d, e : Significant ($p<0.005$).

양수가 배아에 미치는 유해효과(harmful effect)를 판정하기 위해 배양액에 양수를 각각 0, 10, 50 및 100% 첨가하여 1-세포배를 7일간 체외배양한 결과는 표 2와 같다.

배양 4일째 발생율는 0%, 10% 및 50% 첨가군간에 차이를 보이지 않았지만, 100% 첨가군은 다른 세 처리군보다 다소 낮게 나타났다. 이들간에 5% 수준에서 통계적 유의성이 없었다. 그러나 배양 6일째 발생율(hatched blastocysts 비율)은 10%와 50% 첨가군이 0%와 100% 첨가군보다 유의적으로 높은 발생율을 보였다($p<0.05$). 이러한 효과는 배양 7일째 더욱 명확히 나타났다($p<0.005$). 한편 50% 첨가군이 10% 첨가군보다 다소 높은 발생율을 보였지만, 이들간에 5% 수준에서 통계적인 유의성은 없었다. 이러한 경향은 배양 7일째도 거의 비슷하게 나타났다.

이상에서와 같이 양수 단독으로도 배아의 발생을 촉진하는 효과가 있었지만, 양수를 배양액과 혼합해서 사용할 때 그 효과는 더욱 증가하였다.

고 찰

인간의 체외수정 프로그램과 생명공학 프로그램에서는 생쥐 1- 또는 2-세포배를 이용하여 배양시스템의 정도관리를 실시하고 있다(Jones et al., 1982 ; Ackerman et al. 1984 ; Davidson et al., 1988 ; 문 등, 1989 ; 정 등, 1990). 정도관리(*quality control*)를 통하여 배양시스템의 안전성을 확인할 뿐 아니라 최상의 조건하에서 시술을 실시하고 있다. 다른 한편으로는 새로운 배양액을 이용하거나(Menezo et al., 1984), 배양액의 특정이온의 수준에 변화(Quinn et al., 1985)를 주어 임신율을 증가시키거나 시술의 편의성을 제공하고 있다. 또한 배양액에 첨가되는 혈청의 종류(Naz et al., 1986)와 혈청 대신에 알부민으로서의 대체효과(Menezo et al., 1984)에 관해서도 보고되었다. 한편, Gianaroli et al., (1986)은 인간의 양수(aminotic fluid)를 인간의 체외수정에 이용(preliminary study)하여 44% (4/9)의 임신율을 보고하였다(대조군은 17%, 2/12).

이와 같이 인간의 체외수정에서 배양시스템을 개발하기 위한 시도는 끝임없이 계속되고 있다. 배양액에 관한 연구는 혈청의 성분을 기준으로 하여 개발된 기존의 배양액을 난관액의 성분으로 변화시키려는 추세에 있다. 또한 난관상피 세포와의 공배양(co-culture)법도 매우 긍정적인 반응을 받고 있다. 그러나 배양액의 첨가제(medium supplement)에 관해서는 많은 의문이 제기되고 있다. 만약 인간 배아의 대사작용에 필요로 하는 모든 성분을 배양액에 공급할 수 있다면 혈청이나 기타 첨가제는 필요치 않을 것인가? 그리고 유럽지역과 기타 일부 지역에서 혈청 대신에 알부민을 첨가하고 있는 것은 바람직한 것인가? 또한 향후 체외수정된 배아를 배반포(blastocyst)까지 체외에서 발육시켜 이식한다면 알부민이 첨가제로써의 기능을 충분히 수행할 수 있을 것인가? 이러한 의문에 대한 단정적인 해답을 낸다는 것은 너무나 어려운 일이 아닐 수 없다.

이런 현실적인 상황하에서 본 연구를 수행한 결과 양수 또는 양수에 함유된 성분을 체외배양에 효율적으로 이용한다면 앞서 제기된 의문들을 해결할 수 있는 실마리를 찾을 수 있으리라 생각된다. 왜냐하면 양수는 알부민 또는 혈청보다도 체외환경에 매우 민감한 1-세포배를 부화배반포(hatched blastocyst) 또는 그 이후까지 발달(76.7%)을 잘 촉진할 수 있기 때문이다. 이러한 사실은 여러가지 의미를 제공한다.

첫째, 유해효과(harmful effect)의 측면에서 양수는 알부민 또는 혈청보다 안전하다고 볼 수 있다. 양수의 유해효과가 배아의 생리적 장해를 초래하였다면 1-세포배는 초기 분할기에서 발생을 중지하거나 또는 본 연구에서와 같이 높은 비율로 부화배반포까지 발달할 수 없었을 것이다,

초기배에 대한 양수의 유해효과는 알부민 또는 혈청보다 낮다고 생각된다. 본 실험에서 양수첨가군이 알부민 첨가군보다 발생율이 높은 것은 유해효과가 낮은 것과도 연관이 있다고 생각된다. 본 연구자의 다른 실험(정, 1990 ; 정과 임, 1991)에서는 알부민이 인간태아제대혈청 또는 소태아혈청보다 1-세포배에 대한 유해효과가 유의적으로 낮은 결과를 보였으므로, 양수는 인간태아제대혈청 또는 소태아혈청보다도 1-세포배에 대해 유해효과가 작다고 생각된다.

둘째, 성장촉진효과에 있어서도 양수는 알부민보다 더 좋은 반응을 보였다. 본 연구에서 팽윤배반포까지 발생율(배양 4일의 결과)은 양수와 알부민 간에 차이가 없었지만, 그 이후 부화과정에서는 양수가 알부민보다 현저히 높은 발생율을 보였다. 이러한 사실은 양수의 성

장촉진효과와 관련이 있다고 생각된다. 양수의 성장촉진효과가 부화과정에서만 발생을 촉진하였는지 또는 1-세포 또는 그 이후에 발생을 촉진하였기 때문에 부화과정에서 더 좋은 반응을 보였는지는 본 연구결과로써 알 수가 없다.

그러나 초기배의 발생생리적인 측면에서 볼 때 초기 난분할 과정에서 발생이 촉진되지 않으면 부화과정에서 좋은 환경을 부여하여도 발생율은 매우 낮은 것이 본 연구실의 다른 실험에서 나타났다. 그러므로 양수는 초기발생을 촉진할 뿐 아니라 부화과정에서도 발생을 촉진하는 특징을 지니고 있다고 생각된다.

본 연구자의 다른 연구(정과 임, 1991)에서 알부빈은 초기발생 과정을 촉진하지만 부화과정에서는 그 효과가 감소하는 특징이 있다. 한편 혈청은 알부민과는 반대로 초기 난할기에서는 배아의 발생을 억제하는 효과가 있지만 부화과정에서는 발생을 촉진하는 효과가 있었다. 그러나 본 연구에서 양수는 초기 난할기 뿐만 아니라 부화과정에서도 배아의 발생을 촉진하였으므로 알부민과 혈청의 긍정적인 면을 모두 지니고 있다고 생각된다. 이러한 양수의 성장촉진효과가 양수에 함유된 각종 이온 또는 에너지원의 종류와 그 비율이 혈청의 이들 성분과의 차이(Weisberg, 1974)에서 기인하는지, 또는 양수에는 배양액 또는 첨가제(혈청 또는 알부민)에 존재하지 않는 성장촉진인자에 의한 효과인지 알 수가 없다. 이에 관해서는 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

본 연구에서 제시되지 않았지만 양수의 배아 촉진효과에 있어서 양수의 batch-to-batch variation이 있었다. 그 정도는 혈청(문 등, 1989)보다 심각하지는 않았다. 양수간의 이러한 변이가 본 연구에서 양수 처리과정에서 불활성화(inactivation)처리를 생략한데서 기인하였는지는 명확하지 않다.

양수의 농도는 초기배의 발생에 영향을 미쳤다. 10%와 50%에서는 차이를 보이지 않았지만, 100%는 유의적인 감소를 초래하였다. 그러므로 양수를 초기배의 체외배양용으로 사용할 때 배양액과 혼합하여 이용하는 것이 바람직할 것이다. 농도에 따른 이러한 효과는 인간태아제대혈청(정, 1990)만큼은 심각하지 않았다. 마지막으로 본 연구의 일환으로 양수(10%)를 첨가한 Ham's F10 배양액에서 인간의 전핵기 1-세포배(triple pronucleate 1-cell embryos)를 배양한 결과 배반포까지 발생이 가능하였으며, 인간태아제대혈청을 첨가한 배양액에서 성장한 배아보다도 embryo quality가 더욱 좋았다. 이러한 기초 연구자료는 인간의 체외수정에서 양수의 선택적 이용 가능성을 시사하고 있다.

결 론

생쥐 전핵기 1-세포배를 모델로 하여 인간 양수(AF)의 성장촉진효과를 규명하고자 본 연구를 수행한 결과는 다음과 같다.

실험 1에서 Ham's F10 배양액에 첨가된 양수는 1-세포배의 체외발생을 촉진하였다. 이 효과는 배양 4일까지 양수와 다른 처리군간에 5%수준에서 유의차가 없었지만, 배양 5-6일째 부화배반포의 비율에서는 명확히 나타났다. 이 비율은 "10% 양수"(76.6%)가 "0.4% 알부민"(35.0%), "10% 양수+0.4% 알부민"(48.3%) 및 "무"첨가군(53.3%)보다 유의적으로 높았다($p<0.01$). 그러나 배양액에 양수와 알부민을 모두 첨가한 경우 양수의 독특한 성장촉진효과는 나타나지 않았다.

실험 2에서 양수의 첨가농도는 1-세포배의 체외발생에 영향을 미쳤다. 첨가수준을 0, 10, 50 및 100%로 하였을 때 배양 4일째 발생율은 각 처리간에 유의차가 없었지만, 배양 6일째 부화배반포의 비율은 10%와 50% 수준이 다른 수준보다 유의적으로 높았다($p<0.05$). 그러나 10%와 50%간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

결론적으로 인간의 양수는 생쥐 전핵기 1-세포배에 대한 성장촉진효과가 있었지만, 그 효과는 양수를 배양액과 혼합하여 이용할 때 더욱 증가하였다.

인 용 문 헌

김명철 : Hydrogel Chember를 이용한 수정 및 배양. 한국수정란이식연구회지 1990, 5(2), 44-45.

문신용, 신창재, 정구민, 오선경, 방명걸, 장윤석 : 생쥐 2-세포배아에 의한 시험관아기 배양용 태아제대혈청의 질적평가에 관한 연구. 대한불임학회잡지 1989, 16(2), 139-146.

정구민, 문신용, 오선경, 임경순, 장윤석 : 배양액과 첨가제의 효율적인 품질검사에 관한 연구. 한국수정란이식연구회지 1990, 5(1), 28-41.

정구민 : 시험관아기 시술을 위한 배양시스템의 정도관리. Proceeding of The first Annual Review Course on Assisted Reproductive Technology, Seoul, 1990, pp. 52-96.

정구민 : 소와 생쥐 초기 난자의 체외발생능과 초급속동결에 영향하는 생리적, 물리적 요인에 관한 연구. 서울대학교 박사학위논문, 1990.

정구민 : 생쥐 초기배에 대한 일회용주사기의 유독성과 그 개선책. 미출판자료, 1991.

정구민, 임경순 : 체액이 초기배의 발생생리에 미치는 효과에 관한 연구 : Ⅰ. 생쥐 1- 및 2-세포배의 체외발생에서 배양액과 단백질원의 효과. 한국수정란이식연구회지 1991, 6(1), 33-40.

AcKerman SB, Tayer SP, Swanson RJ, Laurell LH : Mouse embryo culture for screening in human fertilization. *Arch Androl* 1984, 12 (Suppl 1), 89-136.

Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DG : The culture of mouse embryos in vitro, In : Daniel JC Jr., eds. Methods in mammalian embryology. San Francisco : Freeman Press, 1971, pp. 86-116.

Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA : Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod* 1982, 27 : 147-158.

Brinster RL : Studies on the development of mouse embryos in vitro Ⅰ. The effect of osmolality and hydrogen ion concentration. *J. Exp Zoll* 1965a, 49-58.

Carney EW, Bavister BD : Increased atmospheric carbon dioxide stimulates hamster embryo development. *Biol Reprod* 1986, 34 (Suppl 1), 199 (abs).

Caro CM, Trounson A : The effect of protein on preimplantation mouse embryo development in vitro. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1984, 1 (3), 183-187.

Choi TS, Mori M, Kohmoto, K, Shoda Y : Beneficial effect of serum on the fertilizablity of mouse oocytes matured in vitro. *J Reprod Fertil* 1987, 565-568.

Cholewa JA, Whittin WK : Development of 2-cell mouse embryos in the absence of a fixed-nitrogen sources. *J Reprod Fertil* 1970, 553.

Condon-Mahony M, Wortham JW Jr, Bundren JC, Witmyer J : Evaluation of human fetal cord sera, Ham's F10 medium and in vitro culture materials with a mouse in vivo fertilization system. 1985, 44 (4), 521-525.

Davidson A, Vermesh M, Lobo RA, Paulson RJ : Mouse embryo culture for human in vitro fertilization : the one-cell versus the two-cell model. *Fertil Steril* 1988, 49 (3), 516-521.

Fukuda A, Noda Y, Tsukui S, Matsumoto H, Yano J, Mori T : Inference of water quality of on in vitro fertilization and embryo development for the mouse. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1987, 4 (1), 40-45.

Gianaroli L, Seracchioli R, Ferraretti AP, Trounson 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, 49 (5), 907-913.

Jones HW Jr, Hones GS, Andrews MC, Acosta A, Bundern C, Garcia J, Sandow B, Veeck L, Wilkes C, Witmyer J, Wortham JE, Wright G : The program for in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 1982, 38, 14.

Kane MT : A low morecular weight extract of bovine serum albumin stimulates rabbit blastocyst cell division and expansion in vitro. *J Reprod Fert* 1985, 73, 147-150.

Kane MT : Regulation of embryonic development by environmental factors. In : Wolf DP, eds. In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. Plenum Press, 1988, pp. 359-387.

Mabadevan MM, Fleetham J, Church RB, Taylor PJ : Growth of mouse embryos in bicarbonate media buffered by carbon dioxide, hepes, or phosphate. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1986, 3 (5), 304-308.

Marcos RN, Gibbons WE, Findley WE : Effect of peritoneal fluid on in vitro cleavage of 2-cell mouse embryos : possible role in infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril* 1985, 44 (5), 678-683.

McKeehan WL, McKeehan KA, Ham RG : The relationship between defined low-morecular weight substances and undefined serum-derived factors C, eds. The Growth Require-

ments of Vertebrate Cells In Vitro, Cambridge Univ Press, 1981, pp, 223-243.

Menezo Y, Testart J, Perrone D : Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo culture and transfer. *Fertil Steril* 1984, 42 (5), 750-755.

Menino AR Jr, O'Claray JL, Henry TE, Cheek HK, Williams JS : Development of mouse embryos in media supplemented with fractionated bovine uterine flushings. *Theriogenology* 1988, 29 (5), 1177-1191.

Minhas BS, Randall GW, Dodson MG, Robertson JL : A limited exposure of murine oocytes and zygotes to phosphate buffered saline retareds development in vitro. *Theriogenology* 1989, 31 (12), 229 (Abst).

Naglee DL, Maurer RR, Foote EH : Effect of osmolarity on in vitro development of rabbit embryos in a chemically defined media. *Exp Cell Res* 58, 331-333.

Naz RK, Janousek JK, Moody T, Stillman RJ : Factors influencing murine embryo assay : effects of proteins, aging of medium and surgical glove coatings. *Fertil Steril* 1986, 46 (5), 914-919.

Ogawa T, Ono T, Marrs RP : The effect of serum fractions on single-cell mouse embryos in vitro. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1987, 4 (3), 153-158.

Quinn P, Wales RG : Growth and metabolism of preimplantation mouse embryos cultured in phosphate-buffered medium. *J Reprod Fertil* 1973, 35, 289-300.

Quinn P, Whittingham DG : Effect of fatty acids on fertilization and development of mouse embryos in vitro. *J Androl* 1982, 3, 440-444.

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.

Steptoe PC, Edwards RG, Purdy JM : Human blastocysts grown in culture. *Nature* (London) 1971, 229, 132-133.

Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA : Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fert* 1972, 30, 493-497.

Wales RG : Effects of ions on the development of the preimplantation mouse embryo in vitro. *Aust J Biol Sci* 1970, 23, 421-429.

Weisberg HF : Clinical chemical analysis of sixty-two aminotic fluids from women in early pregnancy. In : Natelson S, Scommegna A, Epstein MB, eds. Aminotic Fluid Physiology, Biochemistry and Clinical Chemistry, New York, John Wiley & Sons, 1974, p. 48.

Whitten WK : Culture of tubal ova. Nature (London) 1957a, 179, 1081-1082.

Whittingham DG : Culture of mouse ova. *J Reprod Fertil* (Suppl 1) 1971, 14, 7-21.