

冷凍保存精자의 體外受精에 關한 研究

高麗大學校 醫科大學 産婦人科學教室

丘 秉 參

-Abstract-

In Vitro Fertilization and Embryo Development with Human Frozen Semen

Pyong Sahm Ku, M.D., Ph.D.

Department of Obstetrics and Gynecology
Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

In vitro fertilization have been performed to know whether the frozen semen has fertilizing ability and can be used clinically. The results of cultured and developed embryos obtained are as follows:

1. The semen was frozen in three media for the good viability. The viability was more than 50% and the motility was also moderate (grade III).
2. As the 33 oocytes were collected from 45 follicles, the oocyte recovery rate was 73.3%. Among them, mature and immature ova were 5% each, and premature ova were 69.7%.

When the first polar body was appeared, above ova were inseminated after adequate incubation with activated sperms.

3. The main components of three freezing medium containing egg yolk, glycerol and pyruvate respectively were the best for sperm viability, and Ham's F-10 medium was used for the fertilization and culture of eggs.
4. The results of in vitro fertilization of 33 ova, showed the second polar body developed in 12%, polyspermia in 24%, 1-cell embryo in 21% and 2-cell embryo in 9%. One mature ova developed to blastocyst via 16-cell to 32-cell embryo. The fertilization rate was 66%.
5. Above mentioned results represent that the frozen semen has fertilizing ability and can be used practically in the clinic.

*本 論文의 要旨는 1984年 10月 11日 第 54次 (秋季) 大韓産婦人科學會 學術大會 (人間精液凍結保存 human sperm cryopreservation : Sperm Banking에 關한 研究)와 1984年 10月 16日 第 12次 大韓不妊學會 (秋季) 學術大會에서 發表하였음.

I. 緒 論

人間精자의 冷凍保存은 이미 오래전부터 先進國에서 實施하여 왔으며 그의 必要性에 따라 研究와 臨床에 利用하고 있고 豫後의 結果도 報告되어 오고 있다.^{1,2,3,4,5,6,7)}

人間精자의 冷凍保存의 必要性 (適應症)은 오

늘날과 같이 家族計劃을 위하여 實施하는 精管 切除術을 받는 젊은 男性의 精液을 保存할 수 있으며, 精子減少症患者의 精液을 모아 適期에 授精이 可能하며, 無精子症인 配偶者에게 donor semen 을 保管하였다가 授精을 할 수 있으며 遺傳學的으로 좋은 精子를 保管하고, 老年期나 死後에도 父性을 維持한다는 保存의 價値와, 月經周期가 不規則한 女性에게 反復授精이 되고, 精子形成障礙의 損傷(手術)을 받거나, 放射線 照射治療 및 化學療法 등을 받게 되는 사람의 精液을 事前에 保管할 수 있으며, 男便이 長期間 出他中일 때 妊娠을 試圖할 수 있고, 外國에 居住하는 同胞에게 必要時 提供이 可能하다는 等의 利用價値의 多樣성을 들 수 있겠다.

그런데 우리나라의 경우 사람 精子의 保管利用은 아직 正確하고 廣範圍하게 이루어 지지 않고 있는 實情에 있으므로 著者は 臨床醫로서 이의 必要性을 切感하여 精液(子)의 冷凍保管(cryopreservation)을 施行하였으며 이의 活力을 되찾는데 有意한 結果를 얻었다.⁷⁾

그러나 이와같은 保存精子가 果然 受精能力을 갖는지에 關하여서는 直接經驗이 없으므로 이에 對한 實證을 얻고 臨床에서 그 實用性을 얻기 위하여 다음과 같은 試驗管內的 受精을 實施하여 體外受精의 成績을 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方料

本 研究實驗의 資料와 過程은 다음과 같이 要求되었다. 即, 人間精子와 精子의 冷凍保存, 그리고 卵子와 受精에 利用되는 培養液 및 培養方法等이 必須條件이다.

研究 資 料

1. 精液(子)의 選擇 : 20才에서 30才未滿의 健康한 男性으로부터 提供된 精子를 檢査分析하여 正常範圍의 精子所見을 보인 精液(20例)을 液體窒素(liquid nitrogen)內에 冷凍保管(-196°C)하였으며 세가지 冷凍保護液⁷⁾으로 保存된 straw 를 37°C~40°C에서 解水

(thawing)시킨 後 다시 檢査한 結果 生存率은 50%以上, 運動性은 中等度(grade III; average; Table 1⁸⁾) 以上の 比較的 良好한 精液을 選擇하였다.

Table 1. Classification of sperm motility

Grade	Variety of motility
I Poor	: No forward progression (waving)
II Fair	: Slow meandering forward progression
III Average	: More direct but slowish progression
IV Good	: Faster straight line progression
V Excellent	: Straight line, high speed progression

2. 卵子의 採取 : 診斷 및 治療의 目的(diagnostic and therapeutic laparoscopy)이나 開腹手術이 施行되는 被施術者들 中에서 許容된 例를 擇하여 排卵前期에 있는 卵胞에서 吸引器(Aspirator; Rocket of London[®])를 利用하여 卵胞液을 採取한 後 培養顯微鏡(invertoscope)下에서 卵子를 採取하여 準備된 培養液에 分離培養케 하였다.

3. 培養液 : 精液을 解氷시킨 後 運動性을 增進시킬 目的으로 使用될 洗滌液(medium)과

Table 2. The components of culture medium

Component	Amount/liter
CaCl ₂ (anhyd.)	33.29
CuSO ₄ ·5H ₂ O ^a	0.0025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.834
KCl	285.0
KH ₂ PO ₄	83.0
MgSO ₄ (anhyd.)	74.64
NaCl	7400.00
Na ₂ HPO ₄ (anhyd.)	153.7
ZnSO ₄ ·7H ₂ O ^b	0.0288
Other Components:	
Ca-lactate	308.31
D-Glucose	1100.0
Phenol red	1.2
Sodium pyruvate	110.9

* Ham's F-10 (modified).

採卵後 分離培養시키는데 使用되는 培養液은 Ham's F-10(Table 2)을 擇하였으며 여기에 血清(10~20% serum)을 稀釋混合하였다. 本 培養液의 參透壓은 280~285 m Osm/kg 과 pH는 7.2~7.4로 하였으며 培養器로서는 5% CO₂ incubator 를 使用하였다.

實驗 方法

精 子 : 冷凍保管된 精液을 解氷시킨 後 前記한 所見을 갖은 精液을 擇하여 培養液으로 遠心分離(200g, 1000 rpm)를 2回反復한 後 37℃의 CO₂(5%) 培養器(incubator) 內에 20分間 放置後 精子の 運動性이 grade IV~V로 增進케 하였다.

卵 子 : 난자는 前記한 바와 같이 3群으로 나누어 成熟形(mature form)인 것은 5~6時間동안 培養液에 前培養시킨 후 上記와 같이 處理된 精液으로 授精(insemination)시켰으며 精子の 數는 約 50,000~100,000/ml 精子範圍로 調節하였다.

未熟卵(immature) 과 成熟에 가까운 卵子(premature form) 群은 培養液內에 一定時間(24~72時間) 동안 배양시킨 후 第一極體가 나타난 것을 確認한 後 성숙란군에서와 같은 方法으로 授精시켰다.

授精을 시킨 卵子는 37℃의 CO₂ 培養器(5% CO₂ incubator) 內에 두고 每 12~24時間마다 培養實體顯微鏡이나 位相差顯微鏡下에서 觀察하여 精子の 卵子侵入 및 受精(fertilize) 與否를 確認하였다.

Ⅲ. 實驗 成績

精液(子) 所見 :

身體가 健全한 20代 男性으로부터 採取保管되었던 精液의 解氷後 檢査所見은 Table 3에서 보는 바와 같이 全體의 數(total count) 에는 關係없이 保管된 straw(0.5 ml)를 thawing 後 精子の 數는 ml當 4,600萬이었고 運動性(motility)은 50% 以上이었으며, 正常形(normal form)이 65%이었고, 生存率(su-

rival rate)은 50% 이상이었다.

Table 3. Result of post-thawing semen analysis

Result	Range	Mean
Total count (x 10 ⁶)		
Count/ml (x 10 ⁶)	5-7.1	46±4.3
Motility (%)	poor-good	50±8.9 (average)
Normal form (%)	59-78	65±7
Survival rate (%)	20-7.6	50±7.5

n=20 cases.

以上과 같은 所見을 갖은 精液을 培養液에 處理(洗滌)하여 運動性을 높일 수(good or excellent) 있었으며 本 精液으로 授精을 시켰다.

卵子所見 :

卵子の 採取는 腹腔鏡(13例) 및 開腹手術(5例)을 施行하는 例들中 卵胞의 크기(直徑)가 10~25 mm이면 卵胞液을 吸引하였으며 45 卵胞로부터 33 卵子를 採取하여 卵子の 回收率은 73.3%이었고 이들중 成熟形(mature) 과 未熟形(immature)은 各已 5例(15%) 이었고, 成熟前期形(premature)은 69.7 (23例) 이었다(Table 4).

Table 4. Follicular aspiration and collected ova

Findings	Number and range	Collected rate (%)
Follicle:: number	45	
size		
(mm. in diameter)	10-25	
Egg : number	33	73.3
form		
mature	5	15.1
premature	23	69.7
immature	5	15.1

受 精 率 :

受精 및 胚發生(fertilization and embryo development)의 進展을 보면 Table 5에서와 같이 3群으로 나누어진 卵子群에서 未熟卵

Table 5. Result of IVF in freezing and thawing semen.

maturity of ovum	No. of ovum	unfertilized	2nd polar body	poly-spermia	one-cell stage	2-cell stage	8-cell stage	blastocyst
Immature	5	3		2				
Premature	23	6	4	5	7	1	1	(1)
Mature	5	1		1		2		
Total	33	10	4	8	7	3	1	(1)

(immature) 群은 培養한 後 第一極體가 나타나면 授精을 시켰으며 그 結果 多精子(polyspermia) 受精卵이 2 例에서 있었다.

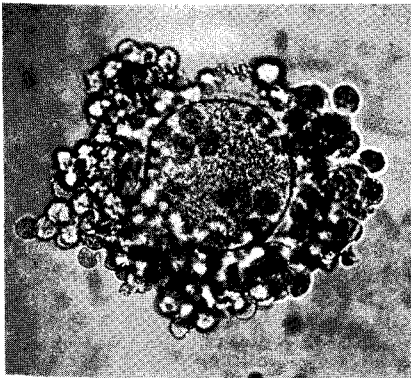


Fig. 1. Fertilized one cell ovum in the cumulus cells (zygote).

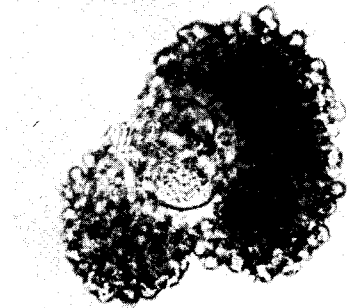


Fig. 2. The cumulus cells surrounded 2-cell embryo.

成熟前 狀態의 卵子 (premature form) 群 23 例에서 授精後 第二極體를 보인 것이 4 例, polyspermia 가 5 例, 1 細胞期 (Fig.1) 가 7 例, 2 細胞期 (Fig.2) 와 8 細胞期 (Fig.3) 가 各各 1 例씩이었다.

成熟卵 (mature form) 群에서는 polyspermia 1 例, 2 細胞期가 2 例, 그리고 2 例中 1 例가 16 細胞期 (Fig.4) 를 지나 胚盤胞 (blastocyst Fig.5,6) 까지 發生形成되어 가는 것을 確認하였다.

따라서 各群에서 未受精卵을 合하면 10 例 (30%) 이며 受精卵은 23 例로서 受精率은 69.7% 이었다.

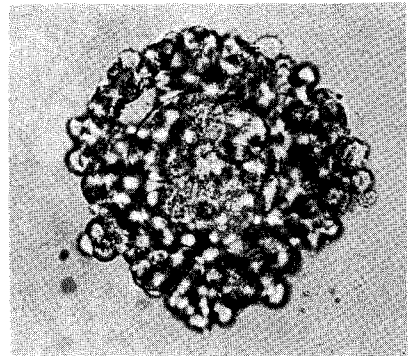


Fig. 3. Embryo is developing 8-cell stage into the zona pellucida, cumulus cells covered around the egg.

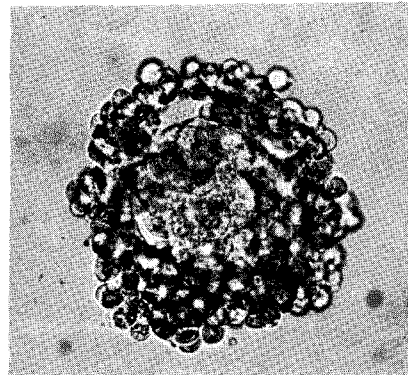


Fig. 4. 16-cell embryo, still showing granulosa cells surrounding zona pellucida.

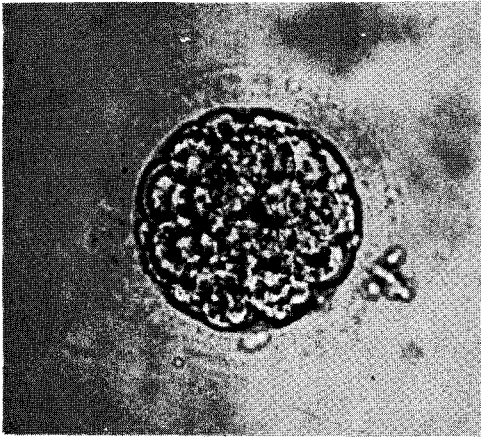


Fig. 5. 32-cell embryo showing, cumulus cell were completely denuded out of zona pellucida.

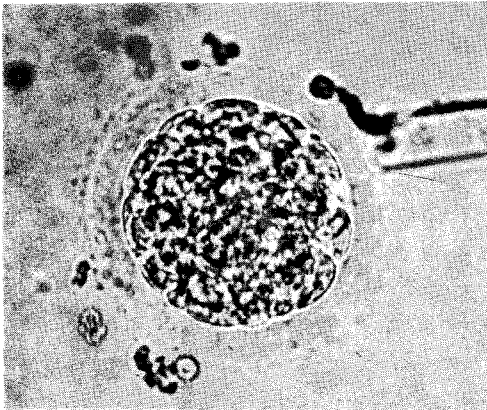


Fig. 6. Embryo's further developed into blastocyst.

IV. 考 察

1954年 Thibault 等に 의하여 토끼의 體外受精이 成功한 以來 여러 學者들에 의한 動物 (rabbit, mouse, hamster, cat, pig, rat 等)에서의 In Vitro Fertilization(IVF)이 試圖되어 成功한 報告들이⁹⁻²⁰⁾ 적지 않으며, 1978년에는 Edward 等に 의하여 體外受精兒가 出産을 하여 體外受精은 이제 不妊症治療의 最後手段으로 發展을 하여 가고 있다.²¹⁾

不妊症患者들 (15%)²²⁾의 不妊原因은 여러 가지가 있겠으나 이 가운데 男性側의 原因이 30~35%²³⁾나 되기 때문에 男性不妊症의 解決策의 하나로 人工授精(AID; artificial

insemination by donor, AIH: artificial insemination by husband)을 施行하게 되며 이와같은 人工수정을 圓滑하고 合理的으로 하며 妊娠率을 높이기 爲하여 無精子²⁴⁾인 配偶者에게는 AID를, 精子減少症인 配偶者에게는 精液을 모았다가 排卵期를 擇하여 AIH를 하며 精子의 運動性이 弱한 경우에는 活動性을 높여서 授精을 試圖하게 되므로 精子의 保存利用하는 問題가 대두되게 된다.²⁵⁾ 또한 女性의 不妊原因中 가장 빈도가 많은 卵管要因 및 기타 요소를 解結하기 爲하여 體外受精卵(IVF)을 子宮內 移植(ET: embryo transfer)시키는 등 尖端醫學을 開拓해 나가고 있는 實情에 있다.

本 研究은 이 兩者를 다같이 解決하여 주는 데 基本的인 結果를 提示하여 준 것으로서 精子의 冷凍保存과, 凍結保存後 活性을 되찾는 것과, 이와같이 活力을 回復한 精子가 受精能力을 갖는지에 關한 研究로서 精子의 選擇은 健康한 20~30代 男性으로부터 提供받아 檢査上 正常所見을 갖는 것으로서 速成冷凍(rapid freezing), 低溫保管(low temperature storage)과 迅速한 解冰(rapid thawing)等 세가지의 成功的인 保存要件을 갖추었다.⁷⁾ 冷凍保護法(cryoprotectants)으로서는 卵黃, 글리세롤 및 피루베이트等이 主成分으로 한 것^{7,25)}을 使用하였고, 冷却시키는 術技에 있어서는 지난 25年동안 여러가지로 記述되어 冷却速度가 10時間에서 超迅速法(ultrarapid)으로 數分에 걸쳐서 冷却시키는 것 등이 있으나^{26,27,28)} 著者의 경우 後者를 擇하였고, 比較的 最近의 液體窒素를 使用하여 保管하였다.

이와같이 保存된 精子를 授精하므로써 妊娠이 可能하며 또한 受胎와 分娩된 新生兒가 正常兒로 태어난다고 하는 것이 1963年 9월에 世界遺傳學會의 報告가 있는 以後 冷凍精子에 의한 受精과 精子銀行의 利用이 더욱 增加하게 되었다.²⁵⁾

採卵에 있어서는 우선 卵巢까지 接近해 들어가는 方法이 몇가지(laparoscopy, culdoscopy, laparotomy)가 있겠으나 腹腔鏡에 의하여 가장 많이 卵胞를 穿刺하여 採卵^{29,36)}을 하였으며 이때에 使用되는 氣腹形成을 爲한 가스는 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂의 混

습가스를 사용^{31,32,33}) 하였거나 100% CO₂ (C. Wood et al.)^{30,35,36,38}) 를 사용하였다. 또한 卵胞의 吸引壓도 80 ~ 120 mmHg 範圍에서 吸引하였으며^{29,30,34,35,37}) 穿刺針의 內徑은 1.0, 1.2, 1.4 mm 크기를 사용^{30,32,35-37}) 하였다. 그 결과 成熟卵 採取成功率는 78 ~ 90%^{37,42,45}) 의 回收率을 報告하고 있다.

著者の 경우 氣腹形成을 爲하여서는 100% CO₂ 가스를 썼고 卵胞液 吸引壓은 100 mmHg 內外, 吸引針의 內徑은 1.0 mm를 사용하여 卵子の 採取는 18例 (복강경 13例, 開腹手術 5例) 에서 45 卵胞로부터 33 卵子를 얻어 73.3%의 卵子回收率을 보았다.

卵의 受精前 培養은 가능한 限 排卵前 狀態의 卵으로 成熟卵을 얻는데 努力하여야 하고 授精前 5 ~ 6時間동안 培養하여 成熟에 도움이 되도록 하였는데 Trounson^{36,40}) 등은 時間別로 前培養시킨 것을 1時間에서 6時間 30分 동안에 걸쳐서 觀察한 바 5 ~ 6時間前 培養群에서 89 ~ 69%의 受精分裂을 보았다고 하였다.

그러나 著者の 경우 成熟卵은 5 ~ 6時間 동안 전배양시켰으나 未熟卵群은 24 ~ 48時間동안 前培養시켰다. 培養液의 選擇은 研究者에 따라 比較의 多樣하게 使用하고 있는데 Earle's solution 이나 Ham's F-10 및 기타의 基本培養液에 不活化患者血清 (5 ~ 15% v/v) 을 加하고 浸透壓은 280 ~ 285 mOsm/kg와 pH 7.2 - 7.4로 하여 使用하였는데^{32,38,40-43,46,47}) 著者가 擇한 培養液은 Ham's F-10으로서 浸透壓과 pH는 上記 著者들과 같은 狀態로 하였고 適性檢査는 白鼠卵子の 培養 發生으로 하였다.²⁰⁾

授精과 受精卵의 培養에 있어서는 採取된 精液은 液化後 檢査를 한다음 遠心分離에 依하여 精醬을 除去한 後 다시 遠心分離 (150 ~ 200g 10分間 또는 500g 5分間) 를 하여 精子和 卵子를 受精培養液中에 授精시켰는데^{31,32,41}) 이때 精子の 數를 15 - 20 × 10⁴/ml, 100 × 10⁴ ml, 1 ~ 10 × 10⁴/ml 등으로 하였으나^{32,37,44}) 著者에 경우 200g 10間 遠心分離와 授精精子の 濃度는 1 ~ 10 × 10⁴/ml로 하였고 一般的으로 많이 使用되는 37°C ~ 37.5°C의 5% CO₂

incubator에 培養시켰다.

受精率 : 試驗內에서 受精率은 最近의 報告者들 (Edward et al., Lopate et al., Wood et al., Jones et al.)에 依하면 55 ~ 82%를 報告하고^{37,40,42,46}) 있으나 著者の 경우 受精率이 69.7%이었고 1細胞期以上の 卵子分裂發生率이 적은 것은 우선 各群의 卵子が 未熟卵群이 많았기 때문이며 精子の 冷凍保管이 이에 影響을 미치지 않았나 思料되나 精子是 運動性이 良好하고 形態學上 正常인 것으로 보아 未熟卵의 採取가 主要原因이라고 본다. 特히 未熟卵의 경우 2個 以上の 前核을 보인 경우와 2個 이상의 精子浸透를 본 경우가 있었다.

Mettler⁴⁸) 는 最近 IVF와 ET에서 66個의 分裂이 되지 않는 卵子 가운데 3例가 multiple chromosome과 polyploid가 있었다고 보고한 바 있으며, 또다른 精子過多症 polyzoospermia에 대한 報告⁴⁹) 도 있다.

그러나 著者の 實驗結果 受精 및 受精卵 發生이 이루어진 것으로 보아 著者가 實施한 冷凍保存精子の 受精能力이 立證되었다고 본다.

V. 結 論

正常範圍의 檢査所見을 갖은 人間精液(子)을 冷凍保管을 實施하였으며 이와 같이 凍結保存된 精子が 受精 또는 受胎能力을 갖는지에 關한 經驗과 臨床에 그 實用性을 얻기 위하여 試驗管內受精(所外受精)을 實施하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 精子の 冷凍保護液 (medium)은 精子の 生存率이 좋은 세가지 培養液 (medium) 으로 處理한 精液으로서 精子の 生存率은 50% 이상을, 運動性은 中等度 (grade III) 以上の 成績을 얻었으며 本精液으로서 授精을 시켰다.

2. 卵子是 排卵前期의 45 卵胞로부터 33 卵子를 採取하여 73.3%의 採卵率을 보였으며 이들중 成熟卵 (mature ova) 과 未熟卵 (immature ova) 이 各各 15%이었으며 成熟前期卵 (premature ova) 이 69.7%이었다.

이들 3群의 卵들은 培養液에 一定時間 培養시킨 後 第一極體가 確認되면 活性處理된 精液

으로 授精을 시켰다.

3. 培養液의 選擇에 있어서는 精液凍結에 卵黃, 글리세롤 및 피루베이트 등의 medium이 가장 精子의 生存率이 좋았으며, 卵자의 授精 및 培養液으로는 Ham's F-10을 利用하였다.

4. 試驗管受精을 實施한 對象卵자 3群이 33例에서 第二極體를 보인 것이 12% (4例), 多精子受精卵(polyspermy)이 24%, 1細胞期가 21%, 2細胞期가 9%이었으며 8細胞는 1例에서 있었는데 이는 32細胞를 지나 胚盤胞(blastocyst)까지 進行된 胚가 成熟卵群에서 있었다. 따라서 全例의 受精率은 66%이었고, 1細胞期까지는 21%이었다.

5. 이상과 같은 研究實驗結果로 보아 冷凍保存精子가 受精能力이 있음을 알게 되었으며 우리 臨床에서 實用可能性을 立證하여 주었다.

本 論文을 作成함에 있어서 協助하여 주신 產婦人科學敎室敎授任과, 敎室員 그리고 獻身的 努苦를 하여준 한경원, 이정재, 백순자, 백현옥 양과 關聯된 여러분에게 深甚한 謝意를 表하는 바입니다.

REFERENCE

1. Yoshiaki Sawada and Donald R. Ackerman: Use of frozen human semen. *Progress in infertility (Behrman & Kistner)* 731-747, 1968.
2. Jon H. Alfredsson, Sigurdur P. Gudmundsson and Gunnlaugur Snaedal: *Artificial insemination by Donor with frozen semen. Obstetrical & Gynecological survey* 38: 305-310, 1983.
3. Stephen L. Corson and Frances R. Batzer: *Artificial insemination, Current Problems in Obstet. & Gynecol.* 3: (No.7) 20-22, 1980.
4. Curie-Cohen, M., Luttrell, L., and Shapiro, S.: *Current practice of artificial insemination by donor in the United States. N. Engl. J. Med.* 300: 585, 1979.
5. Ansbacher, R.: *Artificial insemination with frozen spermatozoa Fertil. Steril.* 29: 375, 1978.
6. Richardson, D.W.: *AID and sperm banks in Great Britain: In human artificial insemination and semen preservation, edited by G. David and W. Price. Plenum, New York, 1980 cited by reference number 2.*
7. 구병삼 외: 인간정액(자) 동결보존에 관한 연구. In preparation.
8. Hoy, J., Humphris L. and Mahadevan M.: *Semen preparation. IVF workshop. Dept. of Obstet. & Gynec. Monash University 100, 1983.*
9. Bedford, J.M. and Chang, M.C.: *Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature* 193: 898, 1962.
10. Chang, M.C.: *Development and fate of transferred ova or blastocyst. J. Exp. Zool* 114: 197, 1950.
11. Chang, M.C.: *Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature* 184: 466, 1959.
12. Mukherjee, A.B. and Cohen, M.M.: *Development of normal mice by in vitro fertilization. Nature* 228: 472, 1970.
13. Whittingham, D.G.: *Fertilization of mouse eggs in vitro Nature* 220: 592, 1968.
14. Hamner, C.E., Jennings, L.L. and Sojka, N.J.: *Cat spermatozoa require capacitation. J. Reprod. Fert.* 23: 477, 1970.
15. Yanagimachi, R. and Chang, M.C.: *Fertilization of hamster eggs in vitro. Nature* 200: 281, 1963.
16. Yanagimachi, R. and Chang, M.C.: *In vitro fertilization of hamster ova. J. Exp. Zool* 156: 361, 1964.
17. Noyes, R.W.: *Fertilization of follicular ova. Fertil. Steril* 3: 1, 1952.
18. Leman, A.D. and Dziuk, P.L.: *Fertilization and development of pig follicular oocytes. J. Reprod. Fert.* 26: 387, 1971.
19. Seitz, H.M., Brackett, B.G. and Mastroianni, L.: *In vitro fertilization of ovulated rabbit ova recovered from the ovary. Biol. Reprod.* 2: 262, 1970.
20. 구병삼·민병력: 시험관수정과 배발생에 관

- 한 백서난자의 실험적 연구, 대한산부인과 학회지 2711 ~ 17, 1984.
21. 飯塚理入 外: 體外受精の現況と展望, *Obstet Gynecol (Tokyo)* 50:2143 1983.
 22. Howard W. Jones, Jr., and Georgeana S. Jones: *Infertility, recurrent and spontaneous abortion. Novak's textbook of gynecology 10th ed.* 694, 1981.
 23. Kistner R.W.: *Infertility. Gynecology principles and practice 3rd ed.* 469, 1979.
 24. Bruno Lunenfeld.: *Diagnosis and management of male infertility. Current problems in Obstet. and Gynecol.* 7: (9) 39, 1984.
 25. Cappy Miles Rothman, M.D., F.A.C.S.: *Sperm banking 1984. Current therapy of infertility 1984-1985:* 214-217, 1984.
 26. Barkey, J., Zuckerman, H., and Haiman M.: *New practical and method of freezing and storing human sperm. Fertil. Steril.* 25: 399, 1974.
 27. Barkey, J., and Zuckerman, H.: *Further development device for human sperm freezing by the twenty-minute method. Fertil. Steril.* 29: 304, 1978.
 28. Behrman, S.J., and Ackerman, D.R.: *Freeze preservation of human semen. Am J. Obstet. Gynecol.* 103: 654, 1969.
 29. P.C. Steptoe: *Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotrophins, Lancet,* 1: 683, 1970.
 30. A.O. Trounson: *Extracorporeal fertilization and embryo transfer, Clin. Obs. & Gynaecol.,* 8: 681, 1983.
 31. R.G. Edwards: *Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro, Br. J. Obstet. Gynaecol.,* 87: 737, 1980.
 32. A. Lopata: *Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by in vitro fertilization of a preovulatory egg, Fertil. Steril.,* 33: 117, 1980.
 33. A. Lopata: *Collection of human oocytes at laparoscopy and laparotomy, Fertil. Steril.,* 25: 1030, 1974.
 34. C. Wood: *Technique for collecting mature human oocytes for in vitro fertilization, Br. J. Obstet. Gynaecol.,* 88: 756, 1981.
 35. C. Wood: *A clinical assessment of nine pregnancies obtained by in vitro fertilization and embryo transfer, Fertil. Steril.,* 35: 502, 1981.
 36. H.W. Jones, Jr.: *A technique for the aspiration of oocytes from human ovarian follicles, Fertil. Steril.,* 37: 26, 1982.
 37. I. Johnston: *In vitro fertilization: The challenge of the eighties, Fertil. Steril.,* 36: 699, 1981.
 38. A.O. Trounson: *Research in human in-vitro fertilization and embryo transfer, Br. Med. J.,* 285: 244, 1982.
 39. H.W. Jones, Jr.: *The program for in vitro fertilization at Norfolk, Fertil. Steril.,* 38: 14, 1982.
 40. A.O. Trounson: *Effect of delayed insemination on in-vitro fertilization, culture and transfer of human embryos, J. Reprod. Fertil.,* 64: 285, 1982.
 41. R.G. Edwards: *The growth of human preimplantation embryos in vitro, Am. J. Obstet. Gynecol.,* 141: 408, 1981.
 42. R.G. Edwards: *Test-tube babies, 1981, Nature,* 293: 253, 1981.
 43. A. Lopata: *The fine structure of human blastocysts developed in culture, Prog. Clin. Biol. Res.,* 85: 69, 1982.
 44. A. Lopata: *Human embryo transfer in the treatment of infertility, Aust. N.Z.J. Obstet. Gynaec.,* 21: 156, 1981.
 45. A.O. Trounson: *Pregnancies in humans by fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle, Science,* 212: 681, 1981.
 46. J.E. Garcia: *Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: Phase II, 1981, Fertil. Steril.,* 39: 174, 1983.

47. Mark I. Evans, Anil B. Mukherjee and Joseph D. Schulman: *Human in vitro fertilization. Obstet. & Gynecological Survey 35: (2) 71-78, 1980.*
48. Mettler, L., Michelmann and Semm, K.: *Special feature in IVF/ET. multiple pregnancies and polypoid embryo.*
日本受精着床學會 學術講演會 抄録集 第2回 : 26, 1984.
49. 井上正人 外 : 精子過多症 polyzoospermia の精子受精能力 について, 日本不妊學會 學術講演會 抄録集 第29回 : 220, 1984.