

## Trophoblastic Vesicle과 Estradiol-17 $\beta$ 의 添加가 家兔胚의 發達에 미치는 影響

오하식 · 박충생  
경상대학교 농과대학

### Effects of Trophoblastic Vesicle and Estradiol-17 $\beta$ on the Development In Vitro of Rabbit Embryos

Oh, H. S. and C. B. Park

College of Agriculture, Gyeongsang National University

#### Summary

This experiment was conducted to determine the effects of trophoblastic vesicles (TV) and estradiol-17 $\beta$  on the development *in vitro* of rabbit embryos. Thirty matured female rabbits were treated with PMSG followed by HCG injection and mating. Embryos were recovered with D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) after superovulation, and normally developed to two- to four-cell embryos were used in the subsequent *in vitro* culture. Basal medium was Medium-199 supplemented with 1.5% bovine serum albumin. Embryo on Day 5 after mating (Day 0) was cut into two or three pieces to remove the embryonic disc. Each piece of tissue was cultured for 24 hours at 37°C in 0.5 ml Medium-199 in 5% CO<sub>2</sub>. During culture, pieces of trophoblastic tissue changed into spherical vesicles which were used for co-culture. These spheres were called trophoblastic vesicles. Two- to four-cell embryos were cultured for 4 days in Medium-199 in the absence or presence of trophoblastic vesicle. and two-to four-cell embryos cultured with varying concentration (0, 0.1, 1, 10ng/ml) of estradiol-17 $\beta$  for 4 days. Culture vessels used were watch glass for co-culture with trophoblastic vesicles and microtube for estradiol-17 $\beta$  infusion.

Compared with the Medium-199 alone as basal culture medium, more blastocysts (46.7% vs 15.1%; P<0.01) and morulae (84.4% vs 56.6%; P<0.05) were developed in the co-culture with trophoblastic vesicles.

Estradiol-17 $\beta$  infused in culture medium was not effective for embryo development to blastocysts (78.3% in control, 50.0% in 0.1ng/ml, 61.5% in 1ng/ml and 64.4% in 10ng/ml) and also to morulae (91.3% in control, 84.2% in 0.1ng/ml, 92.3% in 1ng/ml and 91.1% in 10ng/ml).

Compared with the watch glass culture method, more (P<0.01) blastocysts were developed in microtube culture (78.3% vs 56.6%) and more (P<0.01) morulae in microtube culture (91.3% vs 56.6%).

## I. 緒 論

家兔 Embryo의 體外培養에 관한 연구는 Shenk (1880)에 의해 처음 시도된 이래, Lewis와 Gregory(1929), Pincus(1930), Pincus와 Enzmann(1936), Adams(1956), Purshottam과 Pincus(1961), Onuma 등(1968), Mauer(1968) 등이 초기 家兔 embryo를 morula까지 배양하였으며 많은 연구자들이 초기 embryo를 blastocyst까지 배양하였다(Adams, 1970; Kane과 Foote, 1970; Ogawa 등, 1971, 1972; Kane, 1972, 1976, 1983, 1985; Kane과 Headen, 1980; Lindner, 1983).

한편, Thibault(1966)는 거의 모든 소의 初期 embryo는 8~12세포기에서 배양이 중지되는 것을 관찰하였고 이를 'block stage'라고 불렀다. 이는 Whittingham과 Bigger(1967)에 의해 mouse에서도 관찰되었다. 그런데 이렇게 mouse에서 培養이 중지되는 것은 Cytoplasmic compounds를 주입함으로써 培養成績을 개선시킬 수 있었다(Muggleton-Harris 등, 1982). 이들의 결과에 따라 Camous 등(1984)은 소의 初期 embryo를 培養할 때 embryonic disc를 제거하여 24시간 동안 培養해 새로이 形成된 trophoblastic vesicle을 첨가함으로써 培養成績을 현저히 개선시킬 수 있었다.

그리고 Dickmann과 Gupta(1977)는 家兔의 blastocyst는 estrogen을 生成한다고 하였고 George와 Wilson(1978), Gadsby 등(1980)에 의해서도 관찰되었고, Dickmann과 Dey(1974)는 rat에서, Gadsby 등(1980)은 소, 돼지, 면양 및 고양이등에서도 estrogen이 生成된다고 하였다.

이에 본 研究者는 trophoblastic vesicle의 添加가 家兔의 初期 embryo培養에 어느 정도 효과가 있는지, 그리고 어느 정도의 濃度로 estradiol -17 $\beta$ 를 添加하였을 때 blastocyst까지의 培養成績을 改善시킬 수 있는지를 조사하여 胚移植의 基礎資料로 삼고자 본 實驗을 實施하였다.

## II. 材料 및 方法

### 供試材料

#### 1) 供試動物

成牝 家兔(체중: 2.0~3.2kg) 30頭를 18日 以上 격리 飼育하여 偽妊娠기간을 지나도록 한 후 實驗에 사용하였으며 個別 cage식 토상에서 일반관행법에 따라 사양관리하였다.

#### 2) 供試藥品

本 實驗에서는 과배란을 誘起하기 위하여 PMSC(PEAMEX, 三共株式會社, 日本) 및 HCG(Sigma, Cat. No. 69C-0005, USA)를 사용하였고, 관류액으로는 D-PBS(GIBCO, Cat. No. 450-1300, USA)를 사용하였고, 培養液으로는 bovine serum albumin(Sigma, Cat. No. A-4503, USA)를 1.5% 첨가한 Medium-199(GIBCO, Cat. No. 400-1200, USA)을 사용하였으며, estradiol-17 $\beta$  (Sigma, Cat. No. E-8875, USA)를 실험설계에 따라 培養液에 첨가하였다.

#### 2. 實驗設計

Trophoblastic vesicle(TV)의 添加效果에 관한 실험은 대조구와 첨가구의 2개구로 하였고, estradiol-17 $\beta$  (E, $\beta$ )의 添加水準에 관한 실험은 대조구, 0.1ng/ml, 1ng/ml 및 10ng/ml의 4개구로 하였다. TV 添加實驗은 10頭 그리고 E, $\beta$  添加實驗은 20頭의 家兔에서 채취한 embryo를 供試하였는데 각구에는 공히 동일 家兔에서 채취한 embryo를 均等임의 배치함으로써 家兔의 개체 변이에서 오는 오차를 줄이도록 하였다.

#### 3. 實驗方法

##### 1) 過排卵 및 embryo의 회수

과배란은 18日 以上 격리 飼育되어 發情중인 家兔에게 PMSC를 50IU 皮下注射하고 83시간 후 125IU의 HCG를 耳靜脈注射하고 交尾시켰다. Embryo의 회수는 교미 후 30시간에 도달하여 난관과 자궁을 摘出하고 분리하여 난관은 난관 누두부에서 난관-자궁접속부위 쪽으로, 자궁은 질 쪽에서 난관-자궁접속부위 쪽으로 2ml의 D-PBS로 관류시켜, 40~100X의 현미경으로 檢境하여 정상적인 2~4 세포기의 embryo만을 회수하였고, 培養液으로 2회 세척하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 D-PBS나 Medium-199은 사용하기 전에 0.2 $\mu$ m TOYO membrane filter로 여과하였다.

##### 2) Trophoblastic vesicle의 添加

(1) Trophoblastic vesicle의 準備-IPMSG와 HCG로 과배란을 誘起하고 교미시킨 후 5日째에 家兔를 도살하여 자궁을 摘出, 2ml의 D-PBS로 관류하여 Trophoblast가 잘 발달된 embryo를 채취하였다. 각 embryo는 embryonic disc를 제거하기 위해 2~3 조각으로 자른 후 1.5% bovine serum albumin이 添加된 Medium-199 培養液으로 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 배양하는 동안 잘려진 embryo의 조각은 球形으로 변화하였는데 이를 2~4 세포기 embryo의 培養에 添加하였다.

#### (2) TV의 添加培養

Trophoblastic vesicle의 添加培養은 watch glass를 培養容器로 하였는데 대조구는 회수된 2~4 세포기의 embryo 4~6개를 1.5%의 bovine serum albumin이 첨가된 0.5ml의 Medium-199으로 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 培養하였고, trophoblastic vesicle의 첨가구는 2~4 세포기의 embryo 3~5개를 1.5%의 bovine serum albumin이 첨가된 0.5ml의 Medium-199에 1개의 trophoblastic vesicle을 첨가하여 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 4일간 培養하였다. Embryo의 발달은 24시간 간격으로 檢境하였다.

#### 3) Estradiol-17 $\beta$ 의 添加

Estradiol-17 $\beta$ 를 polyethylene glycol (MW. 400)에 용해하여 培養液에 첨가하였으며, 培養液中の estradiol-17 $\beta$ 의 濃度を 0, 0.1, 1, 10ng/ml이 되게하여 watch glass에 0.5ml씩 넣은 후 2~4 세포기 embryo를 注入하였다. 이때 기본 培養液은 1.5%의 bovine serum albumin이 첨가된 M-199이었다. 培養容器는 steroid hormone이 油溶性 물질이므로 培養液과 oil이 접촉하지 않는 microtube를 사용하였다(Cho, 1974). Embryo는 watch glass에서 1~3개씩 pasteur pipette로 pipetting하여 길이 75mm, 내경이 약 1mm인 microtube의 중앙에 培養液과 함께 주입하였으며, 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 30분 동안 평형시켰다. 그리고 paraffin oil로 microtube의 양끝을 봉입하였고, 이 microtube들을 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 4일간 培養하였으며 24시간 간격으로 embryo의 發達을 檢境하였다.

#### 4) 統計學的 分析

統計學的 分析은 Snedecor와 Cochran(1973)에 따라 X<sup>2</sup>檢定을 실시하였다.

### III. 結果 및 考察

#### 1. Trophoblastic vesicle의 添加效果

Trophoblastic vesicle의 添加가 家兔 초기 embryo의 培養에 미치는 영향은 Table 1. 에서 보는 바와 같다. Trophoblastic vesicle을 添加하였을 때 blastocyst까지 發達된 embryo는 46.7%로서 대조구의 15.1%보다 유의적(P<0.01)으로 높았고, morula 이상 발달한 성적에서도 trophoblastic vesicle의 첨가가 84.4%로서 대조구의 56.6%보다 우수하였다(P<0.05). 이러한 배양성적은 Camous등(1984)이 소의 2 및 4 세포기의 embryo를 trophoblastic vesicle을 첨가하여 morula까지 培養한 성적 38 및 5%보다는 우수하였고, Muggleton-Harris등(1982)이 cytoplasmic compounds를 培養液에 첨가하여 mouse의 2 세포기 embryo를 배양해 morula 이상 발달한 성적 71.4%와 비슷하였다. 그러데 Camous등(1984)은 trophoblastic vesicle이 초기 embryo에 필요한 lipids와 같은 metabolic compounds를 生成할 것이라고 하였으나 어떤 물질이 生成되는지는 확실히 규명되지 않았다. 그리고 家兔의 trophoblast는 estrogen과 같은 hormone을 生成하므로 이러한 hormone의 作用도 관제될지 모른다.

#### 2. Estradiol-17 $\beta$ 의 添加 效果

Estradiol-17 $\beta$ 의 添加 效果는 Table 2. 에서 보는 바와 같이 대조구에서는 blastocyst까지 배양된 성적이 78.3%이었는데, estradiol-17 $\beta$  첨가시는 0.1ng/ml : 50.0%, 1ng/ml : 61.5% 및 10ng/ml : 64.4%로서 0.1ng/ml 첨가시에는 난할이 억제되었고 다른 처리구간에는 유의차가 없었다. 이러한 결과는 Maurer와 Beier(1976)가 estradiol-17 $\beta$ 의 濃度 10<sup>-8</sup>M, 10<sup>-6</sup>M, 10<sup>-4</sup>M로 하여 배양한 결과 blastocyst까지 培養된 성적이 54%, 54% 그리고 59%로서 대조구와 유의차가 없었다는 보고와 비슷한 경향이였다. 그런데 estradiol-17 $\beta$ 의 濃度を 0.03mM 이나 0.06mM (Daniel, 1964), 10<sup>-6</sup>M (Bowman과 McLaren, 1970) 그리고 25 $\mu$ g/ml (Kirkpatrick, 1971) 등의 높은 濃度로 첨가하였을 때는 난할이 억제되었고, 0.005mM (Daniel, 1964), 10<sup>-6</sup>M (Bowman과 McLaren, 1970) 등 낮은 濃度로 첨가하였을 때는

아무런 영향을 미치지 않았다는 보고들과 本實驗의 결과로 미루어 보아 이러한 결과는 estradiol-17β가 家兔 embryo의 培養에 效果가 없는 것인지 혹은

은 첨가시의 적정 수준을 규명하지 못한 때문일 것으로 생각된다.

Table 1. Effect of the presence of trophoblastic vesicle on the development in vitro of 2 to 4-cell rabbit embryos by watch glass culture method.

Treat- ment	No. of embryos cultured	Embryos developed to							
		2-4 cell	8-cell	16-cell	Morula & blastocyst			Total	
					Morula	Blastocyst			
						Early or expanding	Hatching		Total
Control	53	0 (0)	8 (15.1)	15 (28.3)	22 (41.5)	7 (13.2)	1 (1.9)	8 (15.1)	30 (56.6)
Cultured with TV	45	0 (0)	2 (4.4)	5 (11.1)	17 (37.8)	21 (46.7)	0 (0)	21** (46.7)	38** (84.4)

Figures in parentheses mean percentages of embryos developed.

\* Significantly different from control (P<0.05).

\*\* Significantly different from control (P<0.01).

### 3. Microtube와 watch glass에 의한 培養成績의 比較

Microtube 또는 watch glass를 培養容器로 하였을 때의 blastocyst까지 發達된 성적은 Table 3. 에 서 보는 바와 같다. Microtube배양에서 blastocyst까지 배양된 성적은 78.3%이었고 watch glass로 배양했을 때는 15.1%로서 microtube배양이 우수하였다 (P<0.01). Morula이상 發達한 성적도 microtube를 培養容器로 하였을 때는 91.3%로서 watch glass경우의 56.6%보다 우수하였다 (P<0.01). 이러한 배양성적은 Cho (1974)가 microtube를 이용하여 2세포기 mouse embryo를 배양하여 얻은 성적 73.3%와 비슷한 결과였고, 권과 정 (1975)의 64.7%보다는 약간 우수한 성적이었다. Maurer (1978)는 家兔 embryo의 최적 pH는 7.4±0.1이라고 하였는데, 培養液은 시간이 경과함에 따라 pH가 變化하며 CO<sub>2</sub>를 공급함으로써 그 變化를 억제시킬 수 있었다고 하였다. Cho (1974)는 microtube로 培養했을 때 pH의 變化를 극소화 할 수 있었다고 하였으나, 本實驗의 결과에서 watch glass培養의 성적이 不良한 이유가 이러한 pH變化 때문인지 혹은

다른 원인도 관련되는지는 더욱 研究해 봐야 규명 될 것으로 생각한다.

### IV. 摘 要

Trophoblastic vesicle (TV)과 estradiol-17β (E<sub>2</sub>β)의 添加가 家兔 embryo의 in vitro 培養에 미치는 영향을 규명하기 위하여 成牝家兔 30頭를 PMSG 및 HCG로 과배란시키고 交尾시킨 후 30시간에 채란한 2~4 세포기의 정상 embryo 266개를 供試하였다. 기초 培養液은 1.5%의 bovine serum albumin을 첨가한 M-199 培養液이었다.

TV의 첨가는 交尾 후 5일째의 家兔 embryo에서 TV를 분리하여 24시간 배양한 후 이를 培養液에 첨가하였고 E<sub>2</sub>β의 培養液 첨가수준은 0.1ng/ml, 1ng/ml 및 10ng/ml의 3水準으로 하였다. 培養容器는 TV첨가시는 watch glass를 그리고 E<sub>2</sub>β첨가시는 microtube를 사용하였으며 embryo를 4일간 CO<sub>2</sub> incubator에서 培養하였다. 本實驗에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

**Table 2. Effect of estradiol-17 $\beta$  on the development in vitro of rabbit embryos by microtube culture method**

Dose of estradiol No. -17 $\beta$ of (ng/ml) embryos cultured	Embryos developed to								
	2-4 cell	8-cell	16-cell	Morula & blastocyst			Total	Total	
				Morula	Blastocyst				
					Early or expanding	Hatching			
Control	46	3 (6.5)	1 (2.2)	0 (0)	6 (13.0)	27 (58.7)	9 (19.6)	36 (78.3)	42 (91.3)
0.1	38	4 (10.5)	2 (5.3)	0 (0)	13 (34.2)	15 (39.5)	4 (10.5)	19* (50.0)	32 (84.2)
1	39	2 (5.1)	1 (2.7)	0 (0)	13 (34.2)	20 (39.5)	4 (10.7)	24 (61.5)	36 (92.3)
10	45	2 (4.4)	2 (4.4)	0 (0)	12 (26.7)	23 (51.1)	6 (13.3)	29 (64.4)	41 (91.1)

Figures in parentheses mean percentages of embryos developed.

\* Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

**Table 3. Culture results of 2 to 4-cell rabbit embryos by watch glass or microtube method**

Culture method	No. of embryos cultured	Embryos developed to							
		2-4 cell	8-cell	16-cell	Morula & blastocyst			Total	
					Morula	Blastocyst			
						Early or expanding	Hatching		
Micro-tube	46	3 (6.5)	1 (2.2)	0 (0)	6 (13.0)	27 (58.7)	9 (19.6)	36** (78.3)	42** (91.3)
Watch glass	53	0 (0)	8 (15.1)	15 (28.3)	22 (41.5)	7 (13.2)	1 (1.9)	8 (15.1)	30 (56.6)

Figures in parentheses mean percentages of embryos developed.

\*\* Significantly different between two groups ( $P < 0.01$ )

1. TV의 첨가에 의한 blastocyst까지의 培養成績은 대조구가 15.1%, TV를 첨가한 구에서는 46.7%로서 유의적 ( $P < 0.01$ )으로 우수하였다. Morula 이상으로 發達한 比率에 있어서도 TV 첨가는 유의

적 ( $P < 0.05$ )으로 培養成績이 우수하였다.

2. E<sub>2</sub> $\beta$ 의 첨가에 의한 blastocyst까지의 培養成績은 대조구가 78.3%, 0.1ng/ml 첨가구는 50.0%, 1ng/ml 첨가구는 61.5%, 10ng/ml 첨가구는

64.4%로서 이러한 水準의 E<sub>2</sub>,β의 첨가로서는 培養成績이 개선되지 않았다. Morula 이상 發達한 embryo에 있어서도 처리구간에 유의차 (P<0.05)가 없었다.

3. Microtube 培養法에 의한 blastocyst까지의 發達에 대한 성적은 78.3%로서 watch glass배양에서의 15.1%보다 현저히 높았다 (P<0.01). Morula 이상 發達한 embryo의 성적에서도 역시 Microtube 培養이 watch glass에서 보다 우수하였다 (P<0.01).

### REFERENCES

1. Adams, C.E., 1956. Egg transfer and fertility in the rabbit. Proc. 3rd. Int. Congress. Anim. Reprod. and A.I. Cambridge, section 3, p. 5-6.
2. Adams, C.E., 1970. The development of rabbit eggs after culture in vitro for 1-4 days. J. Embryol. exp. Morph. 23:21-34.
3. Bowman, P. and A. McLaren. 1970. Cleavage rate of mouse embryos in vivo and in vitro. J. Embryol. exp. Morph. 24:203-207.
4. Camous, S., Y. Heyman and Y. Menezzo. 1984. In vitro culture of early bovine embryos with trophoblastic vesicle: Cleavage through the block stage, followed by pregnancy after transfer. Theriogenology 21: 226.
5. Camous, S., Y. Heyman, W. Meziou and Y. Menezzo. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. J. Reprod. Fert. 72:479-485.
6. Cho, W.K., 1974. A microtube culture method for mouse oocytes. J. Reprod. Fert. 37:437-440.
7. Daniel, J.C. Jr., 1964. Some effects of steroids on cleavage of rabbit eggs in vitro. Endocrinology 75:706-710.
8. Dickman, Z. and S.K. Dey. 1974 Steroidogenesis in the preimplantation rat embryo and its possible influence on morula-blastocyst transformation and implantation, J. Reprod. Fert. 37:91-93.
9. Dick, Z., J.S. Gupta and S.K. Dey. 1977. Does "Blastocyst estrogen" initiate implantation? Science 195:687-688.
10. Gadsby, J.E., R.B. Heap and R.D. Burton. 1980. Oestrogen production by blastocyst and early embryonic tissue of various species. J. Reprod. Fert. 60:409-417.
11. George, F.W. and J.D. Wilson. 1978. Estrogen formation in the early rabbit embryo. Science 199:200-201.
12. Kane, M.T. 1972. Energy substrates and culture of single cell rabbit ova to blastocysts. Nature 238:468.
13. Kane, M.T. 1976. Growth of fertilized one-cell rabbit ova to viable morulae in the presence of pyruvate or fatty acids. J. Physiol. 236:235-236.
14. Kane, M.T. 1983. Variability in different lots of commercial bovine serum albumin affects cell multiplication and hatching of rabbit blastocysts in culture. J. Reprod. Fert. 69:555-558.
15. Kane, M.T. 1985. A low molecular weight extract of bovine serum albumin stimulates rabbit blastocyst cell division and expansion in vitro. J. Reprod. Fert. 73: 147-150.
16. Kane, M.T. and D.R. Headen. 1980. The role of commercial bovine serum albumin preparation in the culture of one-cell rabbit embryos to blastocysts. J. Reprod. Fert. 60:469-475.
17. Kane, M.T. and R.H. Foote. 1970. Culture of two- and four-cell rabbit embryos to the expanding blastocyst stage in synthetic media. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133:921-925.

18. Kirkpatrick, J.F. 1971. Differential sensitivity of preimplantation mouse embryos in vitro to oestradiol and progesterone. *J. Reprod. Fert.* 27:283-285.
19. Lewis, W.H. and P.W. Gregory. 1929. Cinematographs of living developing rabbit eggs. *Science* 69:226-229.
20. Lindner, G.M., J.F. Dickey and J.R. Hill, Jr. 1983. Effect of bovine serum albumin concentration on the development of ovine embryos in vitro. *J. Anim. Sci.* 57:466-472.
21. Mauer, R.E., E.S.E. Hafez, M.H. Ehlers and J.R. King. 1968. Culture of two cell rabbit eggs in chemically defined media. *Exp. Cell Res.* 52:293-300.
22. Maurer, R.R. 1978. Advances in rabbit embryo culture. In: *Methods in mammalian reproduction*. Daniel, J.C., Jr.(ed.), Academic Press, London. p. 259-272.
23. Maurer, R.R. and H.M. Beier. 1976. Uterine proteins and Development in vitro of rabbit preimplantation embryos. *J. Reprod. Fert.* 48:33-41.
24. Muggleton-Harris, A., D.S. Whittingham and L. Wilson. 1982. Cytoplasmic control of preimplantation development in vitro in the mouse. *Nature* 299:460-462.
25. Ogawa, S., K. Satoh and H. Hashimoto. 1971. in vitro culture of rabbit ova from the single cell to the blastocyst stage. *Nature* 233:422.
26. Ogawa, S., K. Satoh, M. Hamada and H. Hashimoto. 1972. In vitro culture of rabbit ova fertilized epididymal sperms in chemically defined media. *Nature* 238:270.
27. Onuma, H., R.R. Maurer and R.H. Foote. 1968. In-vitro culture of rabbit ova from early cleavage stages to the blastocyst stage. *J. Reprod. Fert.* 16:491-493.
28. Pincus, G. 1930. Observation on the living eggs of the rabbit. *Proc. R. Soc. B.* 107:132-167.
29. Pincus, G. and E.V. Enzman. 1936. *J. Exp. Zool.* 73:195-208.
30. Purshottam, N. and G. Pincus. 1961. In vitro cultivation of mammalian eggs. *Anat. Rec.* 140:51-55.
31. Snedecor, G.W. and W.G. Cochran. 1973. *Statistical methods*. Sixth ed., The Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, U.S.A.
32. Thibault, C. 1966. La culture in vitro de l'oeuf de vache. *Annls Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 6:159-164.
33. Whittingham, D.G. and J.D. Bigger. 1967. Fallopian tube and early cleavage in the mouse. *Nature* 213:942-943.