

家畜의 改良 및 繁殖效率 增進에 關한 研究

Ⅲ. 過排卵處理 토끼에 있어서 卵胞卵의 體外成熟과 受精能力에 關한 研究

鄭英彩 · 金昌根 · 尹鍾澤 · 朴在元

中央大學校 畜産學科

Studies on the Improvement of Performance and Reproductive Efficiency in Farm Animals

Ⅲ. In vitro maturation and fertilizing ability of follicular oocytes in superovulated rabbits

Chung, Y. C., C. K. Kim, J. T. Yoon and J. W. Park

Department of Animal Science, Chung-Ang University

Summary

This experiment was conducted to determine the effect of FSH on in vitro maturation and in vitro fertilizing ability of oocytes recovered from normal follicles of different sizes in superovulated rabbits. Follicular oocytes recovered were cultured in modified Ham's F₁₂ medium containing 0, 0.1, 1.0 and 10 μ g FSH/ml for 18 hours and investigated the degree of cumulus cells expansion and nuclear maturation, which were fertilized with in vivo capacitated rabbit sperm.

1. The number of normal follicles <1.5mm, 1.6 to 2.5mm and >2.5mm in diameter at 16 to 18hrs after HCG administration was 4.8 (38.8%), 5.5(45.4%) and 3.3(15.8%), respectively. Average percent of oocytes recovered was 69.7% and larger follicles tended to have a higher percent recovery rate than smaller follicles.
2. The degree of cumulus expansion in medium containing 0.1 μ g FSH/ml was similar to that of control, but markedly decreased under the level of above 1 μ g FSH/ml. The proportions of oocytes which reached the second meiotic metaphase were 57.1, 61.5, 43.8 and 45.0% in medium containing 0, 0.1, 1.0 and 10 μ g FSH/ml, respectively. Oocytes from larger follicles showed a higher nuclear maturation than that from smaller follicles.
3. In vitro fertilization rate of oocytes matured under 1 μ g FSH/ml was slightly, not significant, higher than that of others.
4. Progesterone level in follicular fluid was about 67 to 71ng/ml with no difference in follicular sizes and estradiol-17 β level was under 25pg/ml.

I. 緒 論

受精卵移植과 體外受精 기술을 효율적으로 産業化하기 위하여는 卵子 또는 受精卵을 보다 경제적 으로 多量生産할 수 있는 技術開發이 先行되어야 하며 현재 이를 위하여 過排卵處理法과 卵胞卵을 利用하는 두 가지 方向으로 연구되고 있다.

Chang(1955)과 Thibault(1972)는 體外成熟卵胞卵

으로 受精卵을 얻을 수 있었으며 Thibault(1977), Tsafiriri(1978), Channing등(1982)은 哺乳動物의 卵胞卵成熟에 대한 綜說을 발표한 바 있다. 卵胞卵의 體外成熟에 影響하는 要因은 여러가지가 있는데 특히 培養液中에 GTH의 添加로 成熟率을 向上시켰다는 例가 牛(Ball등; 1983, Dooley; 1984, Hensleigh와 Hunter; 1985), 緬羊(Moor등; 1981, Moor와 Trounson; 1977), 豚(Minato와 Toyoda; 1982), 兎

(Oh와 Brackett; 1975)에서 보고되었으며, 또한 採卵된 卵胞의 크기에 따라서도 體外成熟率이 크게 좌우됨을 兪(Bae와 Foote, 1975), 綿羊(Moor와 Trounson, 1977) 및 豚(Motlik등, 1984)에서 보고된 바 있다. 한편 卵胞液中的 steroid와 卵胞卵의 成熟과의 관계, 成熟分裂을 조절하는 steroid의 역할에 관하여는 아직 不明한 點이 많지만 Grimes등(1985)은 卵胞內 steroid가 卵胞卵의 體外成熟能力과 관계가 있다고 하였으며, estrogen은 억제효과(Richter와 McGaughey, 1979), Progesterone은 촉진효과(Bae와 Foote, 1975; McGaughey, 1979)를 갖는 것으로 보고되어 있다.

本 研究는 이러한 結果를 근거로 하여 過排卵된 토끼에서 採卵한 卵胞卵에 FSH 處理에 따른 體外成熟의 效果를 究明하기 위하여 시도하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物 및 管理

供試된 토끼는 體量 2.5~3.0kg의 New Zealand white種 成兔로서 供試前에 20日間 케이지에 1首씩 분리 사육하였으며 給與飼料는 토끼용 pellet 사료를 1日 2回 급여하였고 물은 自由給水시켰다. 시험기간중 日照時間은 1日 14時間으로 조절하였다.

2. 卵胞卵의 採卵

過排卵을 위하여 1日 12시간 간격으로 2回 FSH를 0.5mg씩 3日間 피하 주사하고, 최종 FSH注射後 24時間에 HCG 200IU를 耳靜脈內로 注射하였다. HCG주사후 16~18時間後에 頸推逸脫로 희생시킨 후, 즉시 開腹하여 분리한 卵巢를 37℃ 恒溫室로 옮겨 採卵하였다. 卵巢表面을 培養液으로 2~3회 세척후 實體顯微鏡下에서 可視卵胞의 크기(直徑 < 1.5mm, 1.6~2.5mm, >2.5mm)별로 區分하여 26케이지 注射針으로 난포를 과열시키면서 卵胞卵을 回收하였다. 회수된 卵子는 培養液으로 2~3회 세척한 후 卵子培養液으로 옮겼다.

3. 卵胞卵 培養液

培養液은 Ham's F₁₂ (GIBCO)에, 表1 과 같이 glucose, NaHCO₃ 및 BSA를 追加한 후 pH를 7.4로 조정한 다음 0.22 μ m millipore filter(Gelman Sci, Inc)로 여과하였고 38℃, 5% CO₂ incubator에서 20

分間 平衡後 사용하였다. 採卵用 medium은 BSA함량을 10mg으로 하였다.

Table 1. Composition of egg culture medium

Ingredient	g/100ml
Ham's F ₁₂ mixture	1.060
Glucose	0.180
NaHCO ₃	0.211
BSA	40mg

4. 卵胞卵의 體外培養

Petri dish(Falcon plastics #1006)에 미리 준비한 培養液 0.2~0.4ml의 小滴內로 5個의 卵子를 無作爲로 注入하고 그 위에 paraffin oil을 덮고 18時間 38℃, 5% CO₂ incubator에서 培養하였다. 培養液에 添加된 FSH水準은 ml當 0, 0.1, 1.0, 10 μ g으로 하였고 卵胞卵은 卵胞 크기를 1.5mm 以下와 以上 두 區로 區分하여 比較하였다.

5. 體外成熟程度의 判定

卵子の 體外培養後 成熟程度는 卵丘細胞의 膨化程度와 核成熟程度를 phase-contrast microscope下에서 관찰하였다. 卵丘細胞의 膨化는 Hensleigh와 Hunter(1985)의 方法에 따라 3 단계(0, +, ++)로 區分하였고 核成熟은 卵子를 acetic alcohol(1 : 3)로 2~3일간 固定한 후 0.1% aceto orcin으로 염색하여 Shea등(1976)의 方法에 따라 第1 減數分裂(中期 I, 後期 I, 終期 I)과 第2 減數分裂의 中期(metaphase II)로 區分하여 調査하였다.

6. 卵子の 體外受精能力의 調査

體外受精을 위하여 使用된 受精能獲得精子是 過排卵 처리된 암토끼에 수토끼를 2~3回 自然交尾시킨후 12~14時間 뒤에 사궁으로부터 精子를 回收하였다. 體外受精은 18時間 體外成熟시킨 卵子중에도 卵丘細胞의 膨化 또는 第1 極體를 가진 卵子에 精子 10⁶/ml를 注入한후 卵子培養과 같은 조건에서 14時間 계속 培養하였다.

受精與否를 알기 위하여 卵子는 2~3日間 acetic alcohol로 固定한 후 0.1% aceto orcin으로 염색하여 精子浸入, 前核形成與否를 調査하였다.

7. 卵胞液中的 호르몬 分析

Radioimmunoassay 方法에 準하여 estradiol-17 β 와 progesterone을 分析하였다.

III. 結果 및 考察

1. 卵胞卵의 回收率

HCG 注射後 16~18時間에 卵巢表面에 남아있는 正常卵胞의 크기별 卵胞數와 卵胞卵의 回收率은 表 2에서 보는 바와 같다.

直徑 1.5mm以下, 1.6~2.5mm 및 2.5mm 以上の 卵胞가 각각 4.8, 5.5 및 3.3개로서 總 13.6개였으며 직徑 1.6~2.5mm의 卵胞가 全體의 45.4%, 2.5mm以

上은 15%였다. 卵胞크기별로 회수된 卵胞回收率은 (1.5mm, 1.6~2.5mm 및)2.5mm卵胞에서 각각 65.3%, 57.8% 및 89.2%로서 全體平均 69.7%였고 큰 卵胞에서 다소 회수율이 높았다. 여기서 卵胞 크기별 分布는 Osteen과 Mills(1980)가 正常兔에서 交尾後 직徑 1.6mm以下와 以上인 卵胞比率이 41%와 59%라고 한 것과 유사한 결과였다. 한편 韓(1984)이 反復過排卵 成兔에서 1次 HCG 注射後 3日에 2mm以下の 卵胞가 11.6개, 2~3mm가 6.3개가 남아 있었으며 3次 過排卵後에도 3mm以下の 正常細胞가 15個 이상 존재함을 보고한 바 있는데 이는 過排卵 兔에서도 다수의 卵胞卵을 採卵利用할 수 있음을 보여준 結果라 하겠다.

Table 2. Recovery rate of follicular oocytes from visible follicles of various sizes in superovulated rabbits

Size of follicles(mm)	No. of remained follicles per rabbit(%)	Recovery rate of follicular oocytes		
		No. of follicles(A)	No. of collected ova(B)	Recovery rate (B/A, %)
<1.5	4.8 \pm 1.8(38.8)	28	19	65.3 \pm 9.3
1.6-2.5	5.5 \pm 1.2(45.4)	33	19	57.8 \pm 9.6
>2.5	3.3 \pm 2.0(15.8)	18	16	89.2 \pm 16.7
Total	13.6 \pm 1.5(100.0)	79	54	69.7 \pm 5.7

Tabular data are means \pm SE from 9 rabbits.

2. 卵胞卵의 體外成熟

卵胞 직徑이 1.5mm以下와 以上の 卵胞로부터 각각 回收된 卵子를 培養液內에 FSH 添加水準을 달리한 條件에서 18時間 培養했을 때 卵丘細胞의 膨化는 表3 과 같다.

0.1 μ g FSH/ml 수준에서 ++程度의 膨化를 보인 卵子比率이 88.2%로서 無添加區와 같았으나 1 μ g/ml 添加에서는 41.2%와 52.9%로서 현저히 낮았다. 그러나 卵胞크기 간에는 膨化程度에 差異가 없었다. 第2減數分裂 中期(metaphase II)를 보이는 卵子의 比率은 表4에서 보는 바와 같다. FSH 無添加區는 57.1%, 그리고 FSH 0.1, 1.0 및 10 μ g/ml를 添加할 경우 각각 61.5%, 43.8% 및 45%로서 1 μ g FSH/ml 以上에서는 中期II에 도달되는 卵子가 다소 적어졌다. 한편 FSH 添加區에서는 直徑 1.5mm以上인 卵胞卵이 1.5mm以下の 卵胞卵보다 成熟率이 다소 높은 경향을 보여주었다.

本 實驗에서 0.1 μ g FSH/ml以上 添加에서 卵丘細胞

의 膨化가 낮았던 結果는 Ball등(1983), Hensleigh와 Hunter(1985)가 牛에서, Moor등(1981)이 緬羊에서 각각 FSH 添加로 膨化가 增加하였다는 結果와는 일치하지 않았고, 한편 10 μ g FSH/ml에서 卵丘細胞의 膨化와 核成熟이 낮았던 것은 Moor와 Trounson(1977), Hensleigh와 Hunter(1985)와는 일치되었다. 특히 Sato등(1978), Leibfried와 First(1979) 및 Fukui등(1982)은 FSH가 核成熟에 절대 필요한 것은 아니라고 보고한 바 있으며 Oh와 Brackett(1975)는 토끼에서 FSH와 LH의 共同添加에서 成熟率이 증가됨을 보고하였다.

本 實驗에서 FSH 添加에서 일반적으로 成熟率이 向上되지 못하고 낮아진 것은 過排卵處理後 잔존해 있는 卵胞卵의 조건이 正常排卵후의 卵胞卵과 다소 다른데 기인된 것으로 추측된다. 왜냐하면 Moor와 Trounson(1977)은 退行卵胞卵의 體外成熟이 非退行卵胞卵보다 낮다고 하였고, Sato등(1977)은 機能的 黃體가 存在할 때 退行卵子가 많기 때문에 卵胞卵의 體外成熟이 낮다고 하였으며 Shea등(1984)은 PM-

Table 3. Effect of follicle stimulating hormone(FSH) on cumulus cells expansion of oocytes recovered from follicles of <1.5mm or >1.5mm in diameter

FSH (μ g/ml)	Size of follicles(mm)	No. of oocytes	No. of ova showing cumulus cells expansion			
			0	+	++	%++
0	<1.5	13	-	1	12	92.3
	>1.5	21	-	3	18	85.7
	Total	34	-	4	30	88.2
0.1	<1.5	6	-	1	5	83.3
	>1.5	11	-	1	10	90.9
	Total	17	-	2	15	88.2
1.0	<1.5	5	-	2	3	60.0
	>1.5	12	6	2	4	33.3
	Total	17	6	4	7	41.2
10.0	<1.5	7	-	3	4	57.1
	>1.5	10	2	3	5	50.0
	Total	17	2	6	9	52.9

Expansion of cumulus cells were classified by degree of expansion and subjectively scored according to the method of Hensleigh and Hunter(1985) as follows: 0 : was a small sized cumulus with 20% of the cells expanded : + : represented 21 to 60 % of the cells expanded, ++ : represented 61 to 100% of the cells expanded.

Table 4. Effect of follicle stimulating hormone(FSH) on nuclear maturation of oocytes from follicles of < 1.5mm or >1.5mm in diameter

FSH (μ g/ml)	Size of follicles(mm)	No. of oocytes	Stages of meiosis*			
			Metaphas I	Anaphase I or telophase I (late meiosis)	Metaphase II	% Metaphase II
0	<1.5	14	4	2	8	57.1
	>1.5	14	3	3	8	57.1
	Total	28	7	5	16	57.1
0.1	<1.5	5	2	1	2	40.1
	>1.5	8	0	2	6	75.0
	Total	13	2	3	8	61.5
1.0	<1.5	8	3	2	3	37.5
	>1.5	8	2	2	4	40.0
	Total	16	5	4	7	43.8
10.0	<1.5	10	4	3	3	30.0
	>1.5	10	3	1	6	60.0
	Total	20	7	4	9	45.0

*Criteria used for assessment of maturation were the same as the method of Shea et.al.(1976).

SG處理水準이 높을수록 體外成熟率이 낮다고 한 報告들이 있기 때문이다. 그러나 過排卵處理後의 卵胞卵의 體外成熟이 가능함은 Onuma와 Foote(1969), Bondioli와 Wright(1983)가 牛에서, Minato와 Toyoda(1982)는 PMSG 처리한 생쥐에서 보고한 바 있으며 특히 Schuetz(1974)는 卵子成熟이 卵子的 變性過程中에서도 늦게까지 消失되지 않음을 보고하였다. 直徑 1.5mm 以上の 卵胞卵이 다소 높은 體外成熟율을 보였던 結果는 Bae와 Foote(1975)가 토끼에서, Moor와 Trounson(1977)이 綿羊에서, Motlik등(1984)이 돼지에서 각각 中以下 크기의 卵胞보다 큰 卵胞의 卵子的 成熟率이 높다고 한 報告들과 일치되었다. 그러나 牛에서 Fukui와 Sakuma(1980), Leibfried-Rutledge 등(1984)은 卵胞 크기에 영향이 없다고 하였고 McGaughey등(1979)은 돼지에서 오히려 1~2mm의 卵胞卵이 더 成熟率이 높다고 하였다.

3. 體外成熟卵胞卵의 受精能力

卵胞크기의 區別없이 卵丘細胞의 膨化和 第1極體를 기준으로 하여 體外成熟의 증거를 보인 卵子를 體外受精시킨 결과 表5와 같은 結果를 얻었다. FSH 無添加區, 0.1 μ g FSH/ml 및 1.0 μ g FSH/ml區의 受精率이 18.7%, 17.6% 및 27.0%로서 有意性은 없었으나 1 μ g FSH/ml 添加에서 다소 높았는데 이는 表3과 4의 結果와는 일치되지 않았다. 그러나 Chang(1968)이 體外成熟率이 75~86%인 卵胞卵의 體外受精率이 35%였다고 한 것과 Iritani등(1978)이 60.6% 體外成熟에서 16.7%의 受精율을 보인 것과는 유사한 結果였다. 한편 Shea등(1976)이 토끼에서 60%의 體外成熟에서 體內受精으로 59%의 受精율을 보고한 점으로 보아 體外成熟卵胞卵의 受精율을 體內受精으로 比較됨이 보다 정확할 가능성도 있다.

Table 5. In vitro fertilization with in vivo capacitated sperm in matured follicular oocytes

Treatment (FSH)	No. of trials	No. of oocytes matured (A)	No. of ova penetrated by sperm	No. of ova with pronuclei (B)	%IVF (B/A)
0.0	3	16	7	3	18.7
0.1 μ g/ml	3	17	6	3	17.6
1.0 μ g/ml	3	11	5	3	27.0

4. 卵胞液中的 Progesterone과 Estradiol-17 β

過排卵토끼에서 HCG注射 16~18時間後의 卵胞크기별 卵胞液내 호르몬 水準은 表6과 같다. Progesterone水準은 卵胞크기에 따라 차이가 없이 67~71 μ g/ml이었고, estradiol-17 β 는 本實驗에서 측정 가능한계(25pg/ml)이하의 수준이었다.

Matson등(1981)도 PMSG 처리한 未成熟 hamster에서 첫 27-28hr에서는 progesterone의 큰 變化없이 0.25~1.06ng/follicle이라고 하였으며 Henderson

등(1982)는 牛에서 卵胞크기에 따라 estradiol의 차이는 있었으나 progesterone에는 차이가 없다고 하였다. 한편 Osteen과 Mills(1980)는 토끼에서 HCG注射日에는 卵胞內 steroid수준이 卵胞크기에 따라 一定하지 않으나 注射後 2日에서는 큰 卵胞에서 progesterone이 높다고 하였으며 Fujii등(1983)은 흰쥐에서 작은 卵胞에서 progesterone水準이 큰 것보다 높다고 하여 本實驗과 다른 결과를 보고하였다. 本實驗에서 卵胞內 steroid水準과 卵胞卵의 體外成熟과의 關係를 比較하지는 못하였다.

Table 6. Progesterone and estradiol-17 β in follicular fluid of different follicular sizes

Diameter of follicles	Progesterone(ng/ml)	Estradiol-17 β (pg/ml)
<1.5mm	67	<25
1.6-2.5mm	68	"
>2.5mm	71	"

IV. 摘要

過排卵 토끼에 있어서 卵胞卵의 體外成熟에 미치는 FSH의 添加效果 및 卵胞크기의 영향을 조사하기 위하여 本 實驗을 시도하였다. HCG 注射後 16~18時間에 卵胞크기별로 採卵된 卵子를 FSH(0, 0.1, 1.0, 10 μ g/ml)가 添加된 修正 Ham's F₁₂ 培養液에서 18時間 배양후 卵丘細胞의 膨化와 核成熟을 調査하였으며 體內受精能獲得精子와의 體外受精에 의하여 受精能力을 比較하였다.

1. 直徑 (1.5mm, 1.6~2.5mm 및 >2.5mm)의 卵胞數는 각각 4.8(38.8%), 5.5(45.4%) 및 3.3(15.8)였다. 平均 卵子回收率은 69.7%였고 큰 卵胞에서 回收率이 다소 높았다.

2. 0.1 μ g FSH/ml 添加에서 卵丘細胞의 膨化는 對照區와 같았고 그 이상의 添加에서는 膨化가 저하되었다. 核成熟에서 中期II에 도달된 卵子の 比率은 0, 0.1, 1.0 및 10.0 μ g FSH/ml 添加에서 각각 57.1, 61.5, 43.8 및 45.0%였으며 큰 卵胞의 卵胞卵이 다소 높은 核成熟을 보였다.

3. 成熟卵胞卵의 體外受精能力은 1 μ g/ml 添加에서 27%로 다른 區보다 높았으나 有意性은 없었다.

4. 卵胞中の progesterone 水準은 67~71ng/ml로 卵胞크기간에 차이가 없었으며 estradiol-17 β 은 모두 25pg/ml 以下였다.

V. 引用文獻

1. Bae, I.H. and R.H. Foote, 1975. Effects of hormones on the maturation of rabbit oocytes recovered from follicles of various sizes. *J. Reprod. Fert.*, 42: 357.
2. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R.L. Ax, B.D. Bavister and N.L. First, 1983. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.*, 28: 717.
3. Bondioli, K.R. and R.W. Wright, 1983. In vitro fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated in vitro. *J. Anim. Sci.*, 57: 1001.
4. Chang, M.C. 1955. The maturation, activation, fertilization and subsequent development in the Fallopian tubes. *J. Exp. Zool.*, 128: 379.
5. Chang, N.C. 1968. Reproductive phenomena

preceding implantation. In; R.M. Wynn, ed., *Fetal homeostasis*, vol. 3, Proc. 3rd Conf., Appleton-Century-Crofts, New York, N.Y.

6. Channing, C.P., S.H. Pomerantz, I.H. Bae, V.W. Evans and S.J. Atlas. 1982. Actions of hormones and other factors upon oocyte maturation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 147: 189.
7. Dooley, V.D. 1984. Follicular oocyte maturation for use in bovine xenogenous and in vitro fertilization. *Diss. Abst. Int.*, B (Sci. and Eng.) 44: 3582.
8. Fujii, T., D.J. Hoover and C.P. Channing, 1983. Changes in inhibin activity and, progesterone, oestrogen and androstenedione concentrations, in rat follicular fluid throughout the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.*, 69: 307.
9. Fukui, Y., M. Fukushima, Y. Terawaki and H. Ono. 1982. Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation in vitro. *Theriogenol.*, 18: 161.
10. Fukui, Y. and Y. Sakuma, 1980. Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: Relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biol. Reprod.*, 22: 669.
11. Grimes, R.W., P. Matton and J.J. Ireland, 1985. The relationship of concentration of steroids in follicular fluid to atresia and oocyte maturation in vitro. *Biol. Reprod.*, 32 (Suppl 1): 136.
12. Henderson, K.M., A.S. McNeilly and I.A. Swanton. 1982. Gonadotrophin and steroid concentrations in bovine follicular fluid and their relationship to follicle size. *J. Reprod. Fert.*, 65: 467.
13. Hensleigh, H.C. and A.G. Hunter, 1985. In vitro maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent in vitro fertilization and cleavage. *J. Dairy Sci.*, 68: 1456.
14. Iritani, A., K. Niwa and H. Imai, 1978. Sperm penetration in vitro pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 54: 379.
15. Leibfried, L. and N.L. First, 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.*, 48: 76.
16. Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Critser and N.L. First, 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J.*

- Anim. Sci., 48: 76.
16. Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Critser and N.L. First, 1984. Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicles. *Theriogenol.*, 23: 753.
 17. McGaughey, R.W. 1979. The culture of pig oocytes in minimal medium, and the influence of progesterone and estradiol-17 γ on meiotic maturation. *Endocrino.*, 100: 39.
 18. McGaughey, R.W., D.H. Montgomery and J.D. Richter, 1979. Germinal vesicle configurations and patterns of polypeptide synthesis of porcine oocytes from antral follicles of different size as related to their competency for spontaneous maturation. *J. Exp. Zool.*, 209: 239.
 19. Matson, P.L., J.P.P. Tyler and W.P. Collins, 1981. Follicular steroid content and oocyte meiotic status after PMSG stimulation of immature hamsters, *J. Reprod. Fert.*, 61: 443.
 20. Minato, Y. and Y. Toyoda, 1982. Fertilizing ability of mouse oocytes matured in vitro. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 28: 134.
 21. Motlik, J., N. Crozet and J. Fulka, 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fert.*, 72: 323.
 22. Moor, R.M., J.C. Osborn, D.G. Cran and D.E. Walters, 1981. Selective effect of gonadotropins on cell coupling, nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 16: 347.
 23. Moor, R.M. and A.O. Trounson, 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent development capacity, *J. Reprod. Fert.*, 49: 101.
 24. Oh, Y.K. and B.G. Brackett, 1975. Ultrastructure of rabbit ova recovered from ovarian follicles and iseminated in vitro. *Fert. Steril.*, 26: 665.
 25. Onuma, H. and R.H. Foote, 1969. In vitro development of ova from prepuberal cattle. *J. Dairy Sci.*, 52: 1085.
 26. Osteen, K.G. and T.M. Mills, 1980. Changes in the size, distribution and steroid content of rabbit ovarian follicles during early pregnancy, *Biol. Reprod.*, 22: 1040.
 27. Richter, J.D. and R.W. McGaughey, 1979. Specificity of inhibition by steroids of porcine oocytes maturation in vitro. *J. Exp. Zoo.*, 209: 81.
 28. Sato, E., A. Iritani and Y. Nishikawa, 1977. Factors involving in maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured in vitro. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 23: 12.
 29. Sato, E., A. Iritani and Y. Nishikawa, 1978. Maturation and activation of pig and cattle follicular oocytes cultured in vitro. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 49: 236.
 30. Schuetz, A.W. 1974. Role of hormones in oocyte maturation. *Biol. Reprod.*, 10: 150.
 31. Shea, B.F., R.D. Baker and J.P.A. Latour, 1976. Maturation in vitro of rabbit follicular oocytes. *Can. J. Anim. Sci.*, 56: 377.
 32. Shea, B.F., R. E. Janzen and R. McAlister, 1984. Recovery and fertilization of bovine follicular oocytes. *Theriogenol.*, 19: 385.
 33. Thibault, C.G. 1972. Final stages of mammalian oocyte maturation. In: J.D. Biggers and A.W. Schuetz, eds. *Oogenesis*, University Park Press, Baltimore, Md.
 34. Thibault, C.G. 1977. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? *J. Reprod. Fert.*, 51: 1.
 35. Tsafiriri, A. 1978. Oocyte maturation in mammals. In: R.R. Jones, ed., *The Vertebrate Ovary*, pp. 409-442, Plenum Press, New York.