

形態の異なる牛卵胞内卵子の体外成熟および体外受精に関する研究

川崎陽子*・菱沼 貢*・大浦良三*・関根純二郎*

平成11年6月25日受付

*鳥取大学農学部畜産学教室

In Vitro Maturation and Fertilization of Bovine Follicular Oocytes with Various Morphologies

Yoko Kawasaki*, Mitsugu Hishinuma*, Ryozo Oura*, Junjiro Sekine*

*Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680-8553, Japan

The object of this study was to evaluate the abilities of bovine oocytes with various morphologies for maturation and fertilization *in vitro*. Oocytes were collected from follicles with 2-6 mm in diameter and classified into five groups: (1) oocytes with homogeneous ooplasm and surrounded by compact and complete cumulus layer, (2) oocytes with heterogeneous ooplasm and surrounded by complete cumulus layer, (3) oocytes surrounded by fully, irregularly expanded cumulus with clumped cells in a jelly matrix, (4) oocytes without cumulus layer and (5) oocytes not categorized into former four groups. The rates of maturation and normal fertilization of the oocytes with heterogeneous ooplasm were higher than those with homogeneous ooplasm ($P < 0.05$). The oocytes with heterogeneous ooplasm showed dispersion of cytoplasmic granules during maturation culture. The oocytes with expanded cumulus and nude oocytes showed lower maturation and fertilization rates than those with homogeneous ooplasm ($P < 0.05$).

(Received 25 June, 1999)

Key words: bovine oocyte, in vitro fertilization, in vitro maturation

緒言

獣医畜産分野において体外受精技術は、体外受精由来の胚を移植して優秀な遺伝形質を持つ家畜の子孫を増産するだけでなく、クローニングや遺伝子導入に必要な卵子の作出あるいは胚を多数供給する手段としても重要な基礎技術として注目されている。しかし、牛の体外受精における産

子作出の成績は未だ低く、その原因の一つとして、卵胞内卵子の体外における成熟、受精および発生能を予測する方法が確立されていないことがあげられる [16]。

現在、牛の体外受精には、Leibfried and First [15] の報告した卵細胞質が均質で卵丘細胞が緊密に付着した卵子が一般的に用いられている。しかし、牛卵巢の胞状卵胞からはさまざまな形態の卵子が採取され、これまでに、卵細

胞質の状態 [1, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 26] や卵丘細胞の卵子への附着状態 [1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 28, 29] を基に卵子を分類し、成熟培養成績や受精成績が調べられている。近年、桃沢と福田 [18] や永野ら [20-22] は、卵細胞質が不均質な卵子が均質な卵子と同程度の体外受精能を有することを報告した。この所見がさらに実証され、細胞質が不均質な卵子を有効に利用することができれば、体外受精の成績向上につながると考えられる。

そこで本実験では、牛卵胞内卵子を形態別に4群に分類し、体外成熟能と受精能を調べて卵細胞質が均質な卵子との比較を行った。

材料および方法

1. 牛卵巣および卵子の採取

鳥取県名和食肉センターにおいて屠殺されたホルスタイン種、黒毛和種およびそれらの雑種の雌牛から卵巣を採取した。卵巣は、屠殺後2時間以内に37℃の滅菌生理食塩水に浸漬し、4時間以内に実験室に持ち帰った。卵巣表面の血液および水分を滅菌ペーパータオルで拭き取った後、18ゲージの注射針を接続した10 mlの注射筒を用いて、直径2~6 mmの小卵胞から未成熟卵子を卵胞液と共に吸引採取した。

卵子の分類：卵子を修正タイロッド液 (TALP) [4] に移し、実体顕微鏡下で卵子の形態を観察した。卵細胞質と卵丘細胞の状態によって、(1)細胞質が均質で緊密な卵丘細胞に覆われているもの (均質卵子)、(2)顆粒の凝集が認められるため細胞質が不均質であり、卵丘細胞に覆われているもの (顆粒状卵子)、(3)卵丘細胞が塊を形成しながら膨化・拡散してクモの巣状を呈しているもの (クモの巣状卵子)、(4)卵丘細胞が全く附着していないもの (裸化卵子)、(5)以上の範疇に入らないもの (卵丘細胞が一部しか附着していない卵子や卵細胞質が崩壊している変性卵子) に分類した。

2. 体外成熟

卵子の体外成熟培養はTakahashi and First [27] に従って実施した。すなわち、25 mM HEPESを含むTCM199 (Gibco) に10%非動物胎牛血清 (Gibco)、0.2 mM ピルビン酸ナトリウム (Sigma)、50 μ g/ml 硫酸ゲンタマイシン (Sigma)、0.02 IU/ml 卵胞刺激ホルモン (Sigma) および1 μ g/ml エストラジオール-17 β (Sigma) を添加した培地を卵子の体外成熟に用いた。成熟用培地50 μ lの微小滴を直径60 mmのプラスチックシャーレ (Falcon 1007, Becton Dickinson) に作成し、パラフィンオイル (アミノ酸分析用流動パラフィン、ナカライテスク) を重層した。

この微小滴中に卵子を原則として10~15個ずつ浮遊させ、39℃、5%炭酸ガスを含む空気湿度飽和気相からなる炭酸ガス培養装置内 (MCO-96, 三洋) で22時間培養した。

成熟率の判定：卵子の核を観察するためにホールマウント標本を作成した。ボルテックスミキサーによる振盪とガラスピペットでのピペッティングによって卵子周囲に附着している卵丘細胞を完全に除去した。卵丘細胞を除去した卵子をスライドガラス上に移動し、カバーガラスを掛けて固定液 (エタノール：酢酸 = 3 : 1) に一晩浸漬し固定した。固定した卵子は1%酢酸オルセインで染色し、アセトグリセロール (酢酸：グリセロール：蒸留水 = 1 : 1 : 3) で脱色した後、位相差倒立顕微鏡を用いて観察した。

核相の判定は以下の通りに行った。核膜が明瞭で核内に染色質を認める卵子を卵核胞期 (GV)、核膜が完全に崩壊し、染色質が凝集しているものを卵核胞崩壊期 (GVBD) とした。第一極体を放出せずに、染色体が赤道面に配列している卵子を第一成熟分裂中期 (M I)、染色体が赤道面から離れ、両極に移動しているものを第一成熟分裂後期から終期 (A I ~ T I) と判定した。第一極体を放出し、染色体が赤道面に配列している卵子を第二成熟分裂中期 (M II) とし、培養22時間後にM IIに達しているものを「成熟」として判定した。

3. 体外受精 (媒精)

1頭の黒毛和種雄牛 (名号：豊松) から採取し、0.5 ml プラスチックストロー内で凍結された精液を体外受精に使用した。

精子の洗浄と受精はTakahashi and First [27] に従って実施した。凍結精液は、プラスチックストローを37℃の温湯中に約30秒間浸漬することによって融解した。プラスチック遠沈管に90%パーコール溶液 (Percoll, Pharmacia) 2 ml、45%パーコール液2 ml およびストロー1本分の融解精液を順に重層し、室温下、700 \times gで20分間遠心した。上清を除去した後、Brackett and Oliphant [6] の等張液からウシ血清アルブミン (BSA) を除去し、抗生物質を50 μ g/ml 硫酸ゲンタマイシンに修正した溶液 (BO液) [29] 5~6 ml を加え、500 \times gで5分間遠心洗浄した。上清を除去した後、沈渣の精子数を測定し、精子濃度が10 \times 10⁶個/mlとなるようにBO液で希釈して精子浮遊液を作成した。

6 mg/ml BSA (fatty acid-free BSA, Sigma)、10 μ g/ml ヘパリン (Sigma) および5 mM テオフィリン (Sigma) を加えたBO液50 μ lの微小滴を直径35 mmのプラスチックシャーレ (Falcon 1008, Becton Dickinson) に作成し、パラフィンオイルを重層した。この微小滴に上記の精子浮遊BO液を50 μ l加えて最終精子濃度を5 \times

10⁶個/mlとしたものを授精用培地として用いた。授精用培地 100 μ l の微小滴に成熟培養後の卵子を原則として10~15個ずつ浮遊させ、39℃、5%炭酸ガス、5%酸素および90%窒素ガス条件下 (BL-40M、十慈化学工業) で18時間精子と共培養した。

受精率の判定：ホールマウント標本を作成して、総受精率、正常受精率および多精子侵入率を調べた。卵子内への精子の侵入は、雌性および雄性前核の形成とそれに対応する精子尾部の確認、あるいは膨化した精子頭部の確認により判定した。雌性および雄性前核一対とそれに対応する精子の尾部を確認できた卵子は正常受精と判定し、3個以上の前核あるいは膨化した精子頭部と2本以上の精子尾部を確認できた卵子は多精子侵入卵子と判定した。

4. 統計処理

さまざまな形態を示す卵子の発育率 (成熟率)、総受精率、正常受精率および多精子侵入率をカイ二乗検定により比較検討した。統計処理には、Stat View 4.0J (Abacus Concepts) を使用し、 $P < 0.05$ の場合には統計学的に有意差があると判定した。

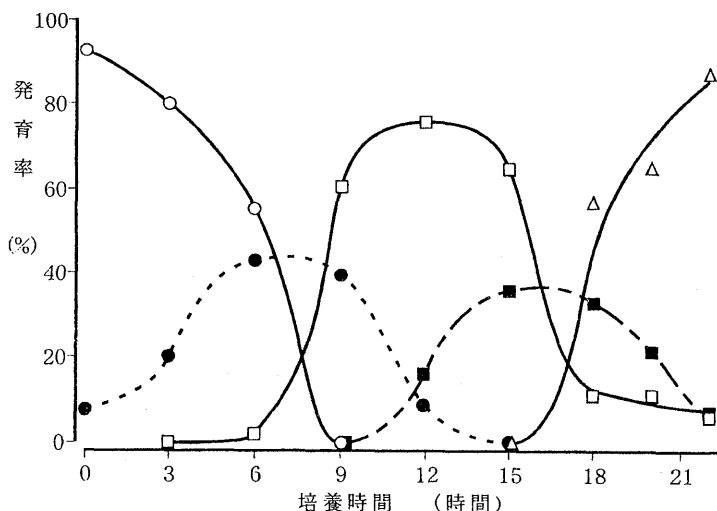
結果

卵巣14個から卵子を採取した結果、小卵胞からの卵子の

回収率は85.6% (237/277) であった。回収された卵子のうち、均質卵子は10.1%で、顆粒状卵子、クモの巣状卵子および裸化卵子もほぼ同じ割合 (それぞれ11.4、11.0および10.1%) で採取された。卵丘細胞が一部しか付着していない卵子や変性した卵子の割合は57.4%であった。

均質卵子の成熟過程を第1図に示した。培養前 (0時間) はほとんどの卵子 (92.6%) がGVで、9から15時間目にかけてMIの割合が最も高く (12時間: 75.7%)、18時間目からMIIが急に増加して、最終的に22時間目では87.2%の卵子がMIIになった。

成熟培養前および22時間後における均質卵子、顆粒状卵子、クモの巣状卵子および裸化卵子の核相を表1に示した。培養前では、均質卵子および顆粒状卵子の80%以上がGVであったのに対し、クモの巣状卵子と裸化卵子ではGVの割合が有意に低く ($P < 0.01$)、GVBDの割合が有意に高かった ($P < 0.01$)。クモの巣状卵子ではMIIが4.0%存在していた。培養後の成熟率は、均質卵子と顆粒状卵子がクモの巣状卵子および裸化卵子に比べて有意に高い値を示し ($P < 0.01$)、特に顆粒状卵子の成熟率は92.0%と最も高かった (第1表)。クモの巣状卵子と裸化卵子では、成熟培養後にそれぞれ8.0および6.3%が変性していた。全ての形態において、MIIの次に割合が高かったのはMIであった。



第1図 均質卵子の成熟培養における核の経時的変化

○—○：卵核胞期 (GV)、●---●：卵核胞崩壊期 (GVBD)、□—□：第一成熟分裂中期 (MI)、■---■：第一成熟分裂後期~終期 (AI~TI)、△—△：第二成熟分裂中期 (MII)。

各培養時間での検査卵子数は67~282個。変性卵子は除外した。

第1表 形態の異なる卵子の成熟培養成績

培養時間 (hr)	卵子の 形態	培養 卵子数	発育率 (%)					Deg.
			GV	GVBD	MI	AI~TI	MII	
0	均質	105	82.9 ^a	16.2 ^a	0.9 ^a	0	0	0
	顆粒状	90	81.1 ^a	17.8 ^a	1.1 ^a	0	0	0
	クモの巣状	50	30.0 ^b	44.0 ^b	16.0 ^b	6.0	4.0	0
	裸化	66	45.4 ^b	45.5 ^b	1.5 ^a	0	0	7.6
22	均質	150	0	0.7 ^a	10.0 ^{ab}	8.0 ^{ab}	81.3 ^b	0 ^a
	顆粒状	100	0	1.0 ^a	5.0 ^a	3.0 ^a	92.0 ^a	0 ^a
	クモの巣状	75	2.7	14.6 ^b	14.7 ^b	5.3 ^{ab}	54.7 ^c	8.0 ^b
	裸化	63	3.2	14.3 ^b	28.6 ^c	14.3 ^b	33.3 ^d	6.3 ^b

GV : 卵核胞期、GVBD : 卵核胞崩壊期、MI : 第一成熟分裂中期、AI~TI : 第一成熟分裂後期~終期、
MII : 第二成熟分裂中期、Deg. : 変性。

5~10回繰り返して行った実験で得られたデータを合計して表示。

a, b, c, d : 0および22時間において同一列で異符号間に有意差あり (P < 0.05)。

第2表 顆粒状卵子における成熟培養後の凝縮顆粒の有無と成熟率との関係

卵細胞質内の顆粒			発育率 (%)					Deg.
培養前	培養後	培養卵子数	GV	GVBD	MI	AI~TI	MII	
+	-	222	0	0 ^a	0.9	5.0	94.1 ^a	0
+	+	12	0	83.3 ^b	0	0	16.7 ^b	0

10回繰り返して行った実験で得られたデータを合計して表示。

a, b : 同一列で異符号間に有意差あり (P < 0.01)。

第3表 形態の異なる卵子の授精成績

卵子の形態	授精卵子数	総受精率 (%)	正常受精率 (%)	多精子侵入率 (%)
均質	239	84.1 ^b	75.3 ^b	8.9 ^a
顆粒状	123	95.9 ^a	84.6 ^a	11.4 ^a
クモの巣状	84	55.9 ^c	33.3 ^c	22.6 ^b
裸化	52	26.9 ^d	23.1 ^c	3.8 ^a

2~10回繰り返して行った実験で得られたデータを合計して表示。

a, b, c, d : 同一列で異符号間に有意差あり (P < 0.05)。

顆粒状卵子において、成熟培養後に細胞質内の凝集顆粒の消失が94.9% (222/234) で認められた。第2表に示すように、成熟培養後、凝集顆粒が消失した卵子の成熟率は94.1%で、凝集顆粒の残っているもの(16.7%)に比べ有意に高い値を示した ($P < 0.01$)。顆粒が残っているほとんどの卵子は、発育がGVBDで停止していた。

形態別に卵子を授精した結果を第3表に示した。総受精率は顆粒状卵子、均質卵子、クモの巣状卵子および裸化卵子の順に有意に高かった ($P < 0.05$)。正常受精率は顆粒状卵子と均質卵子(それぞれ84.6および75.3%)がクモの巣状卵子と裸化卵子(それぞれ33.3および23.1%)よりも有意に高く ($P < 0.01$)、特に顆粒状卵子は均質卵子よりも高い値を示した ($P < 0.05$)。多精子侵入率は、クモの巣状卵子で22.6%であり、他の卵子より有意に高かった ($P < 0.05$)。

考 察

牛においては、1回の発情周期中に、卵胞発育波 (follicular wave) と呼ばれる卵胞の発育様式が2~3回存在することが知られている [14]。卵胞発育波は、リクルート期、セレクション期およびドミナント期に分かれており、リクルート期では原始卵胞から多数の胞状卵胞の発育が起こり、セレクション期では性腺刺激ホルモンに反応して卵胞がさらに発育を続け、ドミナント期では1個の卵胞(主席細胞)がさらに大きくなり他の卵胞の発育を抑制する。したがって、卵胞発育波の時期によっては、退行・閉鎖に向かっている多数の卵胞から卵子を採取し、体外受精に使用している可能性もある。

均質卵子の成熟過程を調べるために3時間ごとに核相を観察した結果、以前の研究 [10, 19, 24, 25, 29] と同様な成績が得られた。均質卵子の体外成熟率は81.3% (第1表)、正常受精率は75.3% (第3表) であり、これは桃沢と福田 [18] の結果とほぼ一致した。

顆粒状卵子の細胞質内顆粒については、超微形態を調べた報告 [8, 23] から卵細胞質内の脂肪滴が実体顕微鏡下では黒色の顆粒に見えることがわかっている。本実験では、成熟培養によってほとんどの顆粒状卵子 (94.9%) で細胞質内顆粒は消失したが、一部の卵子 (5.1%) では凝集顆粒が残存していた (第2表)。そこで、これらの卵子について成熟率を比較したところ、凝集顆粒の消失した卵子は94.1%がM IIに到達したのに対し、凝集顆粒の残っている卵子のほとんどがGVBDで停止していた。この結果から、卵細胞質の成熟には、細胞質内の凝集顆粒が分散、つまり肉眼的には消失する過程を伴うことが判明した。本実験では、

顆粒状卵子は均質卵子に比べて成熟率と正常受精率が高かった。しかし、成熟培養において凝集顆粒が分散しなかった顆粒状卵子は、成熟が停止するために正常受精率が低下することが予測された。

卵細胞質内に見られる凝集顆粒の分散は、卵子の正常な成熟過程でもあり、また一方でpseudomaturationという変性過程でもありと考えられている [8]。Asato [2] は、卵胞発育波においてセレクション期に顆粒状卵子が多く採取されると報告している。これらのことから、顆粒状卵子はリクルート期からセレクション期にかけて発育しつつある卵子、あるいは選択されず退行しつつある卵子であると考えられる。しかし、卵胞内における顆粒状卵子(顆粒の凝集)と均質卵子(顆粒の分散あるいは非凝集)の関係は明らかではなく、卵胞の発育・閉鎖と卵子の形態に関してさらに検討する必要があると思われる。

クモの巣状卵子のうち、成熟培養開始時に卵子の核相がGVであるものは30.0%しか存在せず、M I ~ M IIに達しているものは26.0%も存在した (第1表)。クモの巣状卵子は均質卵子や顆粒状卵子よりも卵胞内で成熟あるいはpseudomaturationが進んだ状態にあることが示された。卵丘細胞の正常な膨化は、卵子の成熟の指標の一つと考えられている [11]。しかし、本実験ではクモの巣状卵子は培養途中で発育停止や変性したものが多かった。したがって、卵丘細胞の膨化は卵子の成熟と変性という2通りの過程に付随しており、卵子が正常に成熟しなかった場合には卵丘細胞がクモの巣のように塊を形成しつつ膨化すると思われた。また、クモの巣状卵子の多精子侵入率が他の卵子に比べて高かったことから (第3表)、卵子の多精子受精防御機能の低下が示唆された。

裸化卵子では、培養前のGVの割合が45.4%と低く、培養後の成熟率は33.3%で最も低かった (第1表)。卵子の成熟には卵丘細胞の存在が重要であるという報告 [11, 15, 30] があり、本実験の結果はそれらの結果と一致した。また、裸化卵子の正常受精率は23.1%で最も低かったことから (第3表)、成熟と受精を通して卵丘細胞の重要性が示された。

本実験の結果より、卵胞から卵子を採取した際に、卵丘細胞が緊密に付着しており、卵細胞質が均質な卵子は正常な成熟過程にある卵子であり、顆粒状卵子は正常な成熟過程あるいは変性過程にある卵子、そしてクモの巣状卵子および裸化卵子は変性過程にある卵子と考えられた。また、顆粒状卵子の多くは均質卵子よりも優れた成熟能および受精能を有しており、凝集していた細胞質内顆粒が卵子の成熟過程で分散することが示された。今後は、胚の発生培養と移植によって顆粒状卵子の体外および体内での発育能を

検討する必要があると思われる。

謝 辞

本実験で使用した牛卵巣と凍結精液をそれぞれ御提供下さいました鳥取県食肉衛生検査所ならびに鳥取県畜産試験場の関係者各位に感謝いたします。

文 献

- 1) Araki, N., Sato, K., Hayashi, K., Miyamoto, A. and Fukui, Y.: Relationship among follicular fluid estradiol-17 β concentration, morphology of cumulus-oocyte complex and developmental capacity of individually matured, fertilized and cultured bovine oocytes *in vitro*. J. Reprod. Dev., 44: 359-365 (1998)
- 2) Asato, M.: Morphology of bovine oocytes collected from antral follicles and their developmental competence after *in vitro* fertilization. Jpn. J. Vet. Res., 44: 46-47 (1996)
- 3) Ball, G. D., Leibfried, M. L., Lenz, R. W., Ax, R. L., Bavister, B. D. and First, N. L.: Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod., 28: 717-725 (1983)
- 4) Bavister, B. D., Leibfried, M. L. and Lieberman, G.: Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. Biol. Reprod., 28: 235-247 (1983)
- 5) Blondin, P. and Sirard, M. A.: Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. Mol. Reprod. Dev., 41: 54-62 (1995)
- 6) Brackett, B. G. and Oliphant, G.: Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12: 260-274 (1975)
- 7) De Loos, F., Van Maurik, P., Van Beneden, T. and Kruip, T. A. M.: Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 31: 208-214 (1992)
- 8) De Loos, F., Van Vliet, C., Van Maurik, P. and Kruip, T. A. M.: Morphology of immature bovine oocytes. Gamete Res., 24: 197-204 (1989)
- 9) Fukui, Y.: Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 26: 40-46 (1990)
- 10) Fukui, Y., Fukushima, M. and Ono, H.: *In vitro* maturation of bovine oocytes recovered from follicles of various sizes. Res. Bull. Obihiro Univ., 14: 211-217 (1985)
- 11) Fukui, Y. and Sakuma, Y.: Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. Biol. Reprod., 22: 669-673 (1980)
- 12) Hawk, H. W. and Wall, R. J.: Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. Theriogenology, 41: 1571-1583 (1994)
- 13) Hazeleger, N. L., Hill, D. J., Stubbings, R. B. and Walton, J. S.: Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. Theriogenology, 43: 509-522 (1995)
- 14) Ireland, J. J. and Roche, J. F.: Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle; *in* Follicular Growth and Ovulation Rate in Farm Animals, ed. Roche, J. F. and O'Callaghan, D., Martinus Nijhoff, The Hague (1987) pp. 1-18
- 15) Leibfried, L. and First, N. L.: Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. J. Anim. Sci., 48: 76-86 (1979)
- 16) Leibfried-Rutledge, M. L.: Factors determining competence of *in vitro* produced cattle embryos. Theriogenology, 51: 473-485 (1999)
- 17) Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S. and First, N. L.: Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. Biol. Reprod., 35: 850-857 (1986)
- 18) 桃沢健二・福田芳詔: 卵細胞質が不均一なウシ卵母細胞の体外における成熟能と受精能. 日畜会報, 66: 605-609 (1995)
- 19) Motlik, J., Koefoed-Johnsen, H. H. and Fulka, J.: Breakdown of the germinal vesicle in bovine oocytes cultivated *in vitro*. J. Exp. Zool., 205: 377-388 (1978)
- 20) 永野昌志・安里 誠・高橋芳幸・菱沼 貢・金川弘

- 司：形態の異なるウシ卵胞卵子の体外受精および発育能。北海道牛受精卵移植研究会会報, 15: 24-28 (1996)
- 21) 永野昌志・高橋芳幸・菱沼 貢・金川弘司：ウシ卵胞卵子の細胞質の差異による体外成熟後の体外受精率と体外発育率。北海道牛受精卵移植研究会会報, 13: 4-7 (1994)
- 22) Nagano, M., Takahashi, Y. and Katagiri, S.: *In vitro* fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters. J. Vet. Med. Sci., 61: 531-535 (1999)
- 23) 永野昌志・高橋芳幸・片桐成二・金川弘司：ウシの胞状小卵胞から回収した未成熟卵子の超微形態。北海道牛受精卵移植研究会会報, 17: 1-6 (1998)
- 24) 佐藤英明・入谷 明・西川義正：ウシ卵胞卵子の体外成熟および活性化現象について。日畜会報, 49: 236-242 (1978)
- 25) Sirard, M. A., Florman, H. M., Leibfried-Rutledge, M. L., Barnes, F. L., Sims, M. L. and First, N. L.: Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. Biol. Reprod., 40: 1257-1263 (1989)
- 26) Suzuki, H., Presicce, G. A. and Yang, X.: Differential surface ultrastructural characteristics and volumetric dynamics of bovine oocytes during maturation *in vivo* versus *in vitro*. J. Mamm. Ova Res., 15: 49-62 (1998)
- 27) Takahashi, Y. and First, N. L.: *In vitro* fertilization of bovine oocytes in the presence of theophylline. Anim. Reprod. Sci., 34: 1-18 (1993)
- 28) Van Blerkom, J., Bell, H. and Weipz, D.: Cellular and developmental biological aspects of bovine meiotic maturation, fertilization, and preimplantation embryogenesis *in vitro*. J. Electron Microsc. Tech., 16: 298-323 (1990)
- 29) Xu, K. P., Greve, T., Smith, S. and Hyttel, P.: Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation *in vitro*. Acta Vet. Scand., 27: 505-519 (1986)
- 30) Zhang, L. I., Jiang, S., Wozniak, P. J., Yang, X. and Godke, R. A.: Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 40: 338-344 (1995)