

発生培養液への血清添加時期が ウシ体外受精由来胚の発育に与える影響

成 田 真 知・堂 地 修・小 山 久 一

Effect of the timing of calf serum supplementation in culture medium on the development of in vitro-produced bovine embryos

Machi NARITA, Osamu DOCHI and Hisaichi KOYAMA
(October 2001)

緒 言

近年、ウシの体外受精技術は進展し、育種改良の手段として期待されるとともに、生物学的な研究手段の一つとして利用されている。育種改良へ有効利用するためには、安定した良質な胚の生産や耐凍性の向上が必要である。これまでウシ胚の培養には体細胞との共培養が必要とされ⁶⁾、共培養法についての研究が行われてきた^{4,7)}。しかし、共培養は細胞の採取・培養に手間がかかり、一定の条件で発生培養を行うことが出来ない^{15,16)}。そのため近年、共培養を必要としない培養液が開発されている^{21,30)}。さらにこれらの培養液に、細胞成長因子^{12,27)}や抗酸化剤¹⁴⁾などの添加によって体外受精卵の胚盤胞への発育が向上することが報告されている。

また、ウシの体外受精において、発生培養液への血清添加がウシ体外受精卵の胚盤胞への発育に有効であることが数多く報告されている^{11,15,16,19,31)}。血清には、多種・多量のタンパク、脂質、各種アミノ酸、糖、ビタミン、無機塩、各種ホルモン様物質や各種細胞成長因子が含まれている^{26,32)}。血清の主な作用は、栄養物質の供給であるが³³⁾、血清が体外受精卵のどの発育段階にどのような影響を与えているかは明らかになっていない。一方、血清添加培地で培養した胚は血清無添加培地で培養した胚よりも耐凍性の劣ることが報告されている^{8,23,25)}。

そこで、本研究ではCR1aa²¹⁾を発生培養液として用い、子ウシ血清の添加時期がウシ体外受精卵の発育に与える影響を明らかにするために、発生培養開始後0時間目と48時間目に子ウシ血清を添加し、その後の胚の発育および凍結・融解後の生存性に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

1. 供試卵子

食肉処理場で採取したウシ卵巢を、26℃に加温した0.1 mg/ml 硫酸カナマイシン添加滅菌生理食塩水に入れて、実験室に持ち帰った。卵巢は同生理食塩水で2回洗浄した後、卵巢表面の余分な水分および血液を滅菌紙で拭き取った。次に18 Gの注射針を装着した5 mlのシリンジにあらかじめ3%子ウシ血清(CS)添加修正ダルベッコリン酸緩衝液(PBS)を約1 ml吸引し、卵巢の直径3~5 mmの卵胞より未成熟卵子を吸引採取した。採取した卵子は3%CS加PBSで5回、成熟培養液で3回洗浄した。体外成熟培養には、細胞質が均一で卵丘細胞が数層緊密に付着している未成熟卵子を用いた。

2. 成熟培養

卵子の成熟培養液には、0.02 mg/ml 卵胞刺激ホルモン(FSH; アントリン, デンカ製薬)および5% CS添加ヘパース緩衝TCM-199 (Gibco, 12340-030)を用いた。未成熟卵子は60 mmプラスチックシャーレ (Falcon, 1007)に50 μ lの成熟培養液のドロップを作成して、流動パラフィン (ナカライテクス)で覆ったものに20個ずつ導入して培養した。成熟培養は38.5℃, 5%CO₂, 95%空気の条件下で20~21時間行った。

3. 体外受精

体外受精には1頭のホルスタイン種雄牛の凍結精液を用いた。凍結精液は37℃の温湯中に30秒間浸漬して融解した。凍結精液はTakahashi *et al.*²⁸⁾の方法に準じて、パーコール密度勾配法により洗浄し

た。パーコール溶液（ファルマシア）および10倍濃度のBO液¹⁾を用い90%パーコール溶液、90%パーコール溶液と1倍濃度のBO液¹⁾を同量ずつ混合して45%パーコール溶液を作成し、15 mlのプラスチック試験管に90%パーコール溶液2 mlおよび45%パーコール溶液2 mlを重ねた。融解した精液は、45%パーコール溶液の上に重ね、2,000 rpmで20分間遠心分離を行い、上清をアスピレーターで吸引・除去した。精子の受精能獲得誘起には、Brackett and Oliphant¹⁾の方法を一部修正して用いた。すなわち、パーコール洗浄した精子に、10 mM ヒポタウリン（相互薬工）および4 U/ml ヘパリン（ヘキスト・マリオン・ルセル）を添加したBO液を6 ml加え、1,800 rpmで5分間遠心分離して精子を洗浄した後、アスピレーターで上清を吸引・除去した。洗浄した精子はヒポタウリンとヘパリンを添加したBO液で 1×10^7 /mlに精子数を調整した後、20 mg/ml 牛血清アルブミン（BSA；Sigma, A-4378）を添加したBO液で最終濃度を 5×10^6 /mlに調整し精子浮遊液とした。体外受精用培地は、60 mm プラスチックシャーレに精子浮遊液で100 μ lのドロップを作成して流動パラフィンで覆ったものを用いた。このドロップに10 mg/ml BSA添加BO液で3回洗浄した成熟卵子を20個ずつ導入し、成熟培養と同じ条件下で18時間媒精した。

4. 発生培養

媒精を終了した卵子は、CR1aa²¹⁾を用いてCS（5%）を発生培養開始後0（0時間区）または48時間目（48時間区）に添加して発生培養を行った。なお、48時間区は卵割率調査後にCSを添加した。媒精を終了した卵子は血清無添加CR1aa²¹⁾の入ったガラス試験管に移し、ボルテックスミキサーで2分30秒間攪拌して卵丘細胞を除去し、血清無添加CR1aa²¹⁾で3回洗浄した。発生培養はCR1aa²¹⁾の50 μ lのドロップに20～25個の卵子を導入し、38.5℃、5%O₂、5%CO₂、90%N₂の条件下で行った。

発生培養開始後48時間目に倒立顕微鏡を用いて、2細胞期、3～4細胞期、5細胞期以上および未受精卵の個数を調べ、卵割率を調べた。卵割率は、培養卵子数に対する卵割した卵子の割合とした。卵割率調査後は、卵割した卵子のみを1ドロップに20個導入して培養し、媒精日を0日として7～9日目に胚盤胞発生率を調べた。胚盤胞は倒立顕微鏡下で形態の品質を観察し、内細胞塊、栄養膜細胞および胞胚腔が明瞭なものをAランク、胞胚腔は明瞭である

が内細胞塊および栄養膜細胞の輪郭が不明瞭で変性細胞が多いものをBランクとした。

5. 胚の凍結および融解

凍結には7～9日目に発生したAランク拡張胚盤胞を用いた。胚盤胞の凍結は、家田ら⁹⁾の方法に準じて行った。すなわち20%CS添加PBSに1.5 M エチレングリコールおよび0.1 M ショ糖を添加して凍結媒液を作成した。胚は5%CS添加PBSで3回、凍結媒液で3回洗浄した後、0.25 ml プラスチックストローに凍結媒液と共に吸引し、室温で15～20分間平衡した。胚を吸引したストローは、あらかじめ-7℃に設定したプログラムフリーザー（ET-U3、フジヤ矢野科学）のアルコール液槽内に浸漬し植氷した。その後、同温度で15分間保持した後、-0.3℃/分の冷却速度で-30℃まで冷却し、液体窒素に投入して凍結した。凍結胚はプラスチックストローを液体窒素から取り出し、空气中（28.5℃）に6秒間保持した後、30℃の水に約15秒間浸漬して融解した。融解胚は、38.5℃に保持した5%CS添加PBSに移して15分間平衡した³⁾。融解胚は100 μ M β -メルカプトエタノール（Sigma, M-7522）および5%CSを添加したCR1aaを用い、50 μ lのドロップを60 mm プラスチックシャーレに作成し、38.5℃、5%O₂、5%CO₂、90%N₂の条件下で培養した。胚の生存性は倒立顕微鏡を用い、培養0時間目では変性細胞がなく色調が明るく形態的に正常なもの、培養24時間目では胞胚腔に再拡張のみられたもの、培養48時間目では拡張胚盤胞以上に发育したもの、72時間目では脱出胚盤胞に发育したものを生存胚とした。

6. 統計処理

実験は繰り返して8回行った。体外受精由来胚の卵割率、胚盤胞発生率、Aランク胚盤胞発生率および凍結・融解後の生存率は χ^2 検定を用いた。

結 果

発生培養開始後48時間目における体外受精由来胚の卵割率および7～9日目に胚盤胞発生率を表1に示した。卵割率は48時間区が0時間区に比べて有意に高く（ $p < 0.05$ ）、5細胞期以上の胚の占める割合も48時間区が有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。また胚盤胞発生率は、48時間区が0時間区に比べて有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。

体外受精由来胚の7～9日目にAランク胚盤胞発生率を表2に示した。両区の胚盤胞発生日ご

Table 1 Effect of the timing of calf serum supplementation in culture medium on the development of bovine presumptive zygotes to the blastocyst stage

| Treatment ^{a)} | No. of zygotes (replicates) | No. of cleaved zygotes (%) | | No. of blastocysts (%) |
|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | 5cell \leq | Total | |
| 0h | 458 (8) | 183 (37.7) ^b | 310 (63.9) ^b | 136 (28.0) ^b |
| 48h | 539 (8) | 250 (46.4) ^c | 378 (70.1) ^c | 189 (35.1) ^c |

^{a)} Culture medium supplemented with 5%CS after 0h or 48h of culture.^{b,c)} Values within a column with different superscripts differ (b, c: $p < 0.05$). Embryo development was evaluated for cleaved and blastocysts rate on days 2 and 7 to 9 after in vitro fertilization.**Table 2** Effect of the timing of calf serum supplementation in culture medium on the development to grade A blastocysts of in vitro-produced bovine embryos.

| Treatment ^{a)} | No. of zygotes | No. of grade A blastocysts (%) | | | |
|-------------------------|----------------|--------------------------------|-----------|----------|------------|
| | | 7day | 8day | 9day | Total |
| 0h | 136 | 57 (42.0) | 39 (28.7) | 7 (5.1) | 103 (75.7) |
| 48h | 189 | 65 (34.4) | 54 (28.6) | 16 (8.5) | 135 (71.4) |

^{a)} Culture medium supplemented with 5%CS after 0h or 48h of culture.**Table 3** Effect of the timing of calf serum supplementation in culture medium on the survival of frozen-thawed in vitro-produced bovine blastocysts.

| Treatment ^{a)} | No. of embryos ^{b)} | No. of survived embryos (%) | | | |
|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------|-----------|--|
| | | 0h | 24h | 48h | No. of hatching blastocyst \leq at 72h |
| 0h | 31 | 21 (67.7) | 21 (67.7) | 19 (61.3) | 7 (22.6) |
| 48h | 27 | 19 (70.4) | 21 (77.8) | 17 (63.0) | 7 (25.9) |

^{a)} Culture medium supplemented with 5%CS after 0h or 48h of culture.^{b)} Embryos were grade A embryos which appeared at 7 and 8 day

と、およびAランク胚盤胞発生率に差はみられなかった。

凍結・融解後の胚の生存率を表3に示した。両区の0, 24, 48および72時間目の生存率に差はなかった。

考 察

本研究では、発生培養液への血清添加時期が体外受精由来胚の発育に与える影響について検討した。卵割率および胚盤胞発生率は発生培養開始後48時間目に子ウシ血清を添加した場合が、0時間目に添加した場合に比べて有意に高かった。しかし、森安ら¹⁷⁾は、血清を0時間目と72時間後に添加した場合を比べたとき、卵割率および胚盤胞発生率に有意な差はなかったと報告している。この結果の違いは、本実験では5%CS添加CR1aaを用い、5%酸素条件で卵丘細胞との共培養をしなかったのに対し、森安ら¹⁷⁾は1%血清添加TCM-199を用い、95%空気

の条件で卵丘細胞との共培養を行ったためと考えられる。一方、Wang *et al.*³⁴⁾は、発生培養開始後0時間目に血清を添加した場合に比べ、72時間目に添加した場合において胚盤胞発生率が高いと報告している。また、Pinyopummintr and Bavister²⁰⁾は、媒精後18時間目に血清を添加した区よりも47時間目に添加した区で胚盤胞発生率が高かったと報告している。これらは本研究の結果を支持するもので、さらにPinyopummintr and Bavister²⁰⁾は、血清は初回卵割を抑制する効果と、桑実期の収縮と胞胚腔形成を促進する効果の二面性を持つと報告している。これらのことから、発生培養開始後48時間目の血清添加は胚盤胞発生率の向上に有効であると考えられる。

福島ら^{5,6)}は、受精後72時間目までの培養液が胚の細胞構成、特に内細胞塊の形成に関与すると報告している。森安ら¹⁷⁾は、発生培養開始後5時間目から72時間目に血清を添加し、それ以降に血清を添加

せずに培養すると卵割率は高くなるが、胚盤胞発生率は低くなり、96時間目以降に血清を添加しても胚盤胞発生率は低いと報告している。これは8細胞期に達する媒精後72~120時間目前後に胚を無血清の培養液に暴露すると、胚盤胞への発育が阻害されるためと考えられる。そして、Barners and Eyestone²⁾は哺乳類の卵子は受精後ある時期まで細胞質中のmRNAによりタンパク合成を行うが、その後は胚ゲノムの発現による胚自身のmRNAによるタンパク合成に移行すると報告し、ウシにおいてはその時期が8細胞期前後であると報告されている²⁹⁾。Rieger²²⁾は胚のmRNAが活性化する時期に最初の顕著なグルコース代謝が起こり始めることを報告している。また、高濃度のグルコースは初期胚の発生を阻害し、グルコース代謝は桑実胚以降に高まることわかっている^{13,18)}。血清にはグルコースが含まれており、このグルコースが胚の初期の卵割を阻害し、血清添加時期を遅らせることで後のグルコース代謝が円滑に行われ、胚の発育を向上させると考えられた。

本研究では、両区のAランク胚盤胞発生率に差はなかった。小西と青柳¹¹⁾は、血清を添加した場合と血清を添加しない場合を比べても、Aランク胚盤胞発生率に差はなかったと報告している。本研究でも同様の結果が得られたことから、血清の添加時期はAランク胚盤胞発生率に影響しないと考えられる。

本研究では、両区の凍結・融解後の生存率に差はなかった。無血清培地に比べて血清培地で生産した桑実胚から胚盤胞期の細胞質内に、大型の脂肪顆粒が顕著に増加するため、凍結・融解後の生存率が低下する可能性が報告されている^{8,23)}。また、血清培地で生産した胚の脂肪酸組成も、血清に含まれる脂肪酸組成に似てくることが明らかとなっている²⁴⁾。しかし本研究では、血清添加時期が凍結・融解後の生存性に及ぼす影響は認められなかった。

以上のことより、発生培養開始後48時間目に培養液へ血清を添加することで、体外受精卵の卵割率および胚盤胞発生率が向上することが示された。今後は、血清を添加する時期についてさらに詳細に検討する必要がある。また、Iwasaki and Nakahara¹⁰⁾は、胚の生存性の判定は形態的評価のみでは不十分であり、胚の細胞数測定が生存性の正確な指標となることを報告している。したがって今後、胚盤胞の品質は、形態的評価のみではなく、細胞数の測定による評価を行う必要があると考えられた。

謝 辞

ウシ卵巢の採取に当たり御協力頂いた北海道畜産公社日胆事業所および北海道早来食肉衛生検査所、ならびに北海道畜産公社北見事業所および北海道東藻琴食肉衛生検査所の関係各位に深謝する。本研究の一部は、2000年度酪農学園大学・酪農学園大学短期大学共同研究の助成(採択No.1)を受けて行ったものである。

要 約

CR1aaへの血清添加時期がウシ体外受精由来胚の発育および凍結・融解後の生存性に与える影響について検討した。

本研究には食肉処理場由来ウシ卵巢の直径3~5mmの卵胞より吸引採取した卵子を用いた。卵子は5%ウシ血清(CS)および0.02mg/mlFSHを添加したヘブス緩衝TCM-199で20~21時間成熟培養した。成熟卵子は、最終精子濃度を 5×10^6 /mlに調整した精子浮遊液に導入して18時間媒精を行った。媒精した卵子はCR1aaを基礎培地として、発生培養開始後0時間目(0時間区)あるいは48時間目(48時間区)に5%CSを添加して培養した。なお、48時間区は卵割率調査後にCSを添加した。発生培養は38.5℃、5%CO₂、5%O₂、90%N₂の条件下で行い、48時間目に卵割率、7~9日目に胚盤胞発生率を調べた。胚盤胞は形態的品質により2分類し、内細胞塊、栄養膜細胞および胞胚腔が明瞭なものをAランクとし、胞胚腔は明瞭であるが内細胞塊および栄養膜細胞の輪郭が不明瞭で、変性細胞が多いものをBランクとした。Aランク拡張胚盤胞は、20%CSを添加した修正ダルベッコリン酸緩衝液を基本として、1.5Mエチレングリコールおよび0.1Mショ糖を添加したものを凍結媒液として用い、プラスチックストローに胚を吸引して、-7℃で15分間保持した後、-0.3℃/分の冷却速度で-30℃まで冷却し、液体窒素に投入して凍結した。凍結胚は、胚の入ったストローを6秒間空气中に保持した後、30℃の水に約15秒間浸漬して融解した。融解した胚は、100μMβ-メルカプトエタノールおよび5%CSを添加したCR1aaで72時間培養して生存率を調べた。

卵割率および胚盤胞発生率は48時間区が0時間区に比べて有意に高かった(p<0.05)。しかし、両区のAランク胚盤胞の発生率および凍結・融解後の生存率に差はみられなかった。以上の結果より、発生培養開始後無血清培地で48時間培養し、その後

CS を添加することにより，体外受精卵の卵割率および胚盤胞発生率が向上することが示された。

文 献

- 1) Bracket, B. G. and Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 12: 260-274.
- 2) Barenes, F. L. and Eyestone, W. H. 1990. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology*, 33: 141-152.
- 3) Dochi, O., Imai, K., Goto, Y. and Shimohira, I. 2000. Effect of one-step dilution procedures on the viability of bovine embryos frozen-thawed in ethylene glycol. *J. Rakuno Gakuen Univ.*, 25(1): 53-58.
- 4) 福田芳詔. 1992. 共培養によるウシ初期胚の発生—卵丘細胞との共培養—. *J. Reprod. Dev.*, 38: j175-j164.
- 5) 福島護之, 富永敬一郎, 秦谷 豊. 1994. ウシ体外受精における個体別胚生産. 兵庫県農業技術センター研究報告, 30 : 33-38.
- 6) 福島護之, 野田昌伸, 太田垣進. 1997. 体外受精後の培養条件がその後のウシ初期胚発生率に及ぼす影響. 兵庫県農業技術センター研究報告, 33 : 44-47.
- 7) 後藤和文, 岩井規子, 市川恭子, 石原亜子, 宅萬義弘, 元石睦郎, 徳丸元幸, 中西喜彦. 1992. ウシ体外受精由来初期胚の体外培養. *J. Reprod. Dev.*, 38: j165-j171.
- 8) 星 宏良, 山下祥子, 阿部宏之. 1997. 高品質ウシ体外受精卵を生産する無血清培養法の研究. 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 16 : 1-5.
- 9) 家田祥子, 堂地 修, 藤澤泰之, 張山綾子, 小山久一. 2000. 発生培養中の酸素濃度およびリノール酸アルブミンがウシ体外受精由来胚の凍結・融解後の生存性に及ぼす影響. *J. Rakuno Gakuen Univ.*, 25(1): 59-64.
- 10) Iwasaki, S. and Nakahara, T. 1990. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized in vitro followed by culture in vitro or in vivo in rabbit oviducts. *Theriogenology*, 33: 669-675.
- 11) 小西正人, 青柳敬人. 1994. ウシ体外受精由来胚の胚盤胞への発育に関する合成培地の検討. *J. Reprod. Dev.*, 40: j1-j4.
- 12) 松井基純, 高橋芳幸, 菱沼 貢, 金川弘司. 1992. ウシ体外受精卵の発育に及ぼすインスリンの影響. 北海道牛受精卵移植研究会会報, 11 : 11-15.
- 13) 松本光晴, 音井威重, 鈴木達行. 1999. 修正合成卵管液 (m-SOF) に添加した乳酸とグルコースが牛体外受精胚の発生に及ぼす効果. *J. Mamm. Ova. Res.*, 16: 73-76.
- 14) 松山浩二, 福井 豊. 1994. ウシ体外成熟・受精卵子の体外発生に及ぼす酸素濃度とフリーラジカル・スカベンジャーの影響. *J. Reprod. Dev.*, 40: j73-j79.
- 15) 南橋 昭, 森安 悟, 陰山聡一, 山本裕介, 北野則泰, 芦野正城, 伊東季春. 1995. 血清添加修正 TALP によるウシ体外受精胚の培養. 北海道牛受精卵移植研究会会報, 14 : 6-16.
- 16) 宮越裕幸, 青木美幸, 澤井 健, 松山浩二, 福井 豊. 1991. 合成卵管液 (SOFM) を用いたウシ体外成熟・受精卵子の体外発生における血清の検討. 北海道牛受精卵移植研究会会報, 10 : 60-63.
- 17) 森安 悟, 南橋 昭, 山本裕介, 陰山聡一, 芦野正城, 八鍬隆司, 伊藤季春. 1992. 牛体外受精胚の発生初期における培養条件の検討. 北海道牛受精卵移植研究会会報, 11 : 7-10.
- 18) 長尾慶和, 佐伯和弘, 星 雅樹, 永井政徳. 1995. ウシ初期胚の体外培養. *J. Reprod. Dev.*, 41: j29-j36.
- 19) Pinyopummintr, T. and Bavister, B. D. 1991. In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol. Reprod.*, 45: 736-742.
- 20) Pinyopummintr, T. and Bavister, B. D. 1994. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: Effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology*, 41: 1241-1249.
- 21) Rosenkrans, C. F. Jr., Zeng, G. Q., Mcnamara, G. T., Schoff, P. K. and First, N. L. 1993. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.*, 49: 459-462.
- 22) Reiger, D. 1992. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology*, 37: 75-93.
- 23) 佐田竜一, 阿部宏之, 山下祥子, 辻井弘忠, 星宏良. 1999. ウシ体外受精卵の品質に影響する

- 血清因子の研究. 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 18: 43-47.
- 24) Sata, R., Tsujii, H., Abe, H., Yamashita, S. and Hoshi, H. 1999. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. *J. Reprod. Dev.*, 45: 97-103.
 - 25) Semple, M. E., Betteridge, K. J. and Leido, S. P. 1995. Cryopreservation of in vitro-derived bovine embryos produced in a serum-free culture system. *Theriogenology*, 43: 320. (abst)
 - 26) 高木優二. 1993. 牛初期胚の共培養と無血清培養. 繁殖技術会誌, 15: 37-43.
 - 27) 高橋芳幸. 1995. 限定培地による牛体外受精卵の培養. 日本胚移植学雑誌, 17: 38-42.
 - 28) Takahashi, Y., Hishinuma, M., Matsui, M., Tanaka, H. and Kanagawa, H. 1996. Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: Influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *J. Vet. Med. Sci.*, 58: 897-902.
 - 29) Telford, N. A., Watson, A. J. and Schultz, G. A. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Mol. Reprod. Dev.*, 26: 90-100.
 - 30) Tervit, H. R., Whittingham, D. G. and Rowson, L. E. A. 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.*, 30: 493-497.
 - 31) Thompson, J. G., Allen, N. W., McGowan, L. T., Bell, A. C. S., Lambert, M. G. and Tervit, H. R. 1998. *Theriogenology*, 49: 1239-1249.
 - 32) 植木 厚, 1987. 続生化学実験講座 8 血液(下), 第1版, 891-897. 東京化学同人, 東京.
 - 33) 植木 厚, 1990. 続生化学実験講座 18 細胞培養技術, 第1版, 40. 東京化学同人, 東京.
 - 34) Wang, S., Liu, Y., Holyoak, G. R. and Bunh, T. D. 1997. The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre- and postcleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media. *Anim. Reprod. Sci.*, 48: 37-45.

Summary

The objective of the present study was to investigate the effects of the timing of calf serum supplementation in culture medium on the development and viability of bovine embryos produced in vitro. Cumulus oocyte complexes (COCs) were collected by aspiration of 3-5 mm follicles of ovaries obtained at a local abattoir. COCs were matured for 20-21h in TCM-199 supplemented with 0.02 mg/mL of FSH with 5% calf serum (CS) at 38.5 °C under an atmosphere of 5% CO₂ in air. Matured COCs were inseminated with 5×10⁶ sperm/mL for 18h. After insemination, the presumptive zygotes were cultured in CR1aa supplemented with 5% CS after 0h or 48h of culture at 38.5 °C under an atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂ for 9 days (fertilization = day 0). After evaluation of cleaved rate, calf serum was supplemented to 48h-group. Embryo development was evaluated for cleaved and blastocyst rate at 48h and days 7 to 9. Blastocysts were classified into grade A or B according to morphology condition. On days 7 and 8, grade A blastocysts were frozen and thawed in PBS-CS (20%) containing 1.5M ethylene glycol and 0.1M sucrose. They were then cultured for 72h in CR1aa supplemented with 5% CS and 0.1mM β-mercaptoethanol. The development rate of cleavage and blastocyst of 48h-group (70.1% and 35.1%) were significantly higher than that of 0h-group (63.9% and 28.0%) (p<0.05). However, there were no differences in the percentages of grade A blastocysts or in the viability of frozen-thawed embryos between the treatments. These results indicate that use of serum-free medium for 48h of culture, subsequently culture-medium-supplemented calf serum improved both cleaved and the blastocyst rate of bovine embryos produced in vitro.