

# 牛体外受精胚の効率的生産技術に関する研究

島田浩明・榊原秀夫\*・西 康裕\*・余谷行義\*\*・伊藤英雄

畜産部

## 要 旨

体外受精胚の生産に関し、各種発生培地ならびに成熟培地と発生培地への成長因子添加による胚の生産性と品質について比較した。発生培地 m-SOF と CR1aa は、TCM199 に比べ移植可能胚への発生率が優れていたが、移植可能胚に发育した胚の細胞数は培地間で差はなかった。m-SOF ならびに CR1aa 下で発生した 6 日齢～8 日齢胚を凍結し、融解後の生存性を見たところ、両培地ともに 7 日齢胚の生存率および透明帯からの脱出率が最も高かった。成長因子の添加に際し、成熟培地には TGF $\alpha$  と EGF を、発生培地には TGF $\beta$ 1 と FGF を組み合わせたが、移植可能胚への発生率、胚の構成細胞数および凍結・融解後の生存率や脱出率は対照区（無添加区）と差が見られなかった。

キーワード：発生培地 (m-SOF, CR1aa, TCM199), 成長因子 (TGF $\alpha$ , EGF, TGF $\beta$ 1, FGF)

## 緒 言

牛体外受精胚については、胚を多量に生産する手段として培養系の改善が大きな課題となっている。胚の発生培養液としては m-SOF と CR1aa を用い、従来から使用している TCM199 との比較を行った。成熟培地および発生培地に添加する成長因子については多くの報告があるが、今回は TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, EGF, FGF を使用し胚の発生率や品質に関し検討したので報告する。

## 材 料

試験は 1996 年 4 月から 1999 年 3 月にかけて、農業技術センター畜産部内で実施した。

試験の規模として、各種発生培地の試験には成熟卵子を 2,689 個使用し、成長因子添加の試験には成熟卵子を 4,536 個使用した。

各種発生培地の試験には、TCM199, m-SOF および CR1aa の 3 種類を基礎培地とし、移植可能胚への発生率および胚の品質を比較した。

成長因子は TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, FGF および EGF を表 3 に示す試験区と対照区を合わせ 10 区を設定し、成熟

表 1 m-SOF の組成

NaCl	107.7 (mM)
KCl	7.16 (mM)
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.71 (mM)
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.49 (mM)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19 (mM)
NaHCO <sub>3</sub>	25.07 (mM)
Lactic acid (Sodium Salt, SYRUP, 60%)	3.3 (mM)
Pyruvate-Na	0.33 (mM)
Glucose	0.00 (mM)
MEM amino-acids (×100)	1 (mℓ/dℓ)
BME amino-acids (×50)	2 (mℓ/dℓ)
Phenol red	0.1 (mg/dℓ)
Streptomycin	10.0 (mg/dℓ)
Penicillin	10,000.0 (IU/dℓ)
Insulin	1.0 (mg/dℓ)
Hypotaurine	10.0 (mM)

羊卵管液の組成を分析し、人工的に合成した修正卵管液 (表 1)<sup>19)</sup>

\*: 南勢家畜保健衛生所

\*\* : 中央家畜保健衛生所

表2 CR1aaの組成

NaCl	114.7 (mM)
KCl	3.1 (mM)
NaHCO <sub>3</sub>	26.2 (mM)
Lactic acid (Hemicalcium salt)	5.0 (mM)
Pyruvate-Na	0.4 (mM)
L-glutamine	14.6 (mg/dl)
MEM amino-acids (×100)	1 (ml/dl)
BME amino-acids (×50)	2 (ml/dl)
Phenol red	0.1 (mg/dl)
Streptomycin	10.0 (mg/dl)
Penicillin	10,000.0 (IU/dl)
Insulin	1.0 (mg/dl)
Hypotaurine	10.0 (mM)

単純組成の培養液（表2）<sup>15)</sup>

培地および発生培地に添加した。そして上記同様に移植可能胚への発生率および胚の品質を比較検討した。

TGF $\alpha$  : Transforming Growth Factor- $\alpha$

（変異性成長因子 $\alpha$ ）

TGF $\beta$ 1 Transforming Growth Factor- $\beta$ 1

（変異性成長因子 $\beta$ 1） マウス体外培養胚の透明帯脱出を刺激する<sup>5)</sup>

FGF : Fibroblast Growth Factor

（線維芽細胞成長因子）

EGF : Epidermal Growth Factor

（上皮性成長因子） 顆粒膜細胞の分裂促進因子<sup>3)</sup>

## 方 法

### 1. 各種発生培地を用いた試験

#### 1) 体外受精胚の作出手順

ア 屠体から採材した卵巣の表面をアルコール綿花で消毒後、18G注射針付きシリンジを用い、卵子・卵丘細胞複合体（未成熟卵）を吸引する。

イ 未成熟卵を含んだ卵胞液をミニシャーレに移し、卵丘細胞の付着具合が良く、かつ細胞質が充実した未受精卵を実体顕微鏡下で選別し成熟培養を行った。

ウ 成熟培養は10%牛胎子血清（FCS）加TCM199 25mM HEPES緩衝を用い、約20時間実施。

エ 精子と接合可能なまでに成熟した卵子（成熟卵）と精子を約5時間接合（媒精操作）させた後、卵子周辺に付着している卵丘細胞や精子細胞の残骸をピペッティング操作により除去し、発生培養を行った。

媒精培地としてBO液またはIVF-100（販売元：機能性ペプチド研）を使用。精子数は2～6×10<sup>6</sup>個/mlに

表3 各種成長因子を用いた試験区の設定

区	成熟培地		発生培地	
	TGF $\alpha$	EGF	TGF $\beta$ 1	FGF
1	10	10	0	0
2	100	0	0	0
3	0	100	0	0
4	100	100	0	0
5	0	0	1	0
6	0	0	0	10
7	0	0	1	10
1+7	10	10	1	10
4+7	100	100	1	10
対象区	0	0	0	0

成長因子の添加量の単位はng/ml

調整した。

オ 発生培地には3種類の基礎培地に、子牛血清（CS）を5%になるよう加えて使用した。移植可能胚への発生観察は、媒精日を0日とし、6日目から9日目まで実施した。

発生培養3日目以降になると、卵子に若干付着していた卵丘細胞が培養シャーレの底にシートを形成するまでに増殖するため、これ以降は共培養と類似した培養形態をとった。

#### 2) 移植可能胚への発生率の検討

3種類の発生培地にて培養後、6日齢～9日齢の間に胚盤胞、拡張胚盤胞、脱出胚盤胞に発生した胚で、かつ変性細胞の少ない胚の発生率を比較した。

#### 3) 凍結・融解後の生存性（胚の品質）の検討

##### ア 胚の凍結方法

凍結による胚への障害を緩和するため、耐凍剤として1.5Mエチレングリコールまたは1.4Mグリセリンを使用した。

凍結には液槽のプログラムフリーザーを使用し、胚を0.25mlストローに入れた状態で-7℃にて植氷し10分間保持後、-30℃以下になるまで毎分0.3℃ずつ温度を下げた。その後、直ちに液体窒素に投入し保存した。

##### イ 凍結胚の融解方法

凍結胚の融解にあたっては、液体窒素中から胚の入ったストローを取り出し、空気中で約10秒保持後、30℃の温湯に1分以上浸漬し解凍した。その後、耐凍剤を除去し、卵丘細胞との共培養にて生存性及び透明帯からの脱出を観察した。

##### ウ 胚を構成する細胞数（胚の品質）検査

3種類の培養液で作出した7日目の胚盤胞ならびに拡張胚盤胞を酢酸で伸展固定した後、ギムザ染色を行い細

胞数を数えた。

2. 成長因子添加試験

1) 体外受精胚の作出手順

成熟培養及び媒精は上記の作出手順と同様である。

発生培地は5%CS加m-SOFを用い、移植可能胚への発生率および品質（凍結・融解後の生存性および胚を構成する細胞数）を比較した。

2) FCS及びCSに含まれる成長因子濃度の測定

株式会社エスアールエル（本社：東京）に依頼し、酵素免疫測定法（ELAISA）にて測定した。

結 果

1. 各種発生培地を用いた試験

1) 移植可能胚への発生状況

m-SOFとCR1aaはTCM199よりも、胚への発生率が有意に高く、胚への発生速度も早い傾向が見られた（表4）。

表4 発生培地別の胚の発生率

区分	培養卵数	移植可能胚数	胚の発生率
m-SOF	1,026	499	48.6 <sup>a</sup>
CR1aa	447	194	43.4 <sup>b</sup>
TCM199	1,216	238	19.6 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> c (P<.01), <sup>b</sup> c (P<.05) で有意差あり

2) 胚の品質

ア 細胞数

胚盤胞の平均細胞数はTCM199培養胚が91.5個と3種類の培地のうち最も少なかった。しかし培地間で胚の細胞数に有意な差はなく、正常範囲内の数であった。

拡張胚盤胞の細胞数も培養液間で有意な差はなく、全て正常範囲内の数であった（表5）。

表5 胚を構成する細胞数

	胚 盤 胞		拡張胚盤胞	
	胚数	細胞数	胚数	細胞数
m-SOF	4	104.0	4	143.5
CR1aa	4	98.3	5	140.8
TCM199	4	91.5	2	141.0

イ 耐凍性

1.5Mエチレングリコールと1.4Mグリセリンを用いた凍結ともに、m-SOF培地では6、7日齢胚の、CR1aa培地では7日齢胚の生存率ならびに透明帯からの脱出率が高かった。しかし両培地間での生存率および脱出率に有意な差は見られなかった（表6）。

表6 胚の凍結・融解後の生存成績

発生培地	胚の日齢	1.5Mエチレングリコール			1.4Mグリセリン		
		供試胚数	生存率 (%)	脱出率 (%)	供試胚数	生存率 (%)	脱出率 (%)
m-SOF	6日	21	85.7%	28.6%	22	81.8%	45.5%
	7日	13	92.3%	53.8%	16	87.5%	62.5%
	8日	39	35.9%	25.6%	15	46.7%	13.3%
CR1aa	6日	3	66.7%	33.3%	4	75.0%	25.0%
	7日	12	91.6%	41.7%	6	100.0%	66.7%
	8日	27	59.3%	18.5%	11	63.6%	27.3%

2. 成長因子添加試験

1) 移植可能胚への発生状況

胚盤胞への発生率は1区で44.9%と最も高い値を示したものの、各区とも対照区との間に有意差はなかった（表7）。

表7 添加区別の移植可能胚の発生率

区	培養卵数	胚発生数	胚発生率 (%)
1	568	255	44.9%
2	505	186	36.8%
3	634	263	41.5%
4	412	170	41.3%
5	369	130	35.2%
6	383	154	40.2%
7	295	103	34.9%
1+7	448	191	42.6%
4+7	387	133	34.4%
対照区	535	195	36.4%

成長因子の添加量の単位はng/ml

2) 胚の品質

ア 細胞数

成長因子添加区では将来、胎児に成長する細胞（内細胞塊）の充実が認められ、細胞数も増加する傾向が認められた（表8）。

表8 成長因子添加区別の胚の細胞数

区	胚 盤 胞		拡張胚盤胞	
	胚数	細胞数	胚数	細胞数
1	3	105	2	168
4	4	113	3	158
7	5	122	4	146
4+7	0	NT	6	164
対照区	4	98	5	141

イ 耐凍性

胚を凍結・融解した後の生存率および脱出率には有意

な差はなかった（表9）。

表9 胚の凍結・融解後の生存成績

区	供試胚数	生存胚数	生存率(%)	脱出率(%)
1	4	3	75.0%	75.0%
2	14	14	100.0%	78.6%
5	10	8	80.0%	40.0%
6	10	7	70.0%	40.0%
4+7	11	11	100.0%	36.7%
対照区	12	10	83.3%	66.7%

\*耐凍剤として1.5M エチレングリコールを使用

ウ FCS及びCS中の発生促進因子濃度

FCS, CS共にTGF $\alpha$ とFGFは検出限界以下. TGF $\beta$ 1はFCSで12.1ng/ml, CSで13.8ng/mlであった.

EGFはFCSが検出限界以下, CSが0.78ng/mlであった.

## 考 察

### 1. 各種発生培地を用いた試験

#### 1) 移植可能胚への発生について

体外受精胚を发育させるための発生培地としては、主にm-SOF, CR1aa, TCM199が使用されているが、どの培地を使用するかは各研究機関で異なる。

当部での試験成績では、m-SOFおよびCR1aaを用いた場合の胚発生率が、TCM199よりも有意に優れていた。窪田ら<sup>10)</sup>や小西ら<sup>9)</sup>はTCM199に比べCR1aaを発生培地として用いた場合、胚盤胞への発生率が良く、胚盤胞への出現日齢も早い傾向があると報告している。また長尾ら<sup>10)</sup>は蛋白・細胞無添加培地でm-SOFとTCM199の胚発生率を比較し、m-SOFが優れていたと報告している。今回の結果は、これら既報の結果と一致しており、m-SOFおよびCR1aaはTCM199に比べ胚盤胞への発生率を高めることが実証された。

そこで、m-SOFやCR1aaを用いた場合の胚発生能の優位性は何に起因するかを考えると、まず第一に胚発生に有効な物質の存在、第二に胚への发育阻害物質の存在が挙げられる。小西ら<sup>7), 8)</sup>は、発生培地へのグルコース0.1~1.0mMの添加ならびにピルビン酸の添加は胚の発生率向上に有効であると報告しているが、グルコースの添加量が5.0mM以上では発生率を低下させると述べている。m-SOFならびにCR1aa中にはピルビン酸は0.3~0.4mM含まれるがグルコースは含まず、反対にTCM199はグルコースを5.6mM含むがピルビン酸は含まれていない。胚発生率に差が生じた一因として、m-SOFおよびCR1aaに含まれるピルビン酸の胚发育促進作用およびTCM199中のグルコース濃度による胚発

育抑制作用が考えられた。

#### 2) 胚の品質

各種の発生培地で作出した胚の細胞数の比較では、培養液間に差は見られなかった。窪田ら<sup>10)</sup>は、TCM199で発生した脱出胚盤胞（透明帯から脱出した胚）の内細胞塊を構成する細胞数は、CR1aaで発生した胚よりも多いと報告している。今回は、内細胞塊の細胞数に限定しての測定は行っていないが、胚全体の細胞数に差が見られなかったことから、内細胞塊の細胞数についても有意な差はなかったと推察された。

胚を凍結・融解した場合の生存率については、m-SOFとCR1aa間で差が見られなかった。窪田ら<sup>10)</sup>は、CR1aaとTCM199で発生した胚の凍結後の生存率に差はないと報告しており、正常に胚盤胞にまで発生した場合、凍結・融解後の生存率には差がないと考えられた。

凍結後に8日齢胚の生存率が低下した原因としては以下のことが推察される。まず发育良好な胚であれば、6~7日齢で胚盤胞になるが、8日齢で胚盤胞に发育した胚は活性が低いと考えられること。次に、受精した卵子は出来るだけ早く最適な環境下（子宮内）に移すことが望ましく、ヒトの体外受精の場合4~8細胞期の胚を移植に供している。ウシの場合は胚盤胞への发育を確認した後に移植に供するが、1日でも体外培養期間を延長することで胚への障害が増すことなどである。

### 2. 成長因子添加試験

#### 1) 成熟培地へのTGF $\alpha$ およびEGF添加について

EGF添加と胚への発生率の関係について、Coskunら<sup>11)</sup>、Leorenzoら<sup>12)</sup>、Illeraら<sup>4)</sup>は、成熟培地に添加したEGFが卵子成熟を誘導する作用があると報告しており、EGFの卵子成熟効果は一般に認められている。しかし、細井ら<sup>3)</sup>のウサギ卵子を用いた実験では、成熟培地および発生培地へのEGF添加は受精率および胚盤胞への発生率向上に効果がなかったと報告している。またKatoら<sup>5)</sup>もウシ卵母細胞を用い、成熟培地へのEGF添加は胚盤胞への発生に有意な影響を与えなかったと報告している。一方Lonerganら<sup>13)</sup>はEGFを単独添加した場合に胚盤胞への発生を促進するが、FCSとの併用では胚発生率に付加的効果は認められなかったと報告している。今回の成績ではTGF $\alpha$ およびEGF添加が発生率向上に効果がなく、KatoらやLonerganらの報告と一致した。成熟培地中へのTGF $\alpha$ およびEGFの添加が、胚への発生率向上に効果がなかった一因としては、FCS中の「不確定な因子」が、TGF $\alpha$ やEGFの卵子成熟効果に取って代わった可能性が考えられた。

#### 2) 発生培地へのTGF $\beta$ 1およびFGF添加について

TGF $\beta$ の添加に関してLarsonら<sup>13)</sup>は、8～16細胞期の発育に必要なファイブロネクチンの合成と分泌を促進すると報告している。しかし今回、TGF $\beta$ 1の発生培地への添加は胚発生率の向上に効果が見られなかった。発生培地に添加したCS中のTGF $\beta$ 1含有量は13.8ng/mlであり、このCSを用いて5%CS加発生培地を調整すると、培地中には0.69ng/mlのTGF $\beta$ 1が含まれる計算になる。つまり対照区の発生培地中にもTGF $\beta$ 1が含まれていたため、対照区との胚発生率に差が生じなかったことが一因として考えられた。

bFGF(塩基性線維芽細胞成長因子)に関しLarsonら<sup>13)</sup>は、TGF $\beta$ の作用を増強させウシ胚の発生阻害原因を解除し、胚盤胞形成を促進すると報告している。発生培地に添加したCS中のFGF濃度は検出限界以下であるため、対照区の培地中にはFGFはほとんど含まれていない。しかし、FGF添加区において胚発生率の向上が見られなかった。その理由としてTGF $\alpha$ やEGF同様、CS中の「不確定な因子」の存在が大きく関わっていると推察される。今後は血清中に含まれる「不確定な因子」を排除した無血清培地を用い、胚発生能を検討する必要があると思われる。

### 3) 成長因子添加による胚の品質試験

#### ア 胚の細胞数

成長因子添加区において、内細胞塊の充実および胚の細胞数の増加傾向が認められたものの、対照区に比べ有意な差には至らなかった。Katoら<sup>5)</sup>はウシ卵母細胞を用い、成熟培地へのEGF添加が細胞数に有意な影響を与えなかったと報告している。

一般の細胞培養系において、成長因子は分裂速度を加速するのではなく、分裂時に生じる障害を緩和し細胞分裂を補助する結果、細胞数が増加するのではないかと考えられる。受精後の卵子の分割速度は種によって決まっているため、細胞分裂過程で障害なく発生した胚では、成長因子の有無に関係なく細胞数が同じになったものと考えられた。

#### イ 凍結・融解後の胚の生存率

本試験では試験区による生存率は70%～100%、脱出率は36%～78%と開きがあったものの、対照区との間に有意な差はなく、成長因子添加の効果は認められなかった。星<sup>2)</sup>は無血清・成長因子添加培地で生産した胚の耐凍性は、血清添加・成長因子無添加の場合の胚よりも耐凍性が高いと報告しているが、融解後の生存率向上に関する要因が血清の有無か成長因子の作用かは検討していない。上述のように、成長因子は分裂を加速するのではなく、分裂時に生じた障害を緩和する作用を有すると考えるならば、発育した胚の耐凍性が向上することはな

く、反対に活性の弱い胚の発育を可能にした結果、凍結後の生存性が低下する原因にさえなにかねない危険性をはらんでいると思われる。

一般に体内受精胚に比べ体外受精胚の場合、凍結・融解後の生存性が低いと言われる。原因として体外受精胚としての生理的要因か発生手段(培養液の組成、血清添加、成長因子やホルモン剤の添加など)によるかは更なる検討を要する問題である。

一方、体外受精胚が妊娠した場合には、胎子の成長の異常(過大子)が多いとの報告もあり、その原因として培地への成長因子やホルモン剤の添加が疑問視されている。

Sinclairら<sup>14)</sup>はヒツジを用いた試験で、共培養系や血清添加・非共培養系の体外受精胚産子において胎子の成長に異常を認めたと報告している。

今後は、如何に効率的に体外受精胚を生産するだけでなく、生産した胚の受胎性や産子の分娩状況(過大子や奇形子の問題)を含めた検討が必要になるとと思われる。

### 引用文献

- 1) Coskun.S., Lin Y.C.: Mechanism of action of epidermal growth factor-induced porcine oocyte maturation, *Mol. Reprod. Dev.*, 42, 311-317 (1995).
- 2) 星 宏良: 無血清培地による牛体外受精卵の生産と移植, *畜産の研究*, 49, 9, 37-42 (1995).
- 3) 細井美彦, 加藤博己, 山田雅保, 内海恭三, 入谷 明: 上皮性成長因子(EGF)がウサギの体外成熟と初期発生に及ぼす影響(1994), *日本胚移植研究会誌*, 第1巻, 2号, 133-137 (1994).
- 4) Illera M.J., Lorenzo P., Illera J.C., Sanchez J., Silvan G., Illella M.: Epidermal Growth factor increase the bovine oocytes maturation in vitro, 339-341.
- 5) Kato H., Seidel: Effect of EGF in bovine oocytematuration medium on maturation, in vitro fertilization and embryonic development, *Theriogenology*, 45 (1), 276 (1996).
- 6) Keefer CL: Development of in vitro produced Bovines Embryos Cultured Individually in a simplemedium, Effect of EGF and TGF $\beta$  1, *Theriogenology*, 37 (1), 236 (1992).
- 7) 小西英邦, 山本喜彦, 西本尚武: 牛初期胚の発生に及ぼすエネルギー源とアミノ酸の影響, *和歌山県畜産試験場研究報告*, 6号, 22-29 (1995).
- 8) 小西英邦, 山本喜彦, 西本尚武: SOF・HamF10混合培

- 地による牛胚の培養, 和歌山県畜産試験場研究報告, 6号, 16-21 (1995).
- 9) 小西正人, 板倉はつえ, 青柳敬人: ウシ体外受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす卵丘細胞との共培養における合成培地へのグルコース添加の影響, *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 40, No.6, j59-j63 (1994).
- 10) 窪田 力, 轟木淳一, 溝下和則, 山口 浩, 猪八重悟, 後藤和文: CR1aa 培地で発生した体外受精由来胚の品質と受胎能 (1996), *日本胚移植学雑誌*, 第19巻, 1号, 7-11 (1997).
- 11) Larson R. C., Ignots G. G., Currie W. B.: Transforming growth factor  $\beta$  and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine embryo, *Mol. Reprod. Dev.*, 33, 432-435 (1992).
- 12) Leorenzo P., Illera MJ, Sanchez J., Sivan G., Illera JC: The Effect of EGF on Cumulus Expansion and Bovine Oocyte Maturation in vitro, *Theriogenology* 37 (1), 250 (1992).
- 13) Lonergan P., Carolan C., Mermillod P.: Epidermal-growth factor significantly improve the development of bovine embryos when added to a defined medium during in vitro maturation, *J. Reprod. Fertil*, abstr, ser, No. 5, 72 (1995).
- 14) 長尾慶和, 佐伯和弘, 星 雅樹, 永井雅信: ウシ初期胚の体外培養, *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 41, No.5, j29-j36 (1995).
- 15) 榊原秀夫, 西 康裕, 余谷行義: 牛の胚移植技術に関する研究, *三重県農技センター報*, 25号, 55-61 (1997).
- 16) Sinclair K. D., McEvoy T. G., Maxfield E. K., Maktin C. A., Young L. E., Wilmut I., Broadbent P. J., Robinson J. J.: Aberrant fetal growth and development after in vitro culture of sheep zygotes, *J. Reprod. Fertil.*, 116, 117-186 (1999).

Studies on the efficient production of in vitro fertilized bovine embryo.

Hiroaki SHIMADA, Hideo SAKAKIBARA, Yasuhiro NISHI,  
Yukiyosi YOTANI and Hideo ITOHO

### Abstract

To improve the development rate and the survivability of in vitro fertilized bovine embryo, we firstly examined on the development to blastocyst from embryo on the three kinds of synthetic mediums. The rate of embryonic development on the media, m-SOF and CR1aa, exceeded that TCM199. The cell number of embryo did not differ significantly among three kinds of mediums. After de-freezing, survival rate of embryo was higher in 7-day of age than in 6-day and 8-day in age.

Secondly, several growth factors were added to synthetic medium. TGF  $\alpha$  and EGF were added to the maturation medium with TCM199. And the growth factors TGF  $\beta$  and FGF were added to the development medium, m-SOF. No significant difference was found in developmental rate, the cell number of embryo and survival rate after the de-freezing between the plots with and without adding growth factors.

**key words:** Development media (TCM199, m-SOF, CR1aa)  
Growth factors (TGF  $\alpha$ , EGF, TGF  $\beta$ , FGF)