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

小西 正人・板倉はつえ・青柳 敬人

全農飼料畜産中央研究所 〒300-33 茨城県つくば市作谷

要 約 ウシ体外受精における移植可能胚の作出効率の向上を目的として、卵丘細胞との共培養系での合成培地 (CR1aa) へのグルコース添加がウシ体外受精卵の胚盤胞への発生率に及ぼす影響について検討した。

CR1aa に 2 % 子牛血清を加えたものを基礎培地にして、グルコース無添加区、0.1 mM グルコースを 0 ~ 3 日目まで添加した区、同濃度のグルコースを 0 ~ 8 日目まで添加した区、および 3 ~ 8 日目まで添加した区の 4 区で、ウシ体外受精卵の胚盤胞への発生率に及ぼす影響を調べた。基礎培地に対する 0.1 mM グルコース添加時期の胚盤胞への発生率に及ぼす影響では、3 日目から添加した区で他区に比べて高い傾向が認められた。

次に、3 日目まではグルコース無添加で培養し、3 日目から 0 mM, 0.5 mM, 1.0 mM, 10 mM または 20 mM のグルコースを添加した 6 区を設けて 10 日目まで培養し、胚盤胞 ~ 脱出胚盤胞への発生率についても検討した。基礎培地に 3 日目からグルコースを添加した場合の 8 日目の胚盤胞への発生率は、10 mM および 20 mM グルコースを添加した区ではそれぞれ 2.8 % および 0 % であり、胚盤胞への発生はほとんど認められなかった。無添加区、0.1 mM, 0.5 mM および 1.0 mM における 8 日目の胚盤胞への発生率は 33.8 ~ 35.9 % の範囲にあったが、10 日目の脱出胚盤胞への発生率は 0.1 mM, 0.5 mM および 1.0 mM では 11.7 ~ 17.4 % の範囲にあり、無添加区 (5.6 %) より有意に高い値であった。

今回の実験において、ウシ体外受精卵の卵丘細胞との共培養では、血清添加 CR1aa に対しグルコースを媒精後 3 日目に 0.1 mM ~ 1.0 mM の濃度で添加すれば、拡張胚盤胞と脱出胚盤胞への発生率が高まることが示されたことから、グルコースがウシ胚盤胞の拡張期および脱出過程に関与していることが示唆された。

キーワード : CR1aa, *in vitro* fertilization, Bovine embryo, Glucose, Cumulus cells

(*Journal of Reproduction and Development*, 40 : j59-j64, 1994)

近年、体外受精卵の体外培養法が進歩し、胚盤胞への発生率も大きく向上している。一般的には、各種細胞との共培養により *in vitro* block を解除する培養法がもちいられている [1 - 10]。また、組成のより明らかな合成培地を用いて、胚発生の促進および抑制のメカニズムやそれに関与する物質の研究が多く報告されているが、未だ解決されたとはいえない。

一方、いくつかの動物種の胚においては、培地中のグルコースが *in vitro* block へ関与すること [11 - 14]、あるいは *in vitro* block 解除以降はグルコースが胚発生促進

に重要であること [15 - 18] が報告されている。また、小西と青柳 [19] は、体外受精後の胚から卵丘細胞を除去した裸化胚を、血清を添加した TCM-199 とグルコースを含まない CR1aa [20] を用いて卵管上皮細胞と共培養した場合、CR1aa での発生率が高いこと、また、CR1aa においては血清を添加すれば卵管上皮細胞と共培養した時と同様の胚盤胞への発生率が得られることを報告している。

そこで本研究では卵丘細胞との共培養において、TCM-199 と CR1aa におけるウシ体外受精卵の胚盤胞への発生率を比較検討し、次に CR1aa へのグルコース添加とその時期が胚盤胞への発生に及ぼす影響について検討

した。

材料と方法

卵胞卵の体外成熟と体外受精：卵胞卵の体外成熟と体外受精はFunahashiら [21] の方法に準じて行った。と場で採取した卵巣は28～30℃に保温した滅菌生理食塩水（硫酸カナマイシン 250 µg/ml 添加）に浸して持ち帰り、と殺後3時間以内に卵巣表面の直径2～5 mmの小卵胞から注射針（18G）で卵胞卵を卵胞液とともに吸引採取した。卵胞卵は修正リン酸緩衝液で洗浄した後、緊密な卵丘細胞層に包まれたものを成熟培養に供した。成熟培地は25mM HEPES 緩衝 TCM-199（GIBCO）に5%（v/v）の CALF SUPREME™ Serum（以下CS, GIBCO）と抗生物質（ペニシリン 10 U/ml, ストレプトマイシン 10 µg/ml）を添加したものをを用いた。上記培地をミネラルオイル（SQUIBB）で覆い、39℃, 5% CO₂, 95% 空気の加湿型 CO₂ 培養器内で21 ± 1 時間成熟培養を行った。体外受精には1頭の黒毛和種凍結精液を使用した。35℃の温湯で融解しグルコース不含BO液 [24] にカフェインを10mM加えた液で精子を2回洗浄（2000 × G, 5分間）した後、精子濃度をカフェイン添加BO液で10～18 × 10⁶/mlに調整した。成熟卵はグルコース不含BO液に牛血清アルブミン 20mg/ml とヘパリン 20 µg/ml を加えた液で3回洗浄した後、ミネラルオイルで覆われた同液の50 µl ドロップに移した。このドロップに上記の精子浮遊液を等量加えて媒精し、CO₂ 培養器内で6時間静置した後、媒精卵を以下の発生培養の実験に供した。発生培養は全て卵丘細胞との共培養であり、媒精卵から培養皿底面に付着した卵丘細胞を単層となるように3日目までピペティングを行った。なお培地交換は行わなかった。

実験 1：媒精卵を CR1aa + 2% CS と TCM-199 + 2% CS の2種類の培地で媒精後8日目まで培養し、胚盤胞

への発生率を比較検討した。

実験 2：CR1aa + 2% CS を発生基礎培地とし、ウシ卵管内濃度に近いとされる0.1mM グルコース [22, 23] の添加とその期間が体外受精卵の胚盤胞への発生率に及ぼす影響を以下の4区を設けて検討した。（1）媒精後8日目まで一貫してCR1aa + 2% CS, （2）媒精後3日目までCR1aa + 2% CS + 0.1mM グルコース, 3日目から8日目までCR1aa + 2% CS, （3）媒精後8日目まで一貫してCR1aa + 2% CS + 0.1mM グルコース, （4）媒精後3日目までCR1aa + 2% CS, 3日目から8日目までCR1aa + 2% CS + 0.1mM グルコース。

実験 3：媒精卵を媒精後3日目までCR1aa + 2% CS で培養し、3日目からCR1aa + 2% CS にグルコースを0mM, 0.5mM, 1.0mM, 10mM および20mM の各濃度を添加した6区を設けて媒精後10日目まで培養した。

統計処理：発生率についての有意差検定はχ²検定にて行った。

結 果

実験 1：媒精後3日目における2細胞期以上への発生率は、CR1aaにおいては79.3%でありTCM-199の66.7%より有意に高い値であった。また、8細胞期以上への発生率では、CR1aaは44.2%でありTCM-199の37.2%より高かったが有意差はなかった。7日目の胚盤胞への発生率ではCR1aaは25.9%で、TCM-199の15.1%より有意に高い値であった。媒精後8日目の胚盤胞への発生率と拡張胚盤胞への発生率は、それぞれCR1aaでは33.3%と23.0%, TCM-199では21.3%と14.0%であり、いずれもCR1aaが有意に高い値であった（P < 0.025）（表1）。

実験 2：媒精後7日目と8日目における胚盤胞への発生率は、グルコースを媒精後3日目から添加した区のみがグルコース無添加区より有意に高かった（P < 0.05）。

媒精後8日目における拡張胚盤胞への発生率は、グル

表 1. TCM-199 と CR1aa を用いた卵丘細胞との共培養におけるウシ体外受精卵の発生成績

培地	培養 卵数	観察時期と発生段階別胚数 (%)					
		媒精後3日目		媒精後7日目		媒精後8日目	
		≥2細胞	≥8細胞	≥桑実胚	≥胚盤胞	≥胚盤胞	≥拡張胚盤胞
TCM-199 + 2% CS	258	172(66.7) ^a	96(37.2)	67(26.0)	39(15.1) ^a	55(21.3) ^a	36(14.0) ^a
CR1aa + 2% CS	174	138(79.3) ^b	77(44.3)	60(34.5)	45(25.9) ^b	58(33.3) ^b	40(23.0) ^b

異符号間に有意差あり（P < 0.025）。
実験回数は両区とも3回。

コースを媒精後3日目から添加した区と一貫してグルコースを添加した区が、グルコース無添加区と媒精後3日目までグルコースを添加した区より有意に高かった ($P < 0.05$) (表2)。

実験3：媒精後3日目からグルコースを添加した実験における0 mM～1.0 mMの四つの区では、媒精後7日目の胚盤胞への発生率は25.8～34.4%，また媒精後8日目の胚盤胞への発生率と拡張胚盤胞への発生率はそれぞれ33.8～35.9%と21.5～24.9%の範囲にあったが、媒精後10日目の脱出胚盤胞への発生率は、0 mMの5.6%に対して、0.1 mM、0.5 mMおよび1.0 mMではそれぞれ11.5%，17.4%および17.2%であり、有意に高い値であった ($P < 0.05$)。10 mMと20 mMにおいては、胚盤胞への発生はほとんど認められなかった (表3)。

考 察

実験1ではウシ体外受精卵を血清を添加して卵丘細胞と共培養した場合、3日目の卵割率および胚盤胞への発生率でCR1aaはTCM-199より有意に高い値を示したが、卵管上皮細胞との共培養においても同様な結果を報告している [19]。TCM-199とCR1aaの組成上の大きな違いの一つにグルコースがある。CR1aaにグルコースは含まれてはいないが、TCM-199に含まれる5.56 mMのグルコース濃度は初期胚の発生を阻害する濃度であり [25–27]、Rosenkransら [26] は非共培養において、5.5 mMのグルコースを培地に添加すると胚盤胞への発生は認められないと報告している。一方、卵丘細胞はグルコースを消費してビルビン酸を産生する [28–30]。実験1ではTCM-199中の5.5 mMグルコース濃度は卵丘細胞によって消費されて低下し、代わりに胚発生に有益

表2. 卵丘細胞との共培養における血清添加CR1aa培地への0.1 mMグルコース添加時期がウシ体外受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす影響

グルコース 添加期間 (媒精後日数)	培養 卵数	観察時期と発生段階別胚数 (%)					
		媒精後3日目		媒精後7日目		媒精後8日目	
		≥2細胞	≥8細胞	≥桑実胚	≥胚盤胞	≥胚盤胞	≥拡張胚盤胞
0	190	142(74.7)	68(35.8)	50(26.3) ^{ab}	33(17.4) ^a	39(20.5) ^a	29(15.3) ^a
0～3	203	157(77.3)	60(29.6)	49(24.1) ^a	44(21.7) ^{ab}	52(25.6) ^{ab}	31(15.3) ^a
0～8	203	157(77.3)	76(37.4)	61(30.0) ^{ab}	50(24.6) ^{ab}	54(26.6) ^{ab}	47(23.2) ^b
3～8	210	158(75.2)	63(30.0)	71(33.8) ^b	59(28.1) ^b	68(32.4) ^b	54(25.7) ^b

異符号間に有意差あり ($P < 0.05$)。
実験回数は各区とも2回。

表3. 卵丘細胞との共培養における血清添加CR1aa培地への媒精後3日目から添加するグルコース濃度がウシ体外受精由来胚盤胞の発生に及ぼす影響

グルコース 濃 度	培養 胚数	観察時期と発生段階別胚数 (%)					
		媒精後7日目		媒精後8日目		媒精後10日目	
		≥桑実胚	≥胚盤胞	≥胚盤胞	≥拡張胚盤胞	≥拡張胚盤胞	≥脱出胚盤胞
0 mM	213	76(35.7) ^a	55(25.8) ^a	72(33.8) ^a	49(23.0) ^a	58(27.2) ^a	12(5.6) ^a
0.1 mM	217	91(41.9) ^a	69(31.8) ^a	78(35.9) ^a	54(24.9) ^a	83(38.2) ^b	25(11.5) ^b
0.5 mM	219	94(42.9) ^a	64(29.2) ^a	74(33.8) ^a	47(21.5) ^a	84(38.4) ^b	38(17.4) ^b
1.0 mM	221	97(43.9) ^a	76(34.4) ^a	77(34.8) ^a	48(21.7) ^a	81(36.7) ^b	38(17.2) ^b
10 mM	179	4 (2.2) ^b	4 (2.2) ^b	5 (2.8) ^b	5 (2.8) ^b	11 (6.1) ^c	4 (2.2) ^a
20 mM	180	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

異符号間に有意差あり ($P < 0.05$)。
実験回数は各区とも3回。

なビルビン酸が産生され [17, 31], グルコースの初期胚の発生阻害作用が軽減されたが, その影響が残って胚盤胞への発生率が低かったものと推察される。

実験2において媒精後8日目における拡張胚盤胞への発生率が, グルコースを媒精後3日目から添加した区と一貫してグルコースを添加した区が, グルコース無添加区と媒精3日目までグルコースを添加した区より有意に高い結果であったことから, グルコースは媒精後3日目以降の胚発生を促進することが推察される。Roblら [18] は, グルコースはウシ胚において8細胞期以降の胚発生を促進すること, また, Kimら [32] はウシ胚において, 培養5日目からのグルコース添加は, 無添加より胚盤胞への発生率が高くなることを報告しており, 実験2の結果と近いものである。Brinster [33] はウサギでグルコース代謝が胚盤胞の拡張期に急激に増加すること, WordingerとBrinster [34] はマウス胚において, Renardら [35] はウシ胚において, グルコースが胚の孵化過程で重要な役割を演ずることを報告している。また, JavedとWright [36] はウシ胚で, 16細胞期までは胚のグルコース利用は低いが, 桑実胚で急激に上昇し, 胚盤胞, 拡張胚盤胞および脱出胚盤胞でさらにグルコースの利用度が高まると報告している。

実験3では, 実験2において拡張胚盤胞への発生率が有意に高かった二つの区のうち, グルコースを媒精後3日目から添加する方法で媒精後10日目まで培養した結果, 10日目における拡張胚盤胞と脱出胚盤胞への発生率は0.1, 0.5および1.0 mM区で0 mM区より有意に高い値を示している。また, 0 mM区では10日目は8日目より胚盤胞数が減少しているのに対し, 0.1, 0.5および1.0 mM区では増加している。これらのことから, グルコースは胚の孵化過程で重要な役割を演ずる [34, 35] と同時に, 胚盤胞期にグルコースが不足すると胚の退行が増加するということも推察される。また, Renardら [35] は孵化後のウシ体内胚を約20時間体外で培養し, グルコースの取り込み量を調べた後, 受胎牛に移植した結果, 胚の形態に差がみられなくても, グルコースの取り込みが認められた胚は認められなかった胚より受胎率が有意に高いことを報告している。胚の孵化と受胎性との関連は明らかではないものの, グルコース添加によって胚の孵化率が高まったことから, 体外受精由来の胚盤胞においてもグルコースの取り込みについては, 今後充分な検討が必要であると考えられる。

今回の結果より, ウシ体外成熟・体外受精卵は, 卵丘細胞との共培養下で媒精後3日目から血清添加CR1aa培

地に0.1 mM～1.0 mM濃度のグルコースを添加すれば, 拡張胚盤胞と脱出胚盤胞への発生率が高まることが示された。

謝 辞

本試験に協力を戴いた全農受精卵移植研究室の各職員の方々に深謝する。

なお, 本研究は平成5年度家畜受精卵移植技術研究組合課題として実施したものである。

文 献

1. **Gandolfi F, Moor RM.** Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* 1987; 81: 23–28.
2. **Eyestone WH, Vignieri J, First NL.** Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. *Theriogenology* 1987; 27: Abstract 228.
3. **Heyman Y, Menezo Y, Chesne P, Camous S, Garnier V.** *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 1987; 27: 59–68.
4. 梶原 豊, 後藤和文, 小坂昭三, 中西喜彦, 小川清彦. 牛卵胞卵子の体外受精および体外培養によるふ化. 家畜繁殖学雑誌 1987; 33: 173–179.
5. **Lu KH, Gordon I, Chen HB, Gallagher M, McGovern H.** Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. *Vet Rec* 1988; 122: 539–540.
6. **Aoyagi Y, Fukui Y, Iwazumi Y, Urakawa M, Ono H.** Effects of culture systems on development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology* 1990; 34: 749–759.
7. **Ellington JE, Carney EW, Farrell BP, Simkin ME, Foote RH.** Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol Reprod* 1990; 43: 97–104.
8. **Fukui Y.** Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 40–46.
9. **Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y.** Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol Reprod* 1990; 42: 114–119.
10. **Kim CI, Ellington JE, Foote RH.** Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM-199 and a simple defined medium with co-culture. *Theriogenology* 1990; 33: 433–440.
11. **Schini SA, Bavister DB.** Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol Reprod* 1988; 39: 1183–1192.
12. **Seshagiri PB, Bavister DB.** Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos *in-vitro*. *Biol Reprod* 1989; 40: 599–606.
13. **Seshagiri PB, Bavister DB.** Phosphate is required for inhibition of glucose development of hamster 8-cell embryos *in-*

- vitro. Biol Reprod* 1989; 40: 607-614.
14. **Chatot CL, Lewis JL, Torres I, Ziomek CA** Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol Reprod* 1990; 42: 432-440.
 15. **Brinster RL**. *In vitro* culture of mammalian embryos. *J Anim Sci* 1968; 27 (suppl 1): 1-14.
 16. **Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ**. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1992; 95: 585-595.
 17. **Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Wright RW Jr, Tervit HR**. Glucose utilization by sheep embryos derived *in vivo* and *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 1991; 3: 571-576.
 18. **Robl JM, Dobrinsky RJ, Duby RT**. The effect of protein supplements, phosphate and glucose on the *in vitro* development of IVM-IVF bovine oocytes. *Theriogenology* 1991; 35: Abstract 263.
 19. 小西正人, 青柳敬人. 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 Devel* 1994; 40: j1-j4.
 20. **Rosenkrans Jr CF, First NL**. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage. *Theriogenology* 1991; 35: Abstract 266.
 21. **Funahashi H, Aoyagi Y, Takeda T, Onihara T**. Developmental capacity of bovine oocytes collected from ovaries of individual heifers and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 1991; 36: 427-434.
 22. **Carlson D, Black DL, Howe GR**. Oviduct secretion in the cow. *J Reprod Fertil* 1970; 22: 549-552.
 23. **Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL**. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 1989; 41: 683-699.
 24. **Brackett BG, Oliphant G**. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod* 1975; 12: 260-274.
 25. **Takahashi Y, First NL**. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 1992; 37: 963-978.
 26. **Rosenkrans CF Jr, Zeng GQ, Mcnamara GT, Schoff PK, First NL**. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 1993; 49: 459-462.
 27. **Matsuyama K, Miyakoshi H, Fukui Y**. Effect of glucose levels during the *in vitro* culture in synthetic oviduct fluid medium on *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 1993; 40: 595-605.
 28. **Leese HJ, Barton AM**. Production of pyruvate by isolated mouse cumulus cells. *J Exp Zool* 1985; 234: 231-236.
 29. **Ahuja KK**. Fertilization: the importance of scientific research to clinical practice. *Br J Family Planning* 1988; 13: 18-24.
 30. **Gardner DK, Leese HJ**. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1990; 88: 361-368.
 31. **Conaghan J, Handyside AH, Winston RML, Leese HJ**. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 87-95.
 32. **Kim JH, Funahashi H, Niwa K, Okuda K**. Glucose requirement at different developmental stage of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology* 1993; 39: 875-886.
 33. **Brinster L**. Carbon dioxide production from glucose by the preimplantation rabbit embryo. *Expl Cell Res* 1968; 51: 330-334.
 34. **Wordinger RJ, Brinster RL**. Influence of reduced glucose levels on the *in vitro* hatching of the mouse blastocyst. *Dev Biol* 1976; 53: 294-296.
 35. **Renard JP, Philippon A, Menezo Y**. *In-vitro* uptake of glucose by bovine blastocysts. *J Reprod Fertil* 1980; 58: 161-164.
 36. **Javed MH, Wright RW Jr**. Determination of pentose phosphate and embden-meyerhof pathway activities in bovine embryos. *Theriogenology* 1991; 35: 1029-1037.

Effect of Glucose in CR1aa on the Development into Blastocyst of *In Vitro* Fertilized Bovine Oocytes Co-cultured with Cumulus Cells

Masato KONISHI, Hatsue ITAKURA and Yoshito AOYAGI

Central Research Institute for Feed and Livestock ZEN-NOH, Tsukuba, Ibaraki 300-33

Summary. The present study was carried out to investigate the effect of glucose on the development of bovine embryos fertilized *in vitro* up to the blastocyst stage using CR1aa medium.

In vitro fertilized ova were randomly assigned to 4 groups and then these were co-cultured with cumulus cells for 8 days. The groups were 1) CR1aa + 2% calf serum (CS); 2) CR1aa + 2% CS + 0.1 mM glucose (day 0 to 3), then CR1aa + 2% CS (day 3 to 8); 3) CR1aa + 2% CS + 0.1 mM glucose (day 0 to 8); 4) CR1aa + 2% CS (day 0 to 3), then CR1aa + 2% CS + 0.1 mM glucose (day 3 to 8).

Developmental rate up to the blastocyst stage of the group cultured in CR1aa + 2% CS + 0.1 mM glucose from day 3 to day 8 was higher ($P < 0.05$) than the other culture groups.

In the second experiment *in vitro* fertilized ova were co-cultured with cumulus cells in CR1aa + 2% CS (day 0 to 3), and further cultured for 7 days in CR1aa + 2% CS + 5 different glucose levels (0 mM, 0.1 mM, 0.5 mM, 1.0 mM, 10 mM or 20 mM).

In the three levels of glucose (0.1 mM, 0.5 mM and 1.0 mM) development rates up to the hatching blastocyst stage (11.5, 17.4 and 17.2%, respectively) at day 10 were higher ($P < 0.05$) than in the 0 mM level (5.6%). Two high levels of glucose (10 mM and 20 mM) reduced significantly the rate of blastocyst development (2.2 and 0%, at day 7).

This study demonstrates that 0.1 mM ~ 1.0 mM levels of glucose in CR1aa + 2% CS from day 3 to day 10 in co-culture with cumulus cells are beneficial to bovine embryo development to the hatching blastocyst stage.