

(19) 日本国特許庁 ( J P )

(12) 公開特許公報 ( A )

(11) 特許出願公開番号  
特開2002-272315  
( P2002-272315A )

(43) 公開日 平成14年9月24日 (2002.9.24)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テマコード\* (参考)

A 0 1 K 67/02

A 0 1 K 67/02

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 3 頁)

(21) 出願番号 特願2001-82482 (P2001-82482)

(22) 出願日 平成13年3月22日 (2001.3.22)

(71) 出願人 501203344

独立行政法人 農業技術研究機構

茨城県つくば市観音台 3-1-1

(72) 発明者 平子 誠

栃木県那須郡西那須野町千本松800

(72) 発明者 木村 康二

栃木県那須郡西那須野町千本松718

(72) 発明者 羅 海玲

栃木県那須郡西那須野町五軒町 6 番34号

(74) 代理人 100063565

弁理士 小橋 信淳

(54) 【発明の名称】 哺乳動物受精卵の発生率向上方法

(57) 【要約】

【課題】 医療、獣医療、畜産などの分野において活用される、哺乳動物受精卵の発生率を向上させる方法。

【解決手段】 ①. 哺乳動物受精卵の発生培地に対し、所定濃度の血管内皮成長因子 (Vascular Endothelial Growth Factor) を添加して支持細胞との共培養を行い、受精卵の正常発生率を高める。②. 血管内皮成長因子の好ましい添加濃度を 1 ~ 10 ng / ml に設定した。③. 支持細胞を卵丘細胞とした。そして、支持細胞との共培養が行われることにより受精卵の正常発生率が高められ、移植可能な胚数を増加させる。また、血管内皮成長因子が受精卵の発生培地に対し有効に働き、受精卵の正常発生率を高めて移植可能な胚数を増加させる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 哺乳動物受精卵の発生培地に対し、所定濃度の血管内皮成長因子を添加して支持細胞との共培養を行い、受精卵の正常発生率を高めることを特徴とする哺乳動物受精卵の発生率向上方法。

【請求項 2】 上記血管内皮成長因子の添加濃度を 1 ~ 10 ng/ml としたことを特徴とする請求項 1 記載の哺乳動物受精卵の発生率向上方法。

【請求項 3】 上記支持細胞を卵丘細胞としたことを特徴とする請求項 1 記載の哺乳動物受精卵の発生率向上方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、医療、獣医療、畜産などの分野において活用される哺乳動物受精卵の発生率向上方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、哺乳動物の受精卵を体外で発生させるためには、受精卵を、本法の基材となった培養液で培養していた。そして、受精卵の正常発生率を高め、移植可能胚数を増加させるようにしている。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかし、上記のように受精卵を、基材となった培養液により培養するだけでは、受精卵の正常発生率を顕著に高めることができず、これを改善する技術が望まれている。本発明は、上記の課題を解決すべく、受精卵の正常発生率を高め、移植可能胚数を増加させるようにした哺乳動物受精卵の発生率向上方法を提供することを目的とする。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】上記の目的を達成するために本発明は、以下の手段を有することを特徴としている。

【0005】A．哺乳動物受精卵の発生培地に対し、所定濃度の血管内皮成長因子 (Vascular Endothelial Growth Factor) を添加して支持細胞との共培養を行い、受精卵の正常発生率を高める。

【0006】B．上記血管内皮成長因子の好ましい添加濃度を 5 ng/ml に設定した。

C．上記支持細胞として卵丘細胞を用いた。

## 【0007】

【作用】上記 A．ないし C．(請求項 1 ないし 3) の手段により本発明の哺乳動物受精卵の発生率向上方法は、以下の作用をする。

【0008】哺乳動物受精卵の発生培地に対し、所定濃

度の血管内皮成長因子を添加することで、支持細胞との共培養系において、受精卵の正常発生率が高められ、移植可能な胚が増加する。また、血管内皮成長因子の添加濃度を 1 ~ 10 ng/ml に設定することで、血管内皮成長因子が受精卵に対し有効に働き、胚の発生率を向上させる。さらに、支持細胞として卵丘細胞を用いることで、発生胚数が多くなる。

## 【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明による哺乳動物受精卵の発生率向上方法の実施の形態を、添付の表に基づいて詳細に説明する。

【0010】本発明は、受精卵の発生培地に対して所定濃度(この実施例では、好ましい添加濃度として 5 ng/ml に設定したが、1 ~ 10 ng/ml 程度の範囲で効果がある。)の血管内皮成長因子 (Vascular Endothelial Growth Factor) を添加し、支持細胞との共培養を行って受精卵の正常発生率を高めることにより、移植可能胚数を増加させるにある。実験手法は以下の通りである。

【0011】実験例 1．卵丘細胞との共培養系において、血管内皮成長因子を添加した発生培地と添加していない培地で媒精後の牛卵子を所定の期間培養し、発生率を比較した。

実験例 2．血管内皮成長因子を添加した成熟培地で牛の卵丘卵子複合体を所定の期間培養した後、血管内皮成長因子を添加していない受精培地中で所定の期間媒精し、さらに、血管内皮成長因子を添加した発生培地と添加していない培地で所定の期間培養し、分割率、4 ~ 8 細胞期への発生率を比較した。

実験例 3．血管内皮成長因子を添加した発生培地と添加していない培地で卵丘細胞を除去した牛の媒精卵子を所定の期間培養し、分割率、4 ~ 8 細胞期胚及び胚盤胞への発生率を比較した。

## 【0012】

【実施例】上記実験例に基づく実施例の、牛受精卵の発生に及ぼす血管内皮成長因子の効果 - 1 (成熟培養時に血管内皮成長因子を添加しなかった場合) を表 1 に、牛受精卵の発生に及ぼす血管内皮成長因子の効果 - 2 (成熟培養時に血管内皮成長因子を添加した場合) を表 2 に、牛受精卵の発生に及ぼす血管内皮成長因子の効果 - 3 (受精後卵丘細胞を除去し、受精卵のみを培養した場合) を表 3 に、それぞれ示す。

## 【0013】

## 【表 1】

牛受精卵の発生に及ぼす血管内皮成長因子の効果-1  
(成熟培養時に血管内皮成長因子を添加しなかった場合)

処置	試験回数	試験卵子数	発生胚数(%±標準誤差)	
			2細胞期以上	4~8細胞期
無添加	9	174	87(49.9±3.9)	67(38.4±2.4)
添加	9	175	123(70.3±5.8)	109(62.3±5.3)

注1) 卵丘細胞との共培養系で実験

注2) 血管内皮成長因子の添加濃度は5ng/ml

注3) 添加区の分割率及び発生率は無添加区より有意に高かった(P<0.05)

表1において、

- 1) 卵丘細胞との共培養系で実験した。
- 2) 血管内皮成長因子の添加濃度は5ng/mlであるが、1~10ng/mlの範囲で効果がある。
- 3) 添加区の分割率及び発生率は無添加区より有意に高かった(P<0.05)。

その結果、発生胚数は、2細胞期以上、4~8細胞期とも、血管内皮成長因子を添加することにより、多くなることが明らかになった。

【0014】

【表2】

牛受精卵の発生に及ぼす血管内皮成長因子の効果-2  
(成熟培養時に血管内皮成長因子を添加した場合)

処置	試験回数	試験卵子数	発生胚数(%±標準誤差)	
			2細胞期以上	4~8細胞期
無添加	9	170	121(71.4±4.7)	101(59.6±5.2)
添加	9	171	130(75.9±4.8)	116(67.8±3.8)

注1) 卵丘細胞との共培養系で実験

注2) 処置は発生時の培養条件(媒精後48時間以降)

注3) 血管内皮成長因子の添加濃度は5ng/ml

注4) 添加区の分割率及び発生率は無添加区より有意に高かった(P<0.05)

表2において、

- 1) 卵丘細胞との共培養系で実験した。
- 2) 処置は発生時の培養条件(媒精後48時間以降)で行った。
- 3) 血管内皮成長因子の添加濃度は5ng/mlであるが、1~10ng/mlの範囲で効果がある。
- 4) 添加区の分割率及び発生率は無添加区より有意に高

かった(P<0.05)。

その結果、成熟培養時の血管内皮成長因子添加の有無にかかわらず、発生胚数は、2細胞期以上、4~8細胞期とも、血管内皮成長因子を添加することにより、多くなることが明らかになった。

【0015】

【表3】

牛受精卵の発生に及ぼす血管内皮成長因子の効果-3  
(受精後卵丘細胞を除去し、受精卵のみを培養した場合)

処置	試験回数	試験卵子数	発生胚数(%±標準誤差)		
			48時間後 2細胞期以上	48時間後 4~8細胞期	168時間後 胚盤胞期
無添加	6	116	90(77.4±5.6)	76(65.3±5.4)	51(43.8±7.5)
添加	6	117	88(75.2±5.2)	74(63.0±7.5)	44(37.5±7.2)
添加	6	115	86(74.8±6.9)	76(66.1±6.7)	38(33.1±3.5)

注1) 血管内皮成長因子の添加濃度は5ng/ml

注2) 共培養系を用いず受精卵のみを培養した場合、発生培地に血管内皮成長因子を添加した効果は認められなかった

表3において、

- 1) 血管内皮細胞成長因子の添加濃度は5ng/mlであるが、1~10ng/mlの範囲で効果がある。
- 2) 共培養系を用いず受精卵のみを培養した場合、発生培地に血管内皮成長因子を添加した効果は認められなかった。

その結果、受精後卵丘細胞を除去し、受精卵のみを培養した場合には、発生培地に血管内皮成長因子を添加した効果は認められないことが明らかになった。

【0016】

【発明の効果】以上の説明から明らかなように本発明による哺乳動物受精卵の発生率向上方法は、請求項1ないし3の手段を有することにより、以下の作用効果を奏す

ことができる。

【0017】①. 哺乳動物受精卵の発生培地に対し、所定濃度の血管内皮成長因子を添加して支持細胞との共培養を行い、受精卵の正常発生率を高めるので、支持細胞との共培養が行われることにより受精卵の正常発生率が高められ、移植可能な胚数を増加させることができる。

②. 血管内皮成長因子の添加濃度を1~10ng/mlに設定したので、血管内皮成長因子が受精卵の発生培地に対し有効に働き、受精卵の正常発生率を高めて移植可能な胚数を増加させることができる。

③. 支持細胞を卵丘細胞としたので、発生胚数を多くすることができる。