

ウシ未成熟卵子の Brilliant cresyl blu(BCB)染色性による 高品質卵子の選別技術

谷村英俊・田中 健・笹木教隆

Selection of High quality Oocytes by Brilliant Cresyl Blue (BCB) Staining before *in vitro* Maturation

Hidetoshi TANIMURA, Ken TANAKA and Kiyotaka SASAKI

要 約

品質の良い体外受精胚を得る手法を確立するために、未成熟卵子を形態的に A~D にランク分けし、Brilliant cresyl blue (以下「BCB」と略す)で染色した。その後、染色性により 3 段階 (BCB++, +, -) に選別し、成熟培養後に体外受精を行い、胚発生率を調査した。その結果、未成熟卵子の形態別 BCB 染色率は、形態ランク A では BCB (++) が最も高く、ランクが低下するとともに BCB (-) が増加し、形態ランク A、B であっても、BCB (-) の未成熟卵子が約 10% 存在した。BCB ランクと胚発生率の関係は、BCB (++) : 40.5%、(+) : 34.3%、(-) : 0% であった。染色ランクと未成熟卵子の形態ランク別の胚発生率は、BCB (++) で A : 45.3%、B : 36.3% であった。しかし、BCB (-) は、形態ランク A、B であっても発生しなかった。

以上のことから、未成熟卵子を形態ランクで区別する場合、BCB 染色を併用することにより、効率的に体外受精胚を作出できることが明らかになった。

I 緒 言

品質の良い体外受精胚を作出するためには、活力ある精子と優良な卵子が必要である。一般的に、体外受精胚の作出方法については、未成熟卵子を形態学的に判断・区別して、成熟培養後に体外受精を行う場合が多い。しかし、形態学的な判定による卵子の選別だけでは、高い発生率を得られていない。

そこで、形態ランク以外に、卵子のグルコース 6 リン酸脱水素酵素を指標に染色される Brilliant cresyl blue (BCB) を用いて未成熟卵子を染色し、成熟培養後に体外受精を実施し、胚発生率向上の可能性について調査をおこなった。

II 材料および方法

1. 供試卵および未成熟卵子の形態別区分

食肉センター由来の卵巣から吸引した未成熟卵子を用い、家畜改良センター技術マニュアル¹⁾に準じて、卵丘細胞が 3 層以上または透明帯周囲全体に付着しているものを A ランク、卵丘細胞が 2 層以上または透明帯周囲に 1/3 以上付着しているものを B ランク、完全な裸化卵子を C ランク、卵丘細胞が膨化しているか蜘蛛の巣状に変性しているものを D ランクに区別し、ラ

ランク A461 個、B369 個、C127 個、D97 個の計 1,054 個を供試した。

2. 未成熟卵子の染色と区分

BCB 染色は Marc Pujol²⁾らの方法に準じて行なった。まず、A～Dにランク分けした未成熟卵子をそれぞれ、0.4%ウシ血清アルブミン (BSA)添加 m-PBS で3回洗浄し、26μM BCB in 0.4%BSA 添加 m-PBS 中で 38.5℃、60 分間遮光下で染色した。染色後、0.4%ウシ血清アルブミン (BSA)添加 m-PBS で2回洗浄し直ちに光学顕微鏡下で観察し、図1のように、細胞質が非常に濃く染まっている未成熟卵子を (BCB++)、染まっている未成熟卵子 (BCB+)、染まらない未成熟卵子 (BCB-) の3段階に区分した。

3. 成熟培養

未成熟卵子の形態ランクおよび染色ランクごとに、5%子牛血清 (CS) 加 TCM199 培地で3回洗浄後、同液で 38℃ 5%CO₂ 95%air で 18～24 時間培養した。

4. 体外受精および発生培養

成熟培養後、卵子の洗浄に IVF100 培地 (機能性ペプテ研究所) を用いた。体外受精には和牛精液を用い、その洗浄は Percoll 分離法³⁾でおこなった。38℃に加温した 90%Percoll 液 (GE Healthcare 社) 3mL に精液を静かに重層し、2,100 回転/10 分、38℃で遠沈する。上清を吸引除去後、沈渣に IVF100 培地 6mL を懸濁し、1,800 回転/5 分、38℃で再度洗浄する。上清除去後約 500μL の IVF100 培地で懸濁する。懸濁液 10μL を、3%NaCl 990μL に添加し、精子濃度を 6.0×10⁶ 個/mL に調整後、38℃、5%CO₂、95%air で 5 時間媒精した。発生培養は、1%CS 加 CR1aa 培地を用いて 9 日間継続培養し、発生状況を観察した。

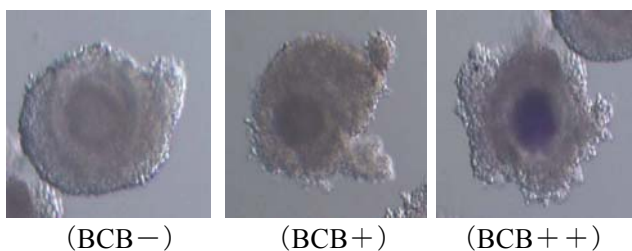


図1 BCB 染色後の未成熟卵子

5. 統計学的分析

未成熟卵子の形態別 BCB 染色率、BCB 染色別の発生率および形態ランクと染色性別の発生率の有意差の検定は χ^2 検定で行った。

III 結 果

1. 未成熟卵子の形態別 BCB 染色率

形態ランク別の BCB (++) の未成熟卵子の割合は、Aランク : 60.3%、Bランク : 57.5%、Cランク : 9.4%およびDランク : 4.1%であり、BCB 染色率は、形態ランクが低い未成熟卵子に比べ、ランクの高い未成熟卵子のほうが高かった。(P<0.01)

しかし、形態ランクがAまたはBであっても、染色されない未成熟卵子がそれぞれ、10.2%、9.2%存在した (表1)。

表1 未成熟卵子の形態別BCB染色率 (%)

	染色ランク				計
	++	+	-		
卵 子 ラ ン ク	A	278* (60.3) ^a	136 (29.5) ^a	47 (10.2)	461
	B	212 (57.5) ^a	123 (33.3) ^a	34 (9.2)	369
	C	12 (9.4) ^b	14 (11.0) ^b	101 (79.5)	127
	D	4 (4.1) ^b	7 (7.2) ^b	86 (88.7)	97
	計	506 (48.0)	280 (26.6)	268 (25.4)	1054

* 染色数 (染色数/ランク毎の卵子数×100)

異符号間に有意差あり(P<0.01)

2. BCB 染色ランク性別の発生率

BCB 染色ランク別の発生率は、BCB(++): 40.5%、(+): 34.3%が発生し、BCB(-)の未成熟卵子は全て発生しなかった (表2)。

表2 BCB 染色性別の発生率 (%)

染色性	++	+	-
発生率	40.5	34.3	0
(発生数/処理卵子数)	(205/506)	(96/280)	(0/268)

3. 染色ランクと形態ランク別の発生率

形態ランク A における未成熟卵子の発生率は、BCB (++) : 45.3%、BCB (+) : 40.4%、形態ランク B における未成熟卵子の発生率は、BCB (++) : 36.3%、BCB (+) : 32.5%、形態ランク C における未成熟卵子の発生率は、BCB (++) : 16.7%、BCB (+) : 7.1%、形態ランク D では BCB で染色されず、発生もしなかった。また、BCB で染色されていても形態ランクが悪いものは発生率が低く、さらに染色されない未成熟卵子は形態ランクに関わりなく全て発生しなかった。

表3 染色性と形態ランク別の発生率 (%)

		染色ランク		
		++	+	-
卵 子 ラ ン ク	A	45.3* (126/278)	40.4 (55/136)	0 (0/47)
	B	36.3 (77/212)	32.5 (40/123)	0 (0/34)
	C	16.7 (2/12)	7.1 (1/14)	0 (0/101)
	D	0 (0/4)	0 (0/7)	0 (0/86)

* 発生率(発生数/形態ランク毎の染色数)

IV 考 察

今回、未成熟卵子の選別に用いた BCB 染色技術は、体細胞クローン技術の中でレシピエント卵子を選抜する方法のひとつである⁴⁾。この染色は、卵子のグルコース 6 リン酸脱水素酵素(G-6-PDH)を指標に染色される BCB^{2, 5, 6)}を用いて行なう方法であり、今回は形態学的に区別した未成熟卵子に対して染色を行い、体外受精胚の発生率を比較検討した。

その結果、成熟培養前の BCB (++) の染色率は卵子ランク A・B がそれぞれ 60.3%、57.5% と C・D ランクの 9.4%、4.1% に比べ高く、BCB (+) の染色率も同様な傾向であった。しかし、ランク A・B であっても、BCB (-) の未成熟卵子が 10% 程度存在した。また、この傾向は発生率においても同様であり、染色ランクが高く、

未成熟卵子の形態ランクが良いほど発生率が高く、染色ランクおよび形態ランクが低くなるにしたがい発生率も低下した。さらに、形態ランクが良くても染色されなかった未成熟卵子は、全く発生しなかった。

未成熟卵子の BCB 染色と胚発生率の関係については、卵子および胚におけるグルコース代謝に大きく影響されていることが推察される。初期胚のグルコースの代謝は、ペントースリン酸経路 (PPP) が主である。染色の指標となる G-6-PDH は、この PPP の重要な位置を占める酵素であり、G-6-PDH 活性の低下は PPP 活性の増加を、逆に増加は、PPP 活性の低下を意味している。牛・豚の成熟した卵母細胞と初期胚については、G-6-PDH の活性を組織化学的に検出した報告もあり^{7, 8)}、これによると、G-6-PDH 活性は、成熟した卵母細胞と媒精後の受精卵で強く 8 細胞期まで持続され、牛では桑実胚、豚では拡張胚盤胞で完全に消失するとされている。

これらのことから、今回、未成熟卵子の形態が良好であっても染色されなかった原因として、PPP が活性化していたためではないかと考えられる。そのため、BCB 染色を実施し、形態ランクが良好であるにもかかわらず、染色ランクが低かった未成熟卵子は、この PPP 活性が低下するまで成熟時間を延長することにより、さらに数多くの高品質な卵子および発生胚を得ることができる可能性も示唆される。

今後は、BCB 染色性が左右される要因・メカニズムを卵子および胚の細胞数、呼吸活性等から究明するとともに、発生胚を移植し受胎性等の検討も必要であると思われる。

参考文献

- 1) 小林修司. ウシ生体卵子吸引・体外受精技術マニュアル. 家畜改良センター技術マニュアル 19 : 8. 2007
- 2) Marc Pujol. et al. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. Theriogenology, 61: 735~744. 2004

- 3) 塩谷康生.体外受精(媒精).家畜人工授精講習会テキスト(家畜体外受精卵移植編),3版:96-107.2001
- 4) 常川久三.Brilliant cresyl blue によるウシ未成熟卵子の染色性の違いが核移植胚の発生に及ぼす影響.石川県畜産総合センター研究報告 39:16~18.2006
- 5) B.M.Manjunatha. et al.Selection of Developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. Theriogenology,68:1299~1304.2007
- 6) Pimprapar Wongsrikeao.et al.Effect of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the selection of porcine oocytes for in vitro production of embryos.Theriogenology,66:366~372.2006
- 7) 新村末雄.ブタの卵母細胞と初期胚におけるグルコース-6-リン酸脱水素酵素の組織科学的研究.新潟大学農学部研究報告 58:39~43.2005
- 8) Iwasaki S.et al.Developmental change and sex difference in glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of bovine oocytes and embryos fertilized in vitro.Jpn.J.Anim.Reprod,35:198~203.1989

Selection of High quality Oocytes by Brilliant Cresyl Blue (BCB) Staining before *in vitro* Maturation

Hidetoshi TANIMURA , Ken TANAKA and Kiyotaka SASAKI

Summrary

We deleted bovine oocytes for a rank in A - D morphologically to get an *in vitro* fertilization(IVF) embryo of good quality and dyed it in Brilliant cresyl blue(BCB). We sorted it to three phase(BCB++, +, -) by stainability and performed IVF after maturity culture and investigated an embryo incidence afterwards. As a result, BCB (++) was the highest in the BCB dyeing rate according to the form of the oocytes in form rank A. In addition, a form rank deteriorated, and BCB(-) increased. Furthermore, there were about 10% oocytes of BCB (-) even if a form rank was A,B. The relation of BCB rank and the embryo incidence are BCB (++) :40.5%, (+) :34.3%, (-) :it was 0%. The embryo incidence according to a dyeing rank and the form rank of the oocytes is A in BCB (++) :45.3%, B :it was 36.3%. However, it did not occur even if BCB(-) was form rank A,B. Based upon the foregoing, it developed that it cut an IVF embryo in a construction in an overhanging style effectively by using BCB dyeing together when distinguished oocytes with a form rank.