

# 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

誌名	石川県畜産総合センター研究報告 = Bulletin of the Ishikawa Pref Livestock Research Center
ISSN	1347913X
著者名	常川,久三 大橋,愛美 田中,孝一 源野,朗
発行元	石川県畜産総合センター
巻/号	39号
掲載ページ	p. 16-18
発行年月	2007年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



# 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

常川 久三<sup>1</sup>・大橋 愛美<sup>2</sup>・田中 孝一<sup>3</sup>・源野 朗<sup>3</sup>

1 農林水産政策課 2 北部家畜保健衛生所 3 畜産総合センター

Bovine nuclear transfer embryos development rate is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining befor IVM

Hisazou TSUNEKAWA, Megumi OOHASHI, Takaichi TANAKA, Akira GENNO

## 要 約

Brilliant Cresyl Blueにより未成熟卵子を成熟培養前に染色し、その染色性により3段階 (BCB染色性 ++、+、-) に選別した。さらに、成熟培養後、それらをレシピエント卵子として核移植し、その発生率や胚盤胞期の細胞数の調査を行った。

- 1) 成熟率は、BCB染色性 ++ が最も高く、それぞれ有意差が認められた (BCB染色性 ++ : 86.5% > + : 71.4% > - : 46.7%,  $P < 0.01$ )。
- 2) BCB染色した未成熟卵子を成熟培養後、レシピエント卵子とし核移植を行ったが、融合率に差は認めなかった。胚盤胞率は、BCB染色性 ++ と + が - に比べ有意に高く (BCB染色性 ++ : 33.1%、+ : 30.6% > - : 16.7%,  $P < 0.01$ )、生産効率率は2倍程度の差を認めた (BCB染色性 ++ : 19.8%、+ : 17.9%、- : 9.3%)。
- 3) 胚盤胞期胚の細胞数は、BCB染色性 ++ が多くなる傾向にある。

以上により、未成熟卵子をBCB染色し選別することで、簡便に優良未成熟卵子が選別でき、効率的に優良な核移植胚の作出が可能であると考えられる。

## 結 論

体細胞クローン技術は、遺伝的に同一な個体を生産できる有益な技術であり、高能力牛の増産や遺伝資源の保存、医療分野への応用など、その実用化が期待されている<sup>1-3)</sup>。しかし、その生産効率は低く、低受胎、流死産や生後直死などの異常も多数報告されている<sup>1, 4, 5)</sup>。そこで、当センターでは、より効率的に体細胞クローン牛を生産するために、さまざまな試験を行ってきた。<sup>6-9)</sup> (レシピエント卵子については家畜改良センターのマニュアルに準じて選別を行っている。) Almら<sup>10)</sup>は、成熟培養前にBrilliant cresyl blue (BCB) で染色し、グルコース 6 リン酸脱水素酵素活性を指標に選別された未成熟卵子は、体外受精後に良好な胚発生率を示すと報告している。そこで、今回、未成熟卵子をBCBにより染色し、成熟培養後にレシピエント卵子として、核移植を行った時の発生成績などについて検討を行った。

## 材料および方法

### 1) 染色方法

食肉センター由来のウシ卵巣から、吸引採取した未成熟卵子を、0.4%ウシ血清アルブミン (BSA) 添加m-PBSで3回洗った後、26  $\mu$ M BCB in 0.4%BSA添加m-PBS中で遮光し染色 (38.5°C、1時間) を行った。染色後、0.4%BSA添加m-PBSで2回洗った後、光学顕微鏡下で観察を行い、卵子の細胞質が濃く染まった卵子をBCB++、薄く染まった卵子をBCB+、染まらなかった卵子をBCB-と判定し選別した (図1. 2.)。

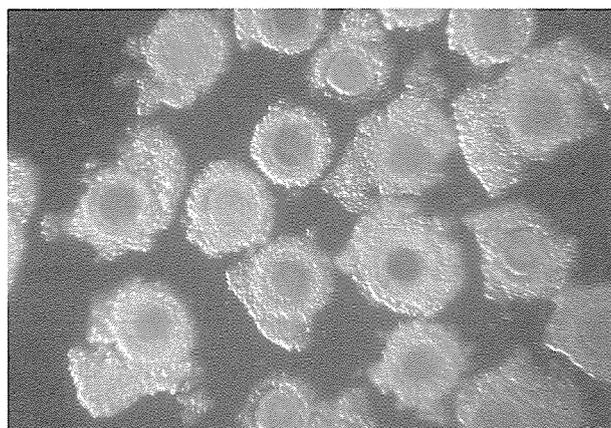


図 1. BCB染色後の未成熟卵子の状態

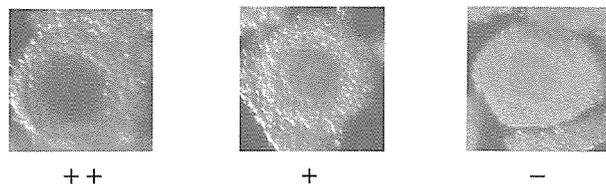


図 2. BCB染色後の選別した未成熟卵子

## 2) 成熟培養

BCB染色で選別した未成熟卵子は、それぞれ5%子牛血清(CS)添加TCM199培養液中で18~19時間成熟培養(38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、95%Air)を行い、培養後、0.1%ヒアルロニダーゼin PBS中で裸化後、光学顕微鏡下で第一極体の放出の有無により成熟確認を行った。

## 3) クローン胚の作出

クローン胚の作出は、金山ら<sup>1)</sup>の方法を一部改変し、以下のとおり行った。

成熟が確認された卵子は、除核した後、レシピエント卵子とし、ホルスタイン種由来の皮膚細胞をドナー細胞として用い核移植を行った。その後、電気融合(22V/150μm、20μsec×2)および活性化処理(10μg/mlシクロヘキシミド処理、5~6時間)を行い、5%CS添加CR1aa培地で発生培養(38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、95%Air)を行った。発生培養後、発生検査を行い、9日目までに胚盤胞に発生した胚を固定・染色し細胞数の調査を行った。

## 4) 統計学的分析

成熟率、核移植後の発生成績の有意差の検定はカイ2乗検定で、細胞数の有意差の検定はt検定で行った。

# 結 果

### 1 BCB染色後の未成熟卵子の割合

BCB染色後の未成熟卵子の割合を表1. に示した。

合計3,167個の未成熟卵子のうち、++と判定されたものが38.4%、+と判定されたものが48.9%、-と判定されたものが12.6%となった。

表1. BCB染色後の未成熟卵子の割合

BCB染色性	卵字数 (%)
++	1,217 (38.4)
+	1,550 (48.9)
-	440 (12.6)
合 計	3,167 (100.0)

### 2 成熟率

BCB染色性により選別した未成熟卵子の成熟培養後の成熟率を表2. に示した。

成熟率は、BCB染色性++が86.5%、+が71.4%、-が46.7%、BCB染色性が++、+、-の順に高く、それぞれ有意差を認めた。

表2. BCB染色性による成熟率

BCB染色性	供試数	成熟数 (%)
++	965	835(86.5)A
+	1,195	853(71.4)B
-	319	149(46.7)C

※異符号間に有意差あり (A, B, C : P < 0.01)

### 3 核移植成績

BCB染色性ごとの核移植成績を表3. に示した。

融合率は、BCBの染色性に関わらず、有意差は認めなかった。胚盤胞率は、BCB染色性が++が33.1%、+が30.6%、-の16.7%に比べ有意に高くなり、BCBに染まった未成熟卵子を用いた核移植で胚盤胞率が高くなった。

また、生産効率でもBCB染色性++、+が-に比べ2倍前後の効率となった。

表3. BCB染色性による核移植成績

BCB染色性	供試数	融合数 (%)	胚盤胞数 (%)	生産効率
++	572	341(59.6)	113(33.1)A	19.8
+	552	324(58.7)	99(30.6)A	17.9
-	43	24(55.8)	4(16.7)B	9.3

※異符号間に有意差あり (A, B : P < 0.01)

### 4 細胞数

BCB染色性による核移植後に胚盤胞まで発生した胚の細胞数を表4. に示した。

BCB染色性++が66.2個となり、BCB-の41.0個と比べ有意に多くなった。

表4. BCB染色性による胚盤胞の細胞数

BCB染色性	細胞数
++	66.2±22.4a
+	56.9±16.3ab
-	41.0±9.6b

※異符号間に有意差あり (a, b : P < 0.05)

# 考 察

未成熟卵子を成熟培養前にBrilliantCresyl Blueで染色し、その染色性により選別し核移植を行った。

BCB染色性++の未成熟卵子は、成熟率が86.5%となり、当センター慣行法(BCB染色を行わず、卵子の色調や形態、卵丘細胞の付着状態など、家畜改良センターのマニュアルに準じて卵子を選別)で行った場合の平成17年度実績値75.5%に比べてもかなり高い成熟率となった。また、BCB染色性+は71.4%なり、ほぼ実績値と同程度となったことから、BCB++および+の未成熟卵子を選別することで、効率的に成熟率の高い未成熟卵子を得られる。また、この方法は、慣行の方法に比べ、客観的かつ熟練度を問わず優良な未成熟卵子の選別が可能である。

核移植成績でも、胚盤胞率、生産効率は、BCB染色性++と+が良好な成績を示し、胚盤胞期の細胞数も多くなる傾向を認めた。特にBCB染色性++の未成熟卵子を用いた核移植では、発生率、生産効率、胚盤胞期の細胞数もBCB染色性+と比べても良かったことから、BCB染色性++の未成熟卵子を成熟培養後、レシピエント卵子として用いることで、より効率的に優良な核移植胚の作出が可能であると考えられた。

また、今回の報告ではデータを示していないが、体外受精胚でも同様の傾向を認めている。体外受精胚では、特にBCBの染色性++が卵割率、胚盤胞率とも優れてた結果となっている。

BCB染色により優良な未成熟卵子を選別することは、優良なレシピエント卵子を用いて、優良な核移植胚を作出するために、簡便で有効な手法である。

今後、さらに発生胚を移植した場合の受胎性等の検討も必要であると考ええる。

### 引用文献

- 1) 入谷明 (2002) 体細胞核移植によるクローニングの現在・過去・未来. 遺伝, 56(1) : 27-30
- 2) 高橋清也 (2002) 体細胞クローニングの家畜改良と増殖への応用. 遺伝, 56(1) : 36-40
- 3) 中辻憲夫 (2002) 体細胞クローン技術と再生医学. 遺伝, 56(1) : 41-45
- 4) Kato, Y. et al (2002) Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. Journal of Reproduction and Fertility, 120: 231-237
- 5) 角田幸雄、加藤容子 (2000) 体細胞核移植による動物クローニング. 蛋白質 核酸 酵素, 45 (13)
- 6) 松田達彦 (2001) 体細胞クローン牛生産技術の確立、ドナー核の供給・選定技術. 平成12年度北陸農業研究成績・計画概要集, 大家畜・石川 : 1
- 7) 田中孝一 (2001) 体細胞クローン牛生産技術の確立、遺伝子解析による再構築胚の品質評価方法の検討. 平成12年度北陸農業研究成績・計画概要集, 大家畜・石川 : 2
- 8) 松田達彦、大橋愛美 (2003) 体細胞クローン牛生産技術の確立、ドナー核の供給・選定技術. 平成14畜産草地試験研究・計画概要集 (公立場所), 石川
- 9) 田中孝一 (2001) 体細胞クローン牛生産技術の確立、遺伝子解析による再構築胚の品質評価方法の検討. 平成15畜産草地試験研究・計画概要集 (公立場所), 石川
- 10) Alm H, Torner H, Lohrke B, Viergutz T, Ghoneim IM, Kanitz W. (2005) Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. Theriogenology. 2005 May;63(8):2194-205.