

[平成20年度参考となる技術]

[技術名] ウシ未成熟卵子の BCB 染色は高品質卵子のスクリーニングに有効である

[要約] 未成熟卵子を形態的にランク分けし Brilliant cresyl blue(BCB)で染色後、胚発生率を調査したところ、卵子の形態が良好で BCB に良く染色されるものは発生率が高く効率よく体外受精胚を作出できることから、この染色方法は高品質卵子の選抜に有効な手段である。

[キーワード] Brilliant cresyl blue、体外受精、胚作出

[担当] 福井畜試・技術開発部・バイテク研究グループ

[連絡先] 電話 0776-81-3130、電子メール h-tanimura-tm@pref.fukui.lg.jp

[背景・ねらい]

品質の良い体外受精胚を得るためには、活力ある精子と優良な卵子が必要である。しかし、現在の未成熟卵子の形態による判断だけでは、高い発生率を得られていない。そこで、高品質卵子の選抜方法として、未成熟卵子に BCB で染色を行ない、卵子の形態ランク別に染色率と発生率を調査し、効率的な体外受精胚の作出方法について検討する。

[技術の内容・特徴]

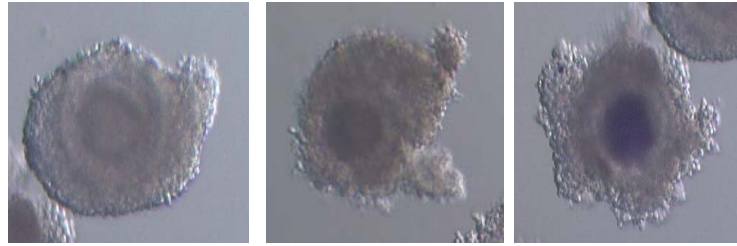
食肉センター由来の卵巣から吸引した未成熟卵子 1,054 個を用い、卵子の形態を家畜改良センター技術マニュアルにより、A (461 個)、B (369 個)、C (127 個)、D (97 個) の 4 ランクに区分する。BCB 染色は、ランク分けした未成熟卵子をそれぞれ、0.4% ウシ血清アルブミン(BSA)添加 m-PBS で 3 回洗浄し、26 μ M BCB in 0.4% BSA 添加 m-PBS 中で 60 分遮光する。染色性により (-)、(+)、(++) の 3 ランクに区分する (図 1)。染色後の成熟培養は 5% 子牛血清 (CS) 添加 M199 培地で 18 時間行う。和牛精液をパーコール液で洗浄後、無血清培地で 6 \times 10⁶ 個/ml に調整し 5 時間媒精し、その後、5% CS 添加 CR1aa 培地で 9 日間発生状況を観察する。

1. 未成熟卵子の BCB 染色率では、形態ランクが良いものほど染色割合が高い。しかし、形態ランクが良いものでも約 10% は染色されない (表 1)。
2. BCB 染色ランクと卵子の発生率は (++) では 40.5%、(+) では 34.3% であり、(-) では全て発生しない (表 2)。
3. 染色ランク、卵子ランク毎の発生率は、BCB (++) で形態ランク A では 45.3%、同じくランク B では 36.3% である。しかし、BCB (-) のものは形態ランク A・B であっても発生しない (表 3)。

[技術の活用面・留意点]

1. 体外受精胚の効率的な作出に、未成熟卵子の BCB 染色による選別は有効である。
2. BCB 染色後の成熟率、発生時の細胞数の確認、受胎性の有無が必要である。

[具体的データ]



(-) (+) (++)

図1 実体顕微鏡による染色ランク

表1 未成熟卵子の形態別染色率 (%)

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

* 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)

表2 BCB染色別の発生率 (%)

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

異符号間に有意差あり (P < 0.01)

表3 ランクと染色性別の発生率 (%)

		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/ランク毎の染色数)

[その他]

研究課題名：受精卵移植技術高度定着化確立事業

研究期間：2006～2008年度

研究担当者：谷村英俊、田中 健、笹木教隆