

—原著—

マウスの発生初期胚におけるBCBに対する染色性と 胚盤胞期への発生能との関係

Relationship between BCB Stainability and Developmental Competence to the Blastocyst Stage in Mouse Early Embryos

小林 万優¹・住田 翔太郎¹・新村 末雄^{2*}

Mayu Kobayashi¹, Shotaro Sumida¹ and Sueo Niimura^{2*}

¹新潟大学大学院自然科学研究科 〒950-2181 新潟市

²新潟大学農学部 〒950-2181 新潟市

¹Graduate School of Science and Technology, Niigata University, 8050 Ninocho, Ikarashi, Nishi-ku, Niigata 950-2181, Japan

²Faculty of Agriculture, Niigata University, 8050 Ninocho, Ikarashi, Nishi-ku, Niigata 950-2181, Japan

要旨：成熟モデルマウスの初期胚について、ブリリアントクレシル青 (BCB) に陽性と陰性の胚の出現率とそれらの胚盤胞への発生率を調べた。2細胞期ないし桑実胚期の胚において、BCB陽性のものの出現率は、94.2ないし96.4%であり、BCB陰性胚の出現率に比べ、すべての時期で有意に高かった。また、BCB陽性胚の胚盤胞への発生率 (85.7ないし96.7%) は、BCB陰性胚の0ないし50.0%に比べ、すべての時期で有意に高かった。一方、加齢モデルマウスから採取した2細胞胚および桑実胚において、BCB陽性のものの出現率は、79.5および58.6%であり、BCB陰性胚の出現率 (20.5および41.4%) に比べて有意に高いとともに、BCB陽性胚の胚盤胞への発生率 (77.1および79.4%) も、BCB陰性胚の発生率 (0および45.8%) に比べて有意に高かった。なお、BCB陽性の2細胞胚と桑実胚の出現頻度は、成熟モデルマウスから採取したものに比べて加齢モデルマウスから採取したもので有意に低かったが、胚盤胞への発生率は、両モデルマウスから採取した胚の間で相違なかった。以上の結果から、BCB陽性胚の体外での胚盤胞への発生率はBCB陰性胚に比べて有意に高いことが確かめられた。また、卵子と初期胚におけるBCBに対する染色性とG-6-PDH活性との間には相関のあることが考えられた。
キーワード：マウスの卵子と胚、BCBに対する染色性、発生能、G-6-PDH活性、良質胚の非侵襲的選別

Abstract: The stainability of mouse embryos with brilliant cresyl blue (BCB) and the development to blastocysts of BCB-positive and BCB-negative embryos were examined. From the 2-cell to the morula stages, the incidences of BCB-positive embryos collected from mature mice were 94.2 to 96.4%. These rates were significantly higher at all stages than those of BCB-negative embryos. The rates of development to blastocysts of BCB-positive embryos (85.7 to 96.7%) were significantly higher than those of BCB-negative embryos (0 to 50.0%) at all stages. In 2-cell embryos and morulae collected from aged mice, the incidences of BCB-positive embryos (79.5 and 58.6%) were significantly higher than those of BCB-negative embryos (20.5 and 41.4%, respectively). The rates of development to blastocysts of BCB-positive 2-cell embryos and morulae collected from aged mice were 77.1 and 79.4%, which were significantly higher than those of BCB-negative embryos, 0 and 45.8%, respectively. Although the incidences of BCB-positive embryos collected from aged mice were significantly lower than those collected from mature mice, the rates of development to blastocysts in BCB-positive embryos did not differ between the embryos collected from aged and mature mice. In these findings, we demonstrate that BCB-positive embryos have high developmental ability to the blastocyst stage. A correlation was also found between BCB stainability and G-6-PDH activity in mouse eggs and embryos.

Key words: Mouse egg and embryo, Stainability with BCB, Developmental ability, G-6-PDH activity, Non-invasive selection of good quality embryo

(受付 2011年12月19日/受理 2012年2月21日)

別刷請求先：〒950-2181 新潟市西区五十嵐二の町8050 新潟大学農学部

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: niimura@agr.niigata-u.ac.jp

はじめに

最近、生体染色試薬であるブリリアントクレシル青(BCB)を用いて、成熟能と受精能ならびに媒精後の発生能の高い良質な卵母細胞の選別が、ブタ、ウシ、バッファロー、ウマ、ヤギ、マウスおよびヒツジで試みられている¹⁻⁹⁾。これらの研究において、胞状卵胞から採取直後にBCBに陽性の卵母細胞は、陰性のものに比べ、培養後の第二成熟分裂中期への成熟率^{1,3-9)}が有意に高いとともに、媒精後の受精能^{5,6)}と発生能^{2,3,5-9)}も有意に高いことが報告されている。

BCBは、NADPHによって還元され、無色のleuco BCBになる性質のあることから、細胞のBCBに対する染色性はNADPHを産生するグルコース-6-リン酸脱水素酵素(G-6-PDH)活性の指標になるものと考えられている¹⁰⁾。したがって、卵巣内で発育中の卵母細胞ではG-6-PDH活性が高いため^{11,12)}、BCB染色を施してもBCBは還元されて細胞質に青色は沈着しないが、発育を完了した卵母細胞ではG-6-PDH活性が低い¹³⁻¹⁵⁾ため、BCBは還元されずに青色が細胞質に沈着するという。このように、哺乳動物の卵母細胞ではG-6-PDH活性とBCBに対する染色性との間には密接な関係のあることが知られている。しかしこれまでに、初期胚のBCBに対する染色性とその後の発生能との関係ならびにG-6-PDH活性とBCBに対する染色性との関係については調べられていない。

本研究は、マウスの発生初期胚について、BCBに対する染色性とそれぞれの染色性を示す胚の胚盤胞への発生能を観察するとともに、G-6-PDH活性を組織化学的に検出し、BCBに対する染色性とG-6-PDH活性との間に関係があるのか否かを検討したものである。また、発生能の低いことが知られている加齢動物の初期胚¹⁶⁻¹⁸⁾についても、BCBに陽性胚と陰性胚との間で胚盤胞への発生能に相違があるのか否かを調べたものである。

材料と方法

1. 動物

供試動物として、60から90日齢(成熟モデル)のICR系雌マウス68匹、加齢モデルとして300から360日齢のICR系雌マウス30匹を使用した。マウスの飼育は、24°Cに調節した室内で行い、点灯は午前4時から午後6時までの14時間とした。なお本研究は、新潟大学の承認を受け、新潟大学動物実験倫理委員会規程に沿って実施したものである。また、過排卵を誘起するために、雌マウスにPMSG(ピーメックス、三共エール薬品)とhCG(ゴナトロピン、帝国臓器)それぞれ5単位を48時間間隔で腹腔内に注射した。これらのマウスは、未受精卵子採取のための一部を除き、直ちに同系統の成熟雄マウスと交配させた。

2. 卵子および初期胚の採取

未受精卵子はhCG注射後14時間に成熟モデルマウスの卵管膨大部から採取した。採取した未受精卵子は、0.1%のヒアルロニターゼ(Sigma Chemical Co., MO, USA)を含

むTYH液¹⁹⁾に浸漬し、卵子周囲の卵丘細胞をピペット操作により除去した。一方、前核卵子、2細胞胚、4細胞胚、8細胞胚、桑実胚および胚盤胞は、hCG注射後24、48、54、67、76および96時間に、それぞれ成熟モデルマウスの卵管あるいは子宮から採取した。なお、2細胞胚と桑実胚については、hCG注射後48および76時間に、加齢モデルマウスの卵管あるいは子宮からも採取した。卵子の採取にはTYH液を、胚の採取にはM16培養液²⁰⁾をそれぞれ用いた。

3. BCBに対する染色性と発生能との関係の検討

成熟モデルマウスから採取した卵子および初期胚の約半数は、26 μMのBCB(Sigma Chemical Co.)を添加したTYH液(未受精卵子および前核卵子)あるいはM16培養液(2細胞期ないし胚盤胞期の胚)に、37°C、CO₂ 5%、空気95%の気相下で90分間浸漬した。浸漬後、卵子と初期胚をそれぞれ同種培養液で2回洗浄して実体顕微鏡下で観察し、細胞質が青色に染まっているものを陽性、染まっていないものを陰性に分類した。

また、BCBに陽性と陰性の2細胞期から桑実胚期の胚を、M16培養液でそれぞれ20、29、36あるいは48時間培養し、胚盤胞への発生の有無を観察した。

一方、加齢モデルマウスから採取したすべての2細胞胚および桑実胚を、26 μMのBCBを含むM16培養液に、37°C、CO₂ 5%、空気95%の気相下で90分間浸漬した。浸漬後、BCBに陽性の胚と陰性の胚の割合を実体顕微鏡下で観察するとともに、それぞれの胚をM16培養液で20あるいは48時間培養して胚盤胞への発生の有無を調べた。

4. G-6-PDH活性の組織化学的検出

成熟モデルマウスから採取した卵子および初期胚の残りの半数は、G-6-PDH活性検出のための基質液に37°Cで60分間浸漬した。G-6-PDH活性検出のための基質液は、RudolphとKleinが使用した処方²¹⁾に準じて作成した。G-6-PDHの活性は、基質液に浸漬後に卵子と胚を顕微鏡下で観察し、細胞質に沈着した青色のジホルマゼン顆粒の量およびジホルマゼン顆粒の割球あるいは細胞での分布状態によって、強度、弱度および陰性の3段階に分類した。なお、基質であるD-glucose-6-phosphate disodium salt(Sigma Chemical Co.)を含まない液に浸漬した卵子と初期胚を対照として用いた。

5. 統計処理

BCBに対する染色性に関する数値およびBCBに陽性胚と陰性胚の発生に関する数値に関しては、3回の実験結果を分散分析した後に、3回分の総数を χ^2 検定し、有意差の有無を調べた。また、卵子と初期胚におけるG-6-PDH活性に関する数値に関しては、3回の実験結果を分散分析した後に、BCBに対する染色性との相関の検討を、ピアソンの相関係数検定およびスピアマンの順位相関係数検定によって行った。なお、いずれの検定においても、P値が0.05より小さい場合を有意差ありと判定した。

結果

1. BCBに対する染色性と発生能との検討

未受精期の卵子から胚盤胞期までの初期胚にBCB染色を施すと、細胞質が青色に染色されるもの(図1a, b)と細胞質が青色に染色されないもの(図1c, d)とが出現した。BCBに陽性の卵子と胚において、青色の沈着はそれぞれの割球および細胞の細胞質にみられた。

2細胞期から桑実胚期までの初期胚のBCBに対する染色性と胚盤胞への発生率は表1に示した通りである。

成熟モデルマウスから採取した2細胞胚ないし桑実胚において、BCB陽性のものがそれぞれ94.2ないし96.4%みられた。いずれの発生時期においても、BCB陽性の胚の出現頻度は、BCB陰性の胚のそれらに比べて有意に高かった。また、BCB陽性の胚の胚盤胞への発生率は、いずれの時期においても、BCB陰性の胚のそれらに比べて有意に高かった。

一方、加齢モデルマウスから採取した2細胞胚と桑実胚において、BCB陽性のものの出現頻度は、79.5および58.6%であり、陰性のものの出現頻度である20.5 (9/44) および41.4% (24/58) に比べて有意に高かったが、成熟モデルマウスの2細胞胚(94.2%)と桑実胚(95.8%)と比べると有意に低かった(表2)。また、BCB陽性の胚の胚盤胞への発生率は、77.1および79.4%であり、BCB陰性の胚の0 (0/9) および45.8% (11/24) に比べて有意に高かった。なお、BCB陽性の2細胞胚と桑実胚の胚盤胞への発生率は、加齢モデルマウスおよび成熟モデルマウスから採取した胚の間で相違なかった(表2)。

2. BCBに対する染色性とG-6-PDH活性との関連性の検討

未受精卵子および前核期から胚盤胞期までの発生初期胚をG-6-PDH活性検出のための基質液に浸漬すると、卵子と初期胚の細胞質にジホルマザン顆粒の沈着が認められた(図2a, b)。この顆粒は、基質を含まない液に浸漬した未受精卵

子と初期胚には出現しなかったもので、ジホルマザン顆粒がG-6-PDH活性の存在を示していることが確かめられた。

本研究では活性を、ジホルマザン顆粒が一部の割球(図2a)および一部の細胞にのみ沈着しているもの、およびすべての割球および細胞で沈着量の少ないものを弱度、ジホルマザン顆粒がすべての割球と細胞に多量沈着しているものを強度(図2b)、ジホルマザン顆粒がすべての割球と細胞に

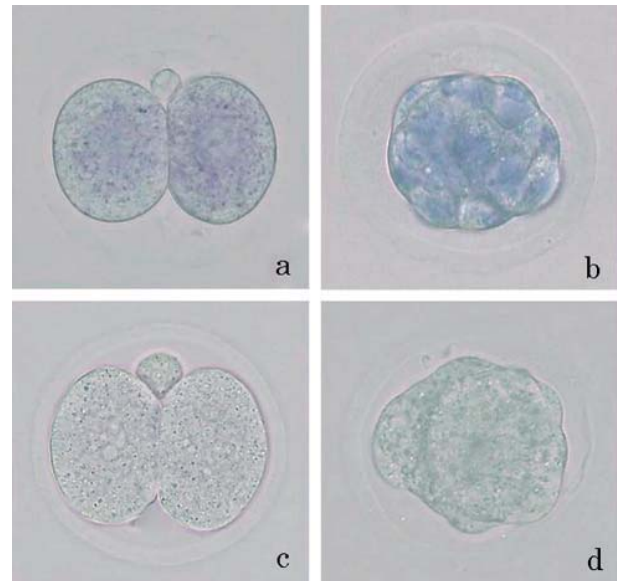


図1 Mouse embryos showing positive (a, b) and negative (c, d) stainabilities to BCB.

- a. A 2-cell embryo. Blue pigments are visible in the cytoplasm of all blastomeres.
- b. A morula. Blue pigments are visible in the cytoplasm of all blastomeres.
- c. A 2-cell embryo. Blue pigments are not visible in the cytoplasm of each blastomere.
- d. A morula. Blue pigments are not visible in the cytoplasm of each blastomere.

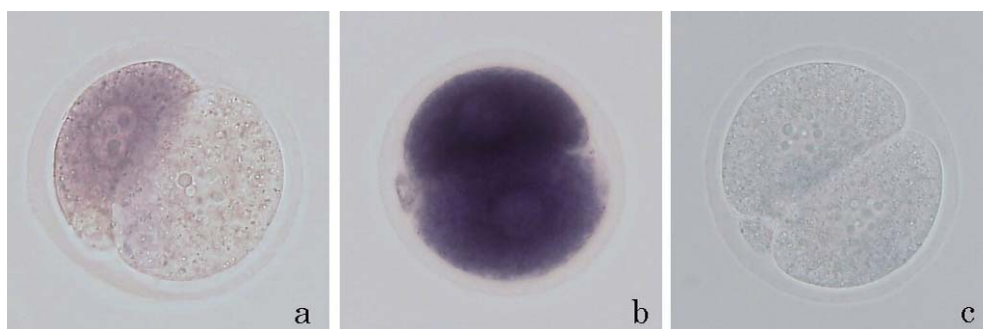


図2 Mouse 2-cell embryos showing weak (a), strong (b) and no (c) activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase.

- a. A small amount of diformazan granules are visible in the cytoplasm of one blastomere.
- b. A large amount of diformazan granules are visible in the cytoplasm of each blastomere.
- c. No diformazan granules are visible in the cytoplasm of each blastomere.

表 1 The stainability of mouse embryos with BCB and the development to blastocysts of BCB-positive and BCB-negative embryos

Developmental stages	No. of embryos stained with BCB	Stainability with BCB	No. (%) of embryos showing each stainability	No. (%) of embryos developing to blastocysts
2-Cell	52	+	49 (94.2) ^a	42 (85.7) ^a
		-	3 (5.8) ^b	1 (33.3) ^b
4-Cell	56	+	54 (96.4) ^a	49 (90.7) ^a
		-	2 (3.6) ^b	0 (0.0) ^b
8-Cell	58	+	55 (94.8) ^a	53 (96.7) ^a
		-	3 (5.2) ^b	1 (33.3) ^b
Morula	48	+	46 (95.8) ^a	43 (89.6) ^a
		-	2 (4.2) ^b	1 (50.0) ^b

The development to blastocysts was observed after 48, 36, 29 or 20 h of culture, dependent on the developmental stage. Values show total number of three independent experiments. Values with different superscripts in the same column in each developmental stage are significantly different ($P<0.05$).

+: Positive, -: negative. BCB: brilliant cresyl blue.

表 2 Comparison of the rates of development to blastocysts of BCB-positive embryos collected from mature and aged mice

Developmental stages	Ages of mice (days)	No. of embryos stained with BCB	No. (%) of BCB-positive embryos	No. (%) of BCB-positive embryos developing to blastocysts
2-Cell	60-90	52	49 (94.2) ^a	42 (85.7) ^a
	300-360	44	35 (79.5) ^b	27 (77.1) ^a
Morula	60-90	48	46 (95.8) ^a	43 (93.5) ^a
	300-360	58	34 (58.6) ^b	27 (79.4) ^a

The development to blastocysts was observed after 48 or 20 h of culture. Values show total number of three independent experiments. Values with different superscripts in the same column in each developmental stage are significantly different ($P<0.05$).

表 3 The stainability of mouse eggs and embryos with BCB and their glucose-6-phosphate dehydrogenase activities

Developmental stages	No. of eggs and embryos stained with BCB	No. (%) of eggs and embryos showing each stainability		No. of eggs and embryos stained by the Rudolph and Klein method	No. (%) of eggs and embryos showing each G-6-PDH activity		
		Positive	Negative		Strong	Weak	Negative
Unfertilized	45	14 (31.1)	31 (68.9)	68	57 (83.8)	2 (3.0)	9 (13.2)
Pronuclear	34	34 (100.0)	0 (0.0)	45	4 (8.9)	30 (66.7)	11 (24.4)
2-Cell	52	49 (94.2)	3 (5.8)	49	6 (12.2)	29 (59.2)	14 (28.6)
4-Cell	56	54 (96.4)	2 (3.6)	50	5 (10.0)	39 (78.0)	6 (12.0)
8-Cell	58	55 (94.8)	3 (5.2)	43	3 (7.0)	33 (76.7)	7 (16.3)
Morula	48	46 (95.8)	2 (4.2)	35	1 (2.9)	31 (88.6)	3 (8.6)
Blastocyst	58	58 (100.0)	0 (0.0)	68	0 (0.0)	48 (70.6)	20 (29.4)

Values show total number of three independent experiments.

沈着していないものを陰性 (図2c) の3段階に分類した。

未受精卵子および発生初期胚のBCBに対する染色性およびG-6-PDH活性について得られた成績は表3に示した通りである。すなわち、BCBに陽性のものと陰性のものは、未受精卵期では31.3および68.9%みられたが、前核期以降の発生初期胚ではほとんどが陽性で、陰性のものはわずかに3.6な

いし5.8%出現するのみであった。また、強度のG-6-PDH活性を示す卵子と胚の割合は、未受精卵期では83.8%であったが、前核期から胚盤胞期では低下し、0ないし12.2%になった。一方、弱度および陰性のG-6-PDH活性を示すものの割合が増加した。

緒言で述べたように、G-6-PDH活性が高いと、NADPH

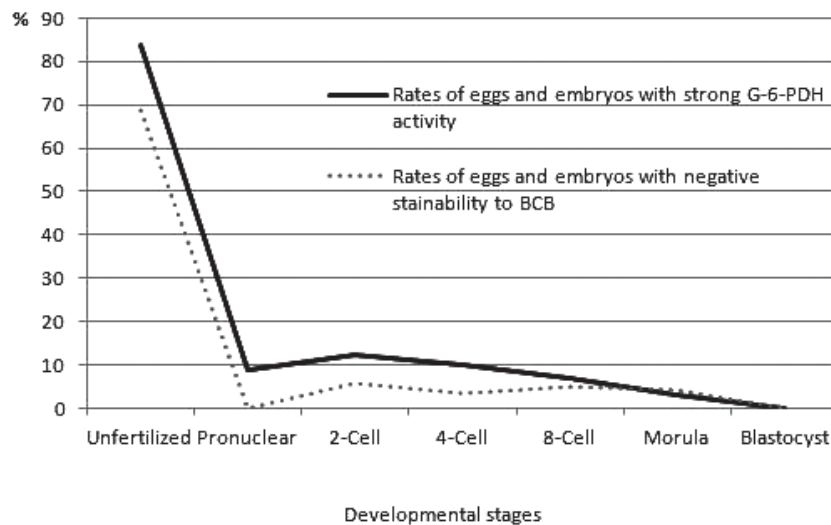


図3 Changes in the rates of mouse eggs and embryos showing strong glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and negative stainability to BCB.

が多量に産生され、このNADPHがBCBを還元するためにBCBの青色は細胞質に沈着しないといわれている¹⁰⁾。そこで本研究では、G-6-PDH活性とBCBに対する染色性との間に関係があるのか否かを検討した。その結果、強度のG-6-PDH活性を示す卵子と胚の割合およびBCBに陰性の卵子と胚の割合の変化は極めて類似しているとともに(図3)、ピアソンの相関係数検定における相関係数は0.993191 ($P < 0.05$)、また、スピアマンの順位相関係数検定における相関係数は0.839285 ($P < 0.05$)となり、どちらの検定においても両者には有意な相関のあることが確認された。

考 察

各種哺乳動物において、成熟能、受精能ならびに受精後の発生能の高い良質な卵母細胞の選別のためにBCB染色が用いられている¹⁻⁹⁾。なお、排卵後の未受精卵子でBCBに対する染色性を調べている報告はみられないが、ヤギ¹⁾およびバッファロー⁶⁾の卵母細胞では、胞状卵胞から採取して体外成熟させた後にBCBに陰性のものでも、媒精後に57.6および55.4%がそれぞれ受精したと報告されており、BCBに陰性のものでも半数程度は受精することが確かめられている。しかしこれまでに、BCBに陽性の初期胚と陰性の初期胚との間で発生能を比較し、発生能の高い胚の非侵襲的選別にBCB染色が有効であるのか否かを検討した報告はみられない。

本研究において、成熟モデルマウスの2細胞胚期から桑実胚期までの初期胚にBCB染色を施し、BCBに陽性と陰性のものとの間で培養後の胚盤胞への発生率に違いがあるのか否かを初めて検討した。その結果、いずれの発生時期でも、BCB陽性の胚は、陰性のものに比べて胚盤胞への発生率が高いことが明らかとなった。また、発生能の低いことが知られている加齢動物から採取した胚についても、BCB染色を

施してその後の胚盤胞への発生能を観察した。その結果、加齢モデルマウスの2細胞胚と桑実胚において、BCB陽性のものの出現頻度は、成熟モデルマウスから採取したそれらに比べて有意に低かったが、BCB陽性の胚の胚盤胞への発生率には動物の日齢による差はなかった。このことは、加齢動物の胚では、BCB陽性のものの出現頻度は有意に低いものの、陽性のものは成熟動物の胚と同程度に胚盤胞に発生し得ることを示しており、BCB染色は培養後に発生能の高い胚の非侵襲的選別に有効であると考えられた。

一方哺乳動物において、卵母細胞のG-6-PDH活性とBCBに対する染色性との間には密接な関係のあることが調べられている¹¹⁻¹⁵⁾。G-6-PDHはペントースリン酸経路の重要な位置を占める酵素で²²⁾、この酵素の作用によって産生されるNADPHは、ステロイドホルモンの生合成²³⁾、脂肪酸合成やコレステロールの還元的生合成²⁴⁾を促進すること、また、ブタでは酸化ストレスから卵母細胞を保護する役割²⁵⁾を果たしていることも知られている。また最近では、G-6-PDH活性は、卵母細胞の成熟分裂の再開にも関係していることが報告されている²⁶⁾。

哺乳動物の初期胚において、G-6-PDH活性は、動物種によって異なっているものの、概して発生の初期では高いが、発生の後半では低下することがマウス、ハムスター、ウシ、ウサギ、ブタおよびヒトで報告されている²⁷⁻³³⁾。しかしこれまでに、初期胚のBCBに対する染色性を調べた報告はみられず、哺乳動物の初期胚にも、卵母細胞と同様にG-6-PDH活性とBCBに対する染色性との間に関係があるのか否かは不明である。

本研究において、成熟モデルマウスの未受精卵子ならびに前核期から胚盤胞期までの胚についてG-6-PDH活性の組織化学的検出を行った。その結果、G-6-PDH活性は、未受

精卵子ではほとんどが強度であり、弱度および陰性のものは少数みられるのみであったが、前核期から胚盤胞期の胚では弱まり、弱度および陰性のものの割合が増加した。ハムスターの卵子と初期胚においても、G-6-PDH活性は、未受精期では強度が62.8%、弱度が25.6%であったものが、精子侵入期では強度が45.5%、弱度が31.8%、前核期では強度が38.9%、弱度が55.6%となり、受精が進行するに伴って低下することが確かめられている²⁸⁾。また、2細胞期から胚盤胞期までのハムスター胚では強度のものは出現せず、ほとんどの胚が弱度の活性を示すことが報告されており、本研究の Maus 卵子におけるG-6-PDH活性に関する結果は、ハムスター卵子²⁸⁾と同様の傾向を示すとともに、初期胚における結果も、これまでの報告²⁷⁻³³⁾と同様であることが確かめられた。また、強度のG-6-PDH活性を示す卵子と胚の割合およびBCBに陰性の卵子と胚の割合との間に相関があるのか否かを、ピアソンの相関係数検定およびスピアマンの順位相関係数検定を用いて検討した。その結果、両者の割合の変化は極めて類似しており、両検定においても両者の割合の変化には相関のあることが確認された。したがって、G-6-PDH活性とBCBに対する染色性との間には密接な関係のあることが初期胚でも確かめられ、今後、BCB染色によって胚のG-6-PDH活性を非侵襲的に推測することも可能であることが推察された。

本研究において、未受精卵子以外の前核期から胚盤胞期までの胚ではほとんどのものがBCBに陽性であり、2細胞期から桑実胚期までのBCB陽性の胚では胚盤胞への発生率も高いことが確かめられた。一方、排卵後の未受精卵子では、BCBに陽性のものは31.1%であり、多くのものがBCB陰性であった。BCBに陰性の未受精卵子の質、すなわち受精能とその後の発生能については明らかではないが、既述のように体外で成熟後の卵母細胞でBCBに陰性のものでも半数以上は受精すること^{1, 6)}から考えると、未受精卵子についてはBCBに対する染色性のみで質を論じるのは難しいように思われる。すなわち、G-6-PDH活性は、成熟分裂を再開したマウス卵母細胞では上昇するが、成熟が抑制されると低下すること^{26, 34, 35)}、また上述のように、受精が進行するに伴ってハムスター卵子では低下することが確かめられている²⁸⁾ので、排卵された未受精卵子では、G-6-PDH活性が強度から弱度に変化している過程にあり、そのためBCBに陰性のものが多く出現したものと考えられた。前核期では、ほとんどの卵子でG-6-PDH活性が弱度から陰性になるので、BCBにはすべての卵子が陽性になったものと考えられた。

文 献

- Rodríguez-González, E., López-Béjar, M., Velilla, E. and Paramio, M.T. (2002): Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology*, 57, 1397-1409.
- Pujol, M., López-Béjar, M. and Paramio, M.-T. (2004): Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*, 61, 735-744.
- Alm, H., Torner, H., Löhrke, B., Viergutz, T., Ghoneim, I.M. and 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*, 63, 2194-2205.
- Mlodawska, W., Pawlowska, A. and Kochan, J. (2005): Meiotic competence of mare oocytes selected using the brilliant cresyl blue test. *Havemeyer Found. Monograph Ser.*, 18, 18-21.
- Wongsrikeao, P., Otoi, T., Yamasaki, H., Agung, B., Taniguchi, M., Naoi, H., Shimizu, R. and Nagai, T. (2006): Effects 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.
- Manjunatha, B.M., Gupta, P.S.P., Devaraj, M., Ravindra, J.P. and Nandi, S. (2007): Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. *Theriogenology*, 68, 1299-1304.
- Wu, Y.-G., Liu, Y., Zhou, P., Lan, G.-C., Han, D., Miao, D.-Q. and Tan, J.-H. (2007): Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. *Cell Res.*, 17, 722-731.
- Torner, H., Ghanem, N., Ambros, C., Hölker, M., Tomek, W., Phatsara, C., Alm, H., Sirard, M.A., Kanitz, W., Schellander, K. and Tesfaye, D. (2008): Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction*, 135, 197-212.
- Catalá, M.G., Izquierdo, D., Uzbekova, S., Morató, R., Roura, M., Romaquera, R., Papillier, P. and Paramio, M.T. (2011): Brilliant cresyl blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. *Reproduction*, 142, 517-527.
- Paniker, N.V. and Beutler, E. (1972): Glucose-6-phosphate dehydrogenase and nadph diaphorase in cattle erythrocytes. *Anim. Sci.*, 34, 75-76.
- Mangia, F. and Epstein, C.J. (1975): Biochemical studies of growing mouse oocytes: preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. *Dev. Biol.*, 45, 211-220.
- 新村末雄・佐々木博之・石田一夫 (1980) : ハムスターにおける卵胞卵子のステロイド代謝に関する組織化学的研究. *日本畜産学会報*, 51, 192-196.
- De Schepper, G.G., Van Noorden, C.J.F. and Koperdraad, F. (1985): A cytochemical method for measuring enzyme activity in individual preovulatory mouse oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 74, 709-716.
- Ferrandi, B., Cremonesti, F., Geiger, R., Consiglio, A.L., Carnevali, A. and Porcelli, F. (1993): Quantitative cytochemical study of some enzymatic activities in preovulatory bovine oocytes after in vitro

- maturation. *Acta. Histochem.*, 95, 89–96.
- 15) Cetica, P., Pintos, L., Dalvit, G. and Beconi, M. (2002): Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction*, 124, 675–681.
 - 16) Tarin, J.J. (1996): Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Mol. Hum. Reprod.*, 2, 717–724.
 - 17) Armstrong, D.T. (2001): Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*, 55, 1303–1322.
 - 18) Malhi, P.S., Adams, G.P., Mapaletoft, R.J. and Singh, J. (2007): Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging. *Reproduction*, 134, 233–239.
 - 19) 豊田 裕・横山峯介・星冬四朗 (1971) : マウス卵子の体外受精に関する研究 I . 精巢上体精子による受精成績. 家畜繁殖研究会誌, 16, 147–151.
 - 20) Whittingham, D.G. (1971): Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 14, 7–21.
 - 21) Rudolph, G. and Klein, H.J. (1964): Histchemische Darstellung und Verteilung der Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Normalen Rattenorganen. *Histochemie*, 4, 238–251.
 - 22) Tian, W.N., Braunstein, L.D., Pang, J., Stuhlmeier, K.M., Xi, Q.C., Tian, X. and Stanton, R.C. (1998): Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *J. Biol. Chem.*, 273, 10609–10617.
 - 23) Savard, K., Marsh, J.M. and Howell, D.S. (1963): Progesterone biosynthesis in luteal tissue: role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and NADP-linked dehydrogenase. *Endocrinology*, 73, 554–563.
 - 24) Cetica, P., Pintos, L., Dalvit, G. and Beconi, M. (2002): Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 124, 675–681.
 - 25) Funahashi, H., Koike, T. and Sakai, R. (2008): Effect of glucose and pyruvate on nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes in a chemically defined medium. *Theriogenology*, 70, 1041–1047.
 - 26) Downs, S.M., Humpherson, P.G. and Leese, H.J. (1998): Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: involvement of the pentose phosphate pathway. *Biol. Reprod.*, 58, 1084–1094.
 - 27) Epstein, C.J., Wegienka, E.A. and Smith, C.W. (1969): Biochemical development of preimplantation mouse embryo: in vivo activities of fructose 1,6-diphosphate aldolase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase, and lactate dehydrogenase. *Biochem. Genet.*, 3, 271–281.
 - 28) 新村末雄・石田一夫 (1977) : ハムスターおよびブタの卵子におけるグルコース6リン酸脱水素酵素の組織化学的研究. 家畜繁殖学雑誌, 23, 72–75.
 - 29) Iwasaki, S., Shioya, Y., Monji, Y. and Nakahara, T. (1989): Developmental changes and sex difference in glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of bovine oocytes and embryos fertilized in vitro. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 35, 198–203.
 - 30) Brinster, R.L. (1970): Glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in the early rabbit and mouse embryo. *Biochem. Genet.*, 4, 669–676.
 - 31) De Schepper, G.G., Vander, P.C., Westerveld, A., Oosting, J. and Van Noorden, C.J.F. (1993): In situ glucose-6-phosphate dehydrogenase activity during development of pre-implantation mouse embryos. *Histochem. J.*, 25, 299–303.
 - 32) Martin, K.L., Hardy, K., Wiston, R.M.L. and Leese, H.J. (1993): Activity of enzymes of energy metabolism in single human preimplantation embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 99, 259–266.
 - 33) 新村末雄・大槻香苗 (2006) : 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化学的研究. 新潟大学農学部研究報告, 58, 39–43.
 - 34) Downs, S.M., Humpherson, P.G., Martin, K.L. and Leese, H.J. (1996): Glucose utilization during gonadotropin-induced meiotic maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 44, 121–131.
 - 35) Sutton-McDowall, M.L., Gilchrist, R.B. and Thomson, J.G. (2010): The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*, 139, 685–695.