

卵胞刺激ホルモン製剤 1 回投与による黒毛和種の過剰排卵処理簡易化の検討

研究開発第二課 西野 治* 山田育弘* 藤原朋子*** 安川幸子* 赤池 勝*

*現 奈良県家畜保健衛生所 ***現 研究開発第一課

要 約

黒毛和種の過剰排卵処理の省力化および牛への注射ストレス軽減のため、50ml (50ml 区) または 10ml (10ml 区) の生理食塩水に溶解した卵胞刺激ホルモン (FSH) 製剤 30AU の頸部皮下 1 回投与を行い、採胚成績および過剰排卵処理開始から採胚時の卵巢所見を、現在、一般的に用いられている投与方法である頸部筋肉内への漸減投与方法 (1 日 2 回・3 日間、FSH 製剤投与総量 20AU : 対照区) と比較した。

採胚成績では、50ml 区、10ml 区ともに対照区と比べて採胚総数 (21.0 個、16.0 個 vs. 10.3 個)、変性胚数および未受精卵数が増加した。しかし、正常胚数は 50ml 区 (12.3 個) が対照区 (8.0 個) と比較して増加したが、10ml 区 (5.0 個) は減少した。卵巢所見では、過剰排卵時の卵胞の発育は 3 区とも同様の経過であったが、直径 5mm 以上の卵胞数のピーク時点での数は、50ml 区、対照区、10ml 区の順で多く、それぞれ 28.0 個、20.0 個、17.7 個であった。採胚時の黄体数も 50ml 区、対照区、10ml 区の順で多く、それぞれ 19.0 個、17.0 個、6.7 個であった。

この結果より、FSH 製剤の 1 回投与による黒毛和種の過剰排卵処理は、溶媒となる生理食塩水の量を 50ml に増量することで、従来法と同程度の採胚成績が得られると考えられた。

目 的

黒毛和種の過剰排卵 (SOV) 処理は FSH 製剤を用いて行われることがほとんどである。SOV 処理では、SOV 誘起に必要なレベルの血清 FSH 濃度を一定期間維持する必要があるが、FSH はウシ体内からの消失速度が速いため、1 日 2 回・3～4 日間、筋肉内へ漸減投与するのが一般的となっている。しかし、投与回数が多く煩雑であり、特にフィールドでの普及の妨げになっていることや、注射による牛へのストレスが大きいことなどから処置回数が少なくなるような簡易的な方法の開発が望まれる。このような簡易的方法としては、これまでにポリビニルピロリドン (PVP) や水酸化アルミニウムゲルアジュバントを溶媒に添加して筋肉内に 1 回投与する方法や、尾椎硬膜外に投与する方法が報告されている。¹⁾²⁾³⁾これらの方法は、試験的には一定の有効性は示されているが、いずれも実用化または製品化されて普及するまでには至っていない。そこでこれらの方法に代わり、特殊な資材や手技を必要としない方法として、生理食塩水に溶解した FSH 製剤を皮下に投与する方法を試みた。一般的に皮下投与は、従来の筋肉内投与に比べて薬剤の吸収が遅くなる。今回は、1 回の皮下投与で、頻回の筋肉内投与を行う場合と同程度の FSH の感作時間および採胚成績を得るために最適な FSH 量および生理食塩水量について検討した。

なお、本試験は 11 府県による共同研究であり、この報告は奈良県実施分 (生理食塩水量の検討) のデータを元に作成した。

材料および方法

1) 試験区の設定 (SOV 処理の方法)

50ml 区：FSH (アントリン R10、共立製薬株式会社) 30AU を 50ml の生理食塩水に溶解し、全量を頸部皮下 1 カ所に投与した。

10ml 区：FSH 30AU を 10ml の生理食塩水に溶解し、全量を頸部皮下 1 カ所に投与した。

対照区：FSH 20AU を添付の溶解液に溶解し、2 回/日・3 日間 (計 6 回) に分けて頸部筋肉内に投与した。

2) 供試牛および試験期間 (表 1)

奈良県畜産技術センターに繋養している、卵巢などに異常のない黒毛和種繁殖雌牛 3 頭を供試した。試験期間は、平成 22 年 5 月から 10 月で、各供試牛 3 回 (上記の過剰排卵処理の方法をそれぞれ 1 回ずつ) の採胚を実施し、それぞれの採胚間隔は 63 日以上とした。

表 1 供試牛の情報

牛番号	B156	B158	B154	
生年月日	H18.6.14	H18.7.19	H17.11.7	
産歴	2	2	2	
最終分娩日	H22.3.8	H22.3.15	H21.12.29	
過去の平均正常胚数	10.0	10.5	2.5	
試験処理	1 回目	50ml 区	10ml 区	対照区
	2 回目	10ml 区	対照区	50ml 区
	3 回目	対照区	50ml 区	10ml 区

3) SOV 処理プログラム (各試験区共通の処理・図 1)

発情および発情直後を避けて、膈内留置型プロゲステロン・エストラジオール配合剤 (PRID：あすか製薬株式会社) を挿入した (挿入日を day 0 とする)。

FSH の投与は、50ml 区および 10ml 区は day 4 午前に、対照区は day 4～day 6 の午前および午後 (計 6 回) に行い、プロスタグランジン F2 α 製剤 (PG、クロプロステノールとして 750 μ g) を day 4 午前に、頸部筋肉内 (FSH 投与と異なる部位) に投与した。その後、day 6 午前に PRID を除去、day 7 午後にブセレリン製剤 (GnRH、ブセレリンとして 10 μ g) を頸部筋肉内に投与し、day 8 午後に人工授精 (AI) を 1 回行い、

day 15 に採胚を実施した。

なお、午前および午後の処理時刻は、飼養管理上の都合により 9 時および 16 時とし、AI 用の凍結精液は、供試牛毎に同じ種雄牛、同じ採精ロットのものを使用した。

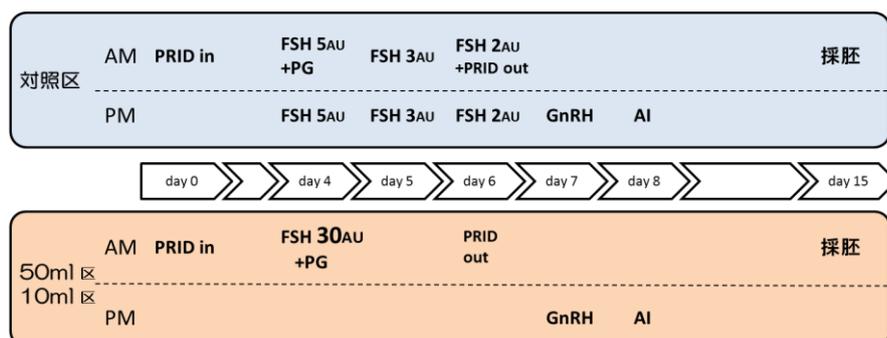


図 1 採胚に関する処置プログラム

4) 卵巢所見

SOV 処理開始時から AI 後までの卵巢所見を、超音波画像診断装置 (エコー、本体：ECHOPAL II、探触子：EUP-033 7.5MHz・日立メディコ) を用いて、SOV 処理開始時および SOV 処理開始の 24・48・72・96・120 時間後に観察した。黄体数および卵胞数を記録したが、卵胞は直径により大 (5mm 以上) および小 (5mm 未満) に区分してそれぞれの数を記録した。

5) 採胚成績

採胚は当センターの定法に従って実施し、この時の回収卵数、正常胚数およびランク (A~C)、変性胚数、未受精卵数を採胚成績として記録した。なお、正常胚の品質および変性胚、未受精卵の判定は「胚の衛生的取り扱いマニュアル」の「胚の品質コード」に準じて行った(表2)4)。また、採胚時の卵巢所見について、SOV 処置時と同様にエコーを用いて黄体数および卵胞数 (大または小に区分) を観察した。

表2 正常胚ランクの基準

胚ランク	IETSコード
A	→ Code 1 excellent
A'	→ Code 2 good
B	→ Code 3 fair
C	→ Code 4 poor
変性胚	→ Code 4
未受精卵	→ (1細胞のもの)

結果

1) 卵巢所見

SOV 処理開始から採胚時までの黄体数および卵胞数の推移は図2の通りであった。

SOV 処理開始時の黄体数は、0 または 1 個で、SOV 処理開始後 24h にはエコーで確認できなくなり、120h まで各試験区とも 0 個で推移した。採胚時は 50ml 区が 19.0 個、対照区が 17.0 個とほぼ同数であったが、10ml 区は 6.7 個であった。

SOV 処理開始時の卵胞数は各試験区間で差はなく、いずれも SOV 開始後 48h 頃から卵胞の発育 (大卵胞数の増加および小卵胞数の減少) が認められた。AI 直前 (96h) の最終的な大卵胞数は対照区と比較して 50ml 区がやや多く、10ml 区がやや少なくなり、AI 翌日 (120h) には全ての試験区で大卵胞数の低下、すなわち排卵したと推定された。平均推定排卵数は 50ml 区が 21.3 個と最も多く、次いで対照区が 12.0 個、10ml 区は 8.7 個で最も少なかった。

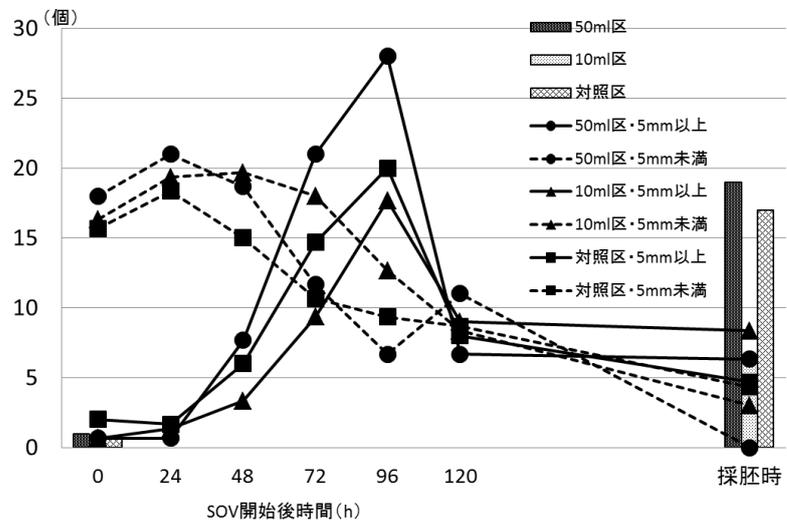


図2 黄体数および卵胞数の推移

2) 採胚成績

採胚成績は図3のとおりであった。50ml 区は、対照区と比べて回収卵数・正常胚数が多くなったが、変性胚数・未受精卵数も増加し、正常胚率が低下した。一方、10ml 区は対照区と比べて回収卵数が多かったが、正常胚数が減少したため、正常胚率は大きく低下した。また、各試験区の A'

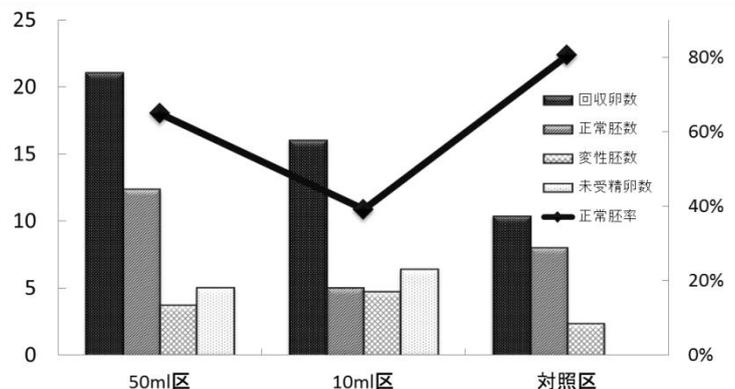


図3 採胚成績

ランク以上胚数および胚率（A'ランク以上胚数/正常胚数）は 50ml 区が 9.3 個・90.3%、10ml 区が 4.0 個・75.0%、対照区が 7.3 個・92.9%であった。

考 察

本試験は、黒毛和種の SOV 処理で標準的に用いられてきた、FSH の筋肉内への漸減・頻回投与に代わる方法として FSH 皮下 1 回投与が可能かを検討するために実施した。共同試験全体では、投与 FSH 量（20AU および 30AU）および生理食塩水量（50ml および 10ml）を変えて比較検討したが、この中で本県では 1 回投与時の FSH 感作時間がより長く、確実に SOV 誘起が期待できる FSH 30AU での投与試験を実施した。

今回、卵巣所見について、本県のこれまでの報告では卵胞の大きさを“大”（10mm 以上）、“中”（5mm 以上 10mm 未満）、“小”（5mm 未満）に区別し、SOV 開始から AI 翌日までの卵胞の発育・成熟状況および、採胚時の遺残卵胞の目安としていた。しかし、今回供試した 3 頭は AI 前（96h）の所見では、ほぼ全てが“大”の 10mm 以上まで達しなかった一方、採胚時の所見では 90%以上が“大”か“小”に分かれた。この理由は、AI 前については、今回の SOV 処理による卵胞の発育数が、これまでの各牛の SOV 反応性に比べてかなり多かったため、通常のウシ成熟卵胞の大きさである 12～19mm 程度に達する空間的余裕が各牛の卵巣にはなく、多くの卵胞が 10mm に満たない大きさであるにもかかわらず、排卵したと考えられた。採胚時については、120h の時点で残っていた 5mm 以上の卵胞、すなわちその時点までに排卵しなかったと考えられる卵胞が、近くの卵胞が排卵したことによって発生した空間を生かして大きくなり、そのほとんどが 10mm 以上の遺残卵胞と思われる大きさまで達したと推測される。なお、この推測は 120h と採胚時の 5mm 以上卵胞数がほぼ同数であることと、その大きさが採胚時には 10mm 以上と大きくなっていくことによるものである（データは示していない）が、実際には 120h から採胚までの間の卵巣観察を行って確認する必要がある。以上のことから本報告では「大」5mm 以上と「小」5mm 未満の 2 つの区分で卵胞の発育・成熟および採胚時の卵胞の遺残状況を判断した。

卵胞数は、各試験区ともおおむね同様の傾向、すなわち 24h～48h の間で小卵胞数の減少と大卵胞数の増加（卵胞の発育）が始まり、96h に大卵胞数が最大（成熟卵胞）になり、120h にかけて大卵胞数が急減（排卵）した。この卵胞数の推移について、対照区を基準に比較すると卵胞数の変化が 50ml 区は著しく、10ml 区は緩やかかつやや遅れる傾向が認められた。これは、生理食塩水 50ml に FSH 30AU を溶解した場合、皮下投与により FSH の吸収が遅れ、供試牛の血中 FSH 濃度の体内動態が対照区の処理の場合と近くなるとともに、投与量を増やしたことで卵胞の発育数が若干増加したと推察された。一方で、生理食塩水を 10ml にした場合は溶媒量が少なく、皮下投与をもってしても FSH の吸収を十分に遅延させることができず、その結果 FSH 投与による卵胞発育が鈍くなった可能性が考えられる。

採胚成績は、50ml 区では対照区を上回る回収卵数・正常胚数および A'ランク以上胚数が得られた。一方、10ml 区では対照区よりも回収卵数が増えたものの、それ以上に変性胚数や未受精卵数が増加してしまい、正常胚数の減少とともに A'ランク以上胚の割合も低下した。図 2 で示すように、10ml 区の

卵胞の発育が緩徐・遅延の傾向であることから、排卵時間の遅延やばらつき、不十分な成熟などにより変性胚や未受精卵の割合が増加した可能性がある。なお、この点については共同研究者から FSH 1 回投与による発情開始時期や発情持続時間の変化について指摘されていることもあり、今後の検討事項としていく必要がある。

これらのことから、黒毛和種の SOV 処理は FSH 製剤の皮下 1 回投与により問題なく実施できる可能性があると考えられたが、従来と同程度の採胚成績を得るためには溶媒量を筋肉内投与の場合よりも多い 50ml とすることが適当であると考えられた。

参考文献

- 1) 億 正樹 ら：効率的過剰排卵処理法の開発(第 3 報) 奈良県畜産技術センター研究報告 第 28 号 1-6 (2002)
- 2) 赤塚裕人 ら：黄体ホルモン製剤(CIDR)を用いた連続過剰排卵処理の検討(第3報) 宮崎県畜産試験場研究報告 第 11 号 1-5 (1998)
- 3) 磯崎良寛 ら：黒毛和種雌牛における卵胞刺激ホルモン皮下1回投与による過剰排卵誘起法 第1報 水酸化アルミニウムゲル吸着卵胞刺激ホルモン投与牛における血漿中卵胞刺激ホルモン濃度の推移および過剰排卵誘起効果 福岡県農業総合試験場研究報告 第 26 号 61-64 (2007)
- 4) 社団法人畜産技術協会：胚の衛生的取り扱いマニュアル第 3 版 (2001)