

1. ヒアルロン酸添加 FSH 製剤 1 回投与法の検討

研究開発第二課 中島岳人・麻植香菜子・河野仁※・武平有理子・朝倉康夫※※

※ 現 奈良県家畜保健衛生所 ※※ 現 奈良県畜産課

要 約

本試験では、黒毛和種牛の過剰排卵処置において、卵胞刺激ホルモン（FSH）製剤の溶媒にヒアルロン酸を添加した皮下 1 回投与法を用いることで、溶媒の投与量を減量させるとともに、採胚成績が向上するか検討した。本試験で使用するヒアルロン酸としては、馬の非感染性関節炎治療薬であるハイオネート（ベーリンガーインゲルハイム社）を用いた。過剰排卵処置の投与内容の異なる 3 つの試験区（1 区：20AU/10ml 生食、2 区：20AU/6ml 生食+ハイオネート 4ml、3 区：20AU/50ml 生食）を設定し、採胚成績および卵胞発育成績から比較した。本試験はラテン方格法により試験区の配置を行ったが、結果としては、供試牛ごとの差が非常に大きく、各試験区について特徴的な傾向は見られなかった。しかし、溶媒量に関してはヒアルロン酸を添加することで、皮下 1 回投与法においても減量することが可能であることが示唆された。今後は例数を増やして検討することが必要である。本試験は 7 県との共同研究として行っており、本報告は当県のデータのみでの報告である。

緒 言

ウシの体内胚生産において卵胞刺激ホルモン（FSH）の漸減投与法による過剰排卵処置は、注射回数が多く牛へはストレスとなり人へは作業負担がかかり、これらの軽減が長年の課題になっていた。近年、当県が参加する共同研究グループは生理食塩水の溶媒を増量した FSH 皮下 1 回投与法が漸減投与法と同等の採胚成績を得られることを報告した^{1,2,3)}。

黒毛和種牛の過剰排卵処理における採胚成績は、FSH 投与前に大卵胞を消失させ卵胞波の調整を行うことで向上することが知られている^{4,5)}。

当県が参加する共同研究グループでは従来、卵胞波の調整をエストラジオール（E2）で行ってきたが、欧州では E2 の使用が禁止となっており日本においても今後使用できるか不透明であることから、E2 を使用しない卵胞波調整方法を検討してきた。検討の結果、臍内留置型プロジェステロン徐放剤（CIDR）挿入と同時にプロスタグランジン F2 α 製剤（PGF2 α ）を投与することで主席卵胞を形成させ、その 7 日後の性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤（GnRH）投与により排卵させる卵胞波調整法により、E2 を用いた卵胞波調整法と同等の採胚成績を得た⁶⁾。

一方、ヒアルロン酸の薬剤徐放効果を利用し、FSH 製剤の溶媒に 5%ヒアルロン酸溶液を用いて過剰排卵処置を行うことで、FSH 製剤の投与量及び頻度が少なくてすむこと、黄体数や受精卵数、及び移植・凍結可能胚数が増加するという報告がある⁷⁾。

そこで本試験では、前述の卵胞波調整法に加えて、FSH 製剤の溶媒にヒアルロン酸を添加した皮下 1 回投与法を用いることで、溶媒の投与量を減量させるとともに、採胚成績が向上するか検討した。

なお、本試験は 7 県との共同研究として行っており、本報告は当県のデータのみでの報告である。

材料及び方法

1. 方法

以下の通り、過剰排卵処置の投与内容の異なる3つの試験区を設定した。

1区：20AU/10ml 生食

2区：20AU/ 6ml 生食＋ハイオネート 4ml

3区：20AU/50ml 生食（対照区）

ハイオネート（ペーリンガーインゲルハイム社）はヒアルロン酸ナトリウム（10mg/1ml）を主成分とする馬の非感染性関節炎治療薬であるが、静脈注射も可能であり安全性が高いと考えられるため、獣医師の責任において今回の試験に使用した。

・採胚プログラム（全試験区共通）

発情日および発情直後を避けて、CIDR（CIDR1900：ゾエティスジャパン）を挿入し、同時に PGF2 α （エストラメイト：株式会社インターベット）3ml を投与した。CIDR 挿入日を0日目として、7日目午後に GnRH（イトレリン：あすか製薬株式会社）1.25ml を投与した。10日目午前に試験区ごとに溶媒を調整した FSH（アントリン R10：共立製薬株式会社）20AU を頸部皮下に1回投与した。12日目午前に PGF2 α を 3ml 投与し、13日目午後に GnRH2.5ml を投与した。14日目午後に定時 AI、21日目午前に採胚した（図1）。

● 全試験区

Day	0	7	10	12	13	14	21
午前 (9:00)	CIDR 挿入 PG(3ml)		FSH (1回投与)	CIDR 除去 PG(3ml)			採胚
午後 (16:00)		GnRH (1.25ml)			GnRH (2.5ml)	AI	

図1 採胚プログラム

2. 供試牛

当センターで繋養している黒毛和種経産牛3頭を各試験区1回ずつ供試（ラテン方格法により試験区を配置）し、計9回採胚を行い、それぞれの採胚間隔は63日以上とした（表1）。

表1 供試牛

牛番号	B192	B158	B229
生年月日	H22.6.14	H18.7.19	H28.9.10
産歴	2	5	1
最終分娩日	H27.2.15	H31.1.8	H30.8.13
過去の平均正常胚数	5.5	13.9	8.0
採胚（試験区）の順	1区→2区→3区	2区→3区→1区	3区→1区→2区

3. 調査項目

採胚成績においては採胚時に採胚総数、正常胚数、変性胚数、未受精卵数、採胚時黄体数、遺残卵胞数を記録し、実体顕微鏡による形態学的な卵質調査を行った。正常胚の品質および変性胚、未受精卵の判定は「胚の衛生的取扱いマニュアル」の「胚の品質コード」に準じて行った⁸⁾。

また卵巣所見はCIDR挿入時、及びFSH投与時から21日目の採胚日まで毎日、超音波画像診断装置（日立メディコ 本体；ECHOPAL II、プローブ；EUP-033(7.5MH)）により黄体数及び卵胞発育調査を行った。卵胞は直径により10mm以上を大卵胞、6～9mmを中卵胞、5mm以下を小卵胞と区分して記録した。なお、供試数が少ないため統計処理については行わず、個体ごとの結果について調査した。

結 果

・B192に関しては、1区で卵胞の発育が優れ、黄体数15、採胚総数14であったが、回収胚の内訳は正常胚数2、変性胚数5、未受精卵7であり、正常胚率14.3%であった（図2、表2）。また正常胚のランクは全てBランクであった（表3）。2区では、卵胞の発育は1区と比較して劣っており、黄体数7、採胚総数4であったが、回収胚は全て正常胚（正常胚数4）であり、全てAランクであった（図2、表2、表3）。3区では、卵胞の発育はある程度見られ、黄体数は10であったが、採胚総数2、正常胚数1（Aランク）と採胚成績は不良であった（図2、表2、表3）。遺残卵胞数は1区・2区・3区ともに1であり、全区で少なかった（図2）。

・B158に関しては、1区では2区・3区と比較して卵胞の発育は劣っていた（図2）。採胚成績は、黄体数18、遺残卵胞数12、採胚総数15、正常胚数12、変性胚数1、未受精卵数2、正常胚率80.0%であった。胚質成績としては、A+A'ランクの割合は83.3%であった（表3）。2区では卵胞の発育は非常に優れていたものの、他の試験区と違い、中卵胞のピークがAI時にきていた（図2）。採胚成績は、黄体数31、遺残卵胞数18、採胚総数38、正常胚数23、変性胚数6、未受精卵数9、正常胚率60.5%であり、他の試験区と比較して採胚総数は最も多かったものの、正常胚率は1区には及ばなかった（表2）。胚質成績としては、A+A'ランクの割合は52.2%であり、他の試験区と比較して劣っていた（表3）。3区においても卵胞の発育は優れ、採胚成績は、黄体数24、遺残卵胞数25、採胚総数19であったが、回収胚の内訳は正常胚数9、変性胚数3、未受精卵数7、正常胚率47.7%であり、他の試験区と比較して正

常胚率が劣っていた（表 2）。遺残卵胞数は全区で多かったが、特に 3 区で最多であった（表 2）。胚質成績としては、A+A' ランクの割合は 88.9%であった（表 3）。

・B229 に関しては、採胚成績では、1 区で採胚総数 0、2 区・3 区で採胚総数 1、正常胚数 1 と不良であった（表 2）。3 区のみある程度卵胞の発育が見られた（図 2）。

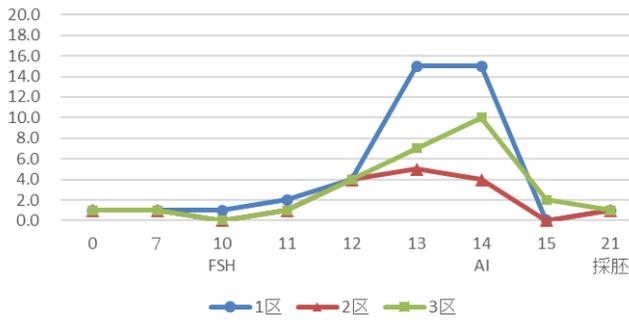
表 2 採胚成績

牛番号	採胚の順	試験区	黄体数	遺残卵胞数	採胚総数	正常胚数	変性胚数	未授精卵数	正常胚率
B192	1 区→	1 区	15	1	14	2	5	7	14.3%
	2 区→	2 区	7	1	4	4	0	0	100.0%
	3 区	3 区	10	1	2	1	0	1	50.0%
B158	2 区→	1 区	18	12	15	12	1	2	80.0%
	3 区→	2 区	31	18	38	23	6	9	60.5%
	1 区	3 区	24	25	19	9	3	7	47.4%
B229	3 区→	1 区	3	1	0	0	0	0	—
	1 区→	2 区	2	1	1	1	0	0	100.0%
	2 区	3 区	4	1	1	1	0	0	100.0%

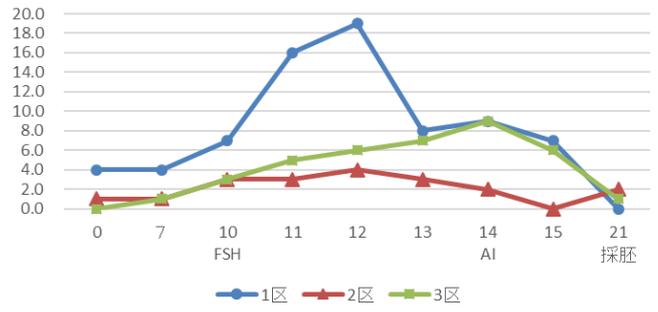
表 3 胚質成績

牛番号	採胚の順	試験区	A	A'	A+A'	B	C	A+A'の割合
B192	1 区→	1 区	0	0	0	2	0	0%
	2 区→	2 区	4	0	4	0	0	100%
	3 区	3 区	1	0	1	0	0	100%
B158	2 区→	1 区	0	10	10	0	2	83.3%
	3 区→	2 区	5	7	12	5	6	52.2%
	1 区	3 区	4	4	8	1	0	88.9%
B229	3 区→	1 区	0	0	0	0	0	—
	1 区→	2 区	1	0	1	0	0	100%
	2 区	3 区	0	1	1	0	0	100%

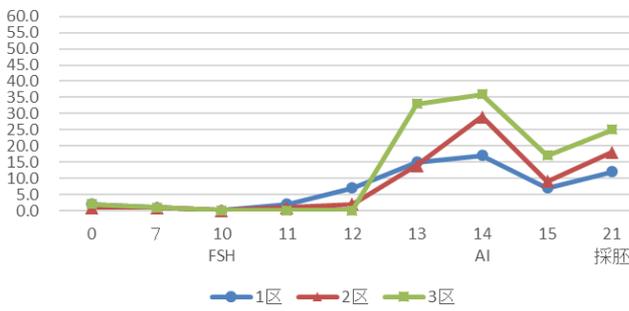
B192 大卵胞数の推移



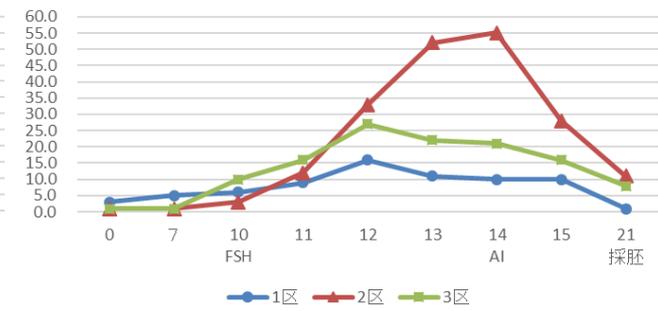
B192 中卵胞数の推移



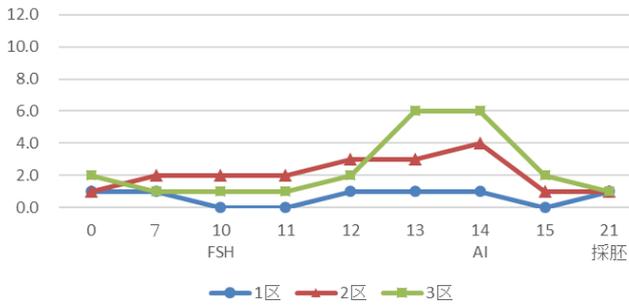
B158 大卵胞数の推移



B158 中卵胞数の推移



B229 大卵胞の推移



B229 中卵胞数の推移

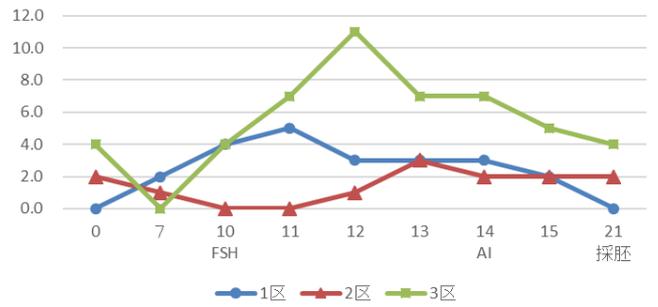


図2 卵胞数の推移

考 察

・B192の結果として、初回の採胚である1区で最も卵胞の発育が優れ、採胚総数も多かったものの、変性胚および未受精卵が多く、正常胚率が14.3%と非常に悪かった。2回目の採胚である2区では、卵胞の発育、採胚総数とも1区と比較して劣っていたが、正常胚率は100%であった。3回目の採胚である3区では、2区と比較して卵胞の発育は優れていたが、採胚成績は不良であった。

・B158に関しては、初回の採胚である2区で、中卵胞数のピークがAI時にきていた。これは、卵胞の発育が非常に優れていたため、卵胞が密集し発育スペースが限られたことが原因であり、AIの翌日（Day15）には中卵胞数も半減していることから、中卵胞の半数は発育は十分であり排卵可能であったと考えられる。2区は採胚総数は非常に多かったが、変性胚数および未受精卵数も比較的多く、また胚質成績もA+A'ランクの割合は52.2%と他の試験区と比較しても劣っていた。これは、発育卵胞が多いため、それぞれの卵胞の排卵のタイミングにずれが生じた可能性が考えられる。B158は、全試験区で卵胞が多く発育したが、採胚回数を重ねるごとに卵胞発育は低下した。採胚間隔は63日以上としていたものの、特に初回の発育卵胞が多かったため、次の採胚の卵巣のFSHへの反応性に影響を及ぼした可能性が考えられる。全試験区で遺残卵胞数が多かったことも、発育卵胞の多さによるものと考えられるが、2回目の採胚である3区では、特に遺残卵胞数が多い結果となり、正常胚率も最も劣っていた。しかし、正常胚のA+A'ランクの割合は88.9%であり、胚質成績は優れていた。3回目の採胚である1区では、2区・3区と比較して卵胞の発育および採卵総数は劣るものの、正常胚率は80.0%と最も高く、胚質成績も優れていた。

・B229に関しては、初回の採胚であったためか3区のみ卵胞の発育自体は見られたが、続く1区2区では卵胞の発育も非常に悪かった。採胚成績は全区で不良であり、牛自体の問題と考えられた。

・本試験はラテン方格法により試験区の配置を行ったが、結果としては、供試牛ごとの差が非常に大きく、各試験区について特徴的な傾向は見られなかった。しかし、採胚成績不良であったB229を除き、B192およびB158の2頭において各試験区を比較すると、1区では正常胚率がB158で高く、B192で非常に低くなったが、2区に関してはB192・B158ともにそれぞれの3区よりも採胚成績は優れた結果となった。少なくとも溶媒量に関してはヒアルロン酸を添加することで、皮下1回投与方法においても減量することが可能であることが示唆された。今後は例数を増やして検討することが必要であり、他県との共同研究グループの結果と併せて検討する。

参考文献

- 1) 西野 治ら：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の簡易化の検討 奈良県畜産技術センター研究報告 第40号 1-5 (2015)
- 2) 平泉真吾ら：生理食塩水を溶媒とした卵胞刺激ホルモン（FSH）皮下1回投与方法により牛の過剰排卵処理が可能である 第24回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨 52-53
- 3) 平泉真吾ら：Superovulatory response in Japanese Black cows receiving a single subcutaneous porcine FSH treatment or six intramuscular treatments over three days, Theriogenology Vol.83 No.4 466-473(2015)
- 4) Guilbault, L.A. et al：Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle, Reprod. Fertil.,91:81-89 (1991)

- 5) Huhtinen, M. et al : Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows, *Theriogenology*, 37:457-463 (1992)
- 6) 水木若菜ら: 黒毛和種における過剰排卵処理の効率化および簡易化に向けた取り組み 日本胚移植学雑誌 Vol.40 No.2 33-39(2018)
- 7) Biancucci, A. et al : Reducing treatments in cattle superovulation protocols by combining a pituitary extract with a 5% hyaluronan solution: Is it able to diminish activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis compared to the traditional protocol?, *Theriogenology* Vol.85 No.5 914-921(2016)
- 8) 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)