

eCG を併用した FSH 皮下 1 回投与による過剰排卵処理の検討

第 1 報 漸減投与との比較と eCG 投与回数 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

前報では生理食塩水に溶解した卵胞刺激ホルモン (FSH) 製剤の頸部皮下 1 回投与によって、従来の漸減投与と同等の採胚成績が得られることを報告した。今回、FSH 1 回投与法の採胚成績向上を期待し、妊馬血清性腺刺激ホルモン (eCG) 製剤を併用した採胚を行い、その成績を比較・検討した。まず、試験 1 として、従来の 3 日間漸減投与法 (漸減対照区) と、3 日目の FSH の代わりに eCG を 400 単位投与 (午前に 400 単位 : 漸減 1 回区、午前と午後に各 200 単位 : 漸減 2 回区) して採胚した。漸減 1 回区は漸減対照区とほぼ同等の過剰排卵処理開始から採胚時までの卵胞数の推移、および採胚成績 (漸減 1 回区 : 黄体数 16.3 個、採胚総数 18.0 個、正常胚数 10.0 個、漸減対照区 : 黄体数 20.7 個、採胚総数 17.3 個、正常胚数 13.0 個) を示したが、漸減 2 回区では人工授精前後の 5mm 以上卵胞の減少数が少なく、採胚成績でも黄体数 8.7 個、採胚総数 8.3 個、正常胚数 5.0 個と減少した。次に、試験 2 として、FSH 1 回投与の 2 日後に eCG を 400 単位投与 (午前に 400 単位 : OS 1 回区、午前と午後に各 200 単位 : OS 2 回区) して採胚を行い、eCG を投与しない場合 (OS 対照区) との採胚成績を比較した。採胚成績は、OS 対照区の黄体数 25.7 個、採胚総数 18.0 個、正常胚数 5.3 個に対し、OS 1 回区と OS 2 回区はそれぞれ黄体数 15.7 個、13.0 個、採胚総数 13.7 個、15.0 個、正常胚数 7.3 個、8.7 個で、黄体数および採胚総数はやや少なくなったが、正常胚数は増加した。卵胞数の推移には、3 試験区間での差はなかった。

緒 言

従来、黒毛和種の過剰排卵 (SOV) 処理は一般的に FSH 製剤を 1 日 2 回・3～4 日間、筋肉内へ漸減投与することにより行っている。しかし、我々は前報¹⁾により 50ml の生理食塩水に溶解した FSH 製剤を頸部皮下に投与することによって従来の漸減投与と同等の SOV 反応および採胚成績が得られることを明らかにした。そこで、今回は FSH 1 回投与法 (OS 法) による採胚成績を向上させるために、eCG 製剤を併用し、その効果を確認・検証した。

なお、本試験は 11 県による共同研究であり、この報告は奈良県実施分のデータを元に作成した。

材料および方法

1) 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、卵巣などに異常のない黒毛和種繁殖雌牛 6 頭(試験 1 および試験 2 に各 3 頭)を供試した。試験は平成 23 年 5 月から 11 月にかけて、各供試牛 3 回の採胚を実施し、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	B151	B179	B168	B170	B142	B165	
生年月日	H16.11.13	H20.8.3	H19.5.12	H19.5.18	H16.8.22	H19.4.5	
産歴	3	1	2	2	3	2	
最終分娩日	H22.12.21	H22.12.21	H22.12.26	H22.11.29	H22.11.23	H22.12.3	
過去の平均正常胚数	8.6	8.0	15.4	5.0	8.9	15.4	
試験処理	1回目	漸減1回区	漸減対照区	漸減2回区	OS1回区	OS対照区	OS2回区
	2回目	漸減2回区	漸減1回区	漸減対照区	OS2回区	OS1回区	OS対照区
	3回目	漸減対照区	漸減2回区	漸減1回区	OS対照区	OS2回区	OS1回区

2) SOV 処理プログラム (図 1・図 2)

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 製剤 (アントリン R10、共立製薬株式会社) および eCG 製剤 (セロトロピン、あすか製薬株式会社) は、試験区の設定で示すとおりに投与した。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) は、day 4 午前中に頸部筋肉内 (FSH 投与と異なる部位) に投与し、day 6 午前中に 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。また、前報では、FSH の投与量を 30AU、溶媒 (生理食塩水) を 50ml で漸減投与法と同程度の採胚成

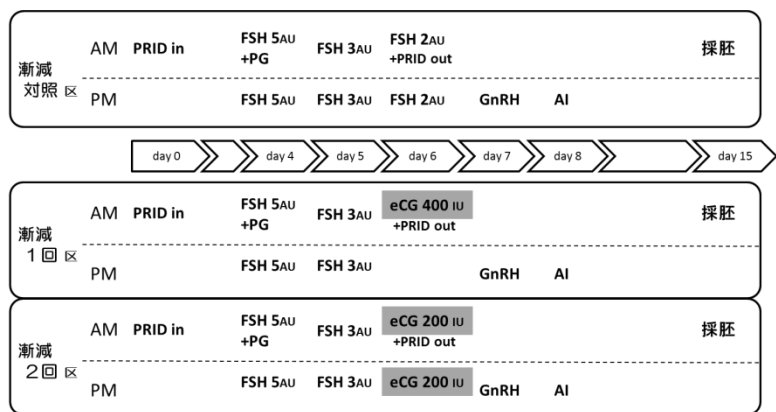


図 1 採胚に関する処置プログラム(試験1)

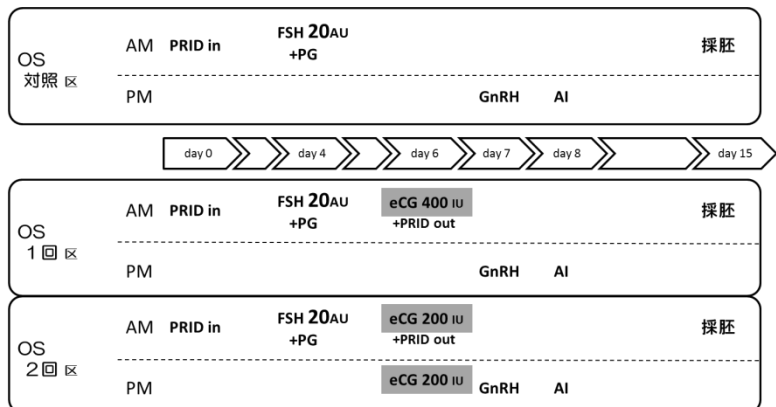


図 2 採胚に関する処置プログラム(試験2)

績となったと報告した。しかし、さらに供試牛の血中 FSH 濃度測定の結果から、1 回投与方法でも FSH 投与量を 20AU にした時に、従来法と同じタイミング（投与後 10～12h）でほぼ同じ濃度（0.8ng/ml）のピークを形成し、その後の血中濃度の低下も緩やかであった²⁾ことから、今回の試験での FSH 投与量は 20AU とした。

3) 試験区の設定 (図 1・図 2)

<試験 1>

漸減 1 回区：FSH 製剤を day 4～day 5 の午前および午後（計 4 回・5、5、3、3AU）に、eCG 製剤 400 単位を day 6 午前に、それぞれ頸部筋肉内に投与した。

漸減 2 回区：FSH 製剤を day 4～day 5 の午前および午後（計 4 回・5、5、3、3AU）に、eCG 製剤 200 単位を day 6 午前および午後に、それぞれ頸部筋肉内に投与した。

漸減対照区：FSH 製剤を day 4～day 6 の午前および午後（計 6 回・5、5、3、3、2、2AU）にそれぞれ頸部筋肉内に投与した。

<試験 2>

OS 1 回区：FSH 製剤は 20AU を 50ml の生理食塩水に溶解（20AU / 50ml）し、day 4 午前に頸部皮下 1 カ所に、eCG 製剤 400 単位を day 6 午前に頸部筋肉内に投与した。

OS 2 回区：FSH 製剤 20AU / 50ml を day 4 午前に頸部皮下 1 カ所に、eCG 製剤 200 単位を day 6 午前および午後に頸部筋肉内に投与した。

OS 対照区：FSH 製剤 20AU / 50ml を day 4 午前に頸部皮下 1 カ所に投与した。

4) 卵巣所見

SOV 処理開始時から採胚時までの卵巣所見を、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）を用いて観察した。SOV 処理開始時（day 4）から採胚日（day 15）の間の毎日、午前に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、未受精卵の判定は前報と同じく「胚の衛生的取り扱いマニュアル」³⁾の「胚の品質コード」に準じて行った。また、採胚時の卵巣所見について、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。

結果

1) 卵巣所見

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試験 1 が図 3 の、試験 2 が図 4 の通りであった。

試験 1、試験 2 とともに SOV 処理開始時の平均黄体数は、0 または 1 個で、SOV 処理開始後 day 5～day 7 の間にエコーで確認できなくなった。その後、day 10 頃から黄体の形成が確認され始め、day 15 の採胚時まで増加した。採胚時平均黄体数は試験 1 の漸減 1 回区が 16.3 個、漸減 2 回区が 8.7 個、漸減対照区が 20.7 個、試験 2 の OS 1 回区が 15.7 個、OS 2 回区が 13.0 個、OS 対照区が 25.7 個と試験 1、試験 2 とともに大きなばらつきが見られた。

SOV 処理開始時の平均卵胞数は、大卵胞数の 0～1.3 個に対し、小卵胞数が 17.3 個から 35.7 個と各試験区でやや差があった。その後、SOV 処理による卵胞の発育により、day 8 (AI 日) にかけて小卵胞数が減少し、大卵胞数は試験 1、試験 2 の各試験区とともに約 20 個まで増加した。AI 翌日の day 9 には、OS 2 回区を除いて大卵胞数の大幅な低下、すなわち排卵したことが推測された。平均推定排卵数は、試験 1 の漸減 1 回区が 13.7 個、漸減対照区が 22.3 個、試験 2 の OS 1 回区が 16.0 個、OS 2 回区が 13.7 個、OS 対照区が 19.7 個で、その後採胚日まで緩やかな大卵胞数の増加と小卵胞数の減少の傾向が認められた。OS 2 回区は AI 前後の大卵胞数の減少数（推定排卵数）が 8.0 個と他の試験区と比較して少なく、その後大卵胞数が day 10～day 15 にかけて減少した。

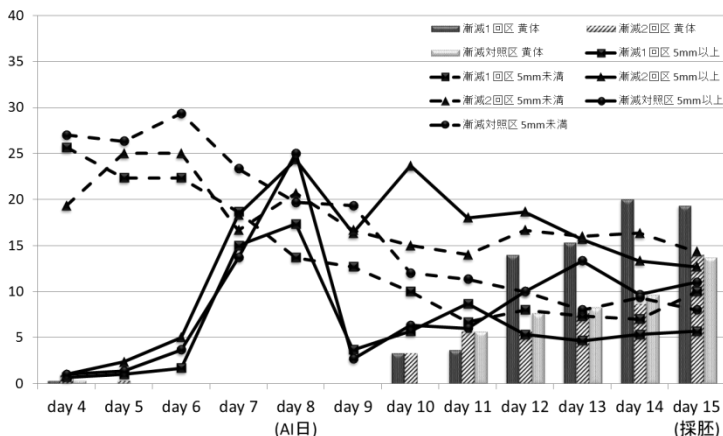


図3 卵巣所見(試験1)

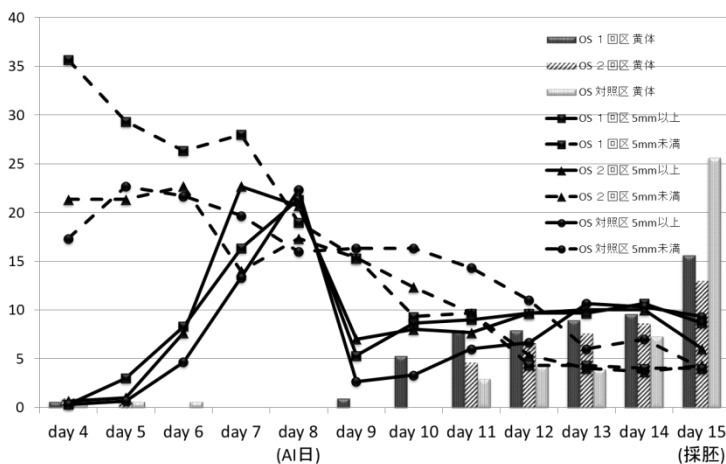


図4 卵巣所見(試験2)

2) 採胚成績

採胚成績は試験 1 が図 5 の、試験 2 が図 6 のとおりであった。

試験 1 では漸減対照区に比べ、漸減 1 回区はほぼ同等の成績であったが、漸減 2 回区は未受精卵数を除くすべてが減少した。A'ランク以上胚数および胚率（A'ランク以上胚数/正常胚数）は漸減 1 回区が 5.3 個・53.3%、

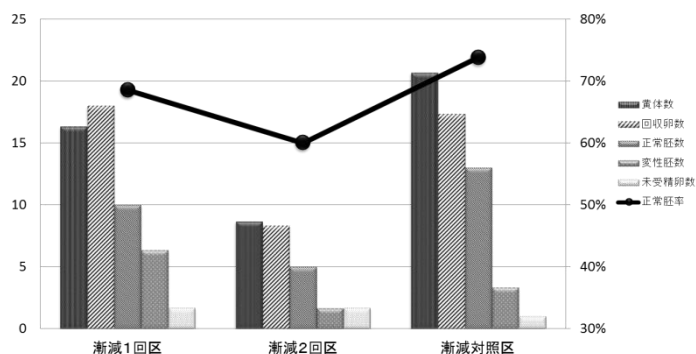


図5 採胚成績(試験1)

漸減2回区が4.0個・80.0%、漸減対照区が9.3個・71.8%であった。

試験2ではOS対照区に比べ、OS1回区、OS2回区ともに黄体数、採胚総数および変性胚数が少なく、正常胚数が多くなった。Aランク以上胚数および胚率はOS1回区が4.3個・59.1%、OS2回区が6.7個・76.9%、OS対照区が4.0個・75.0%であった。

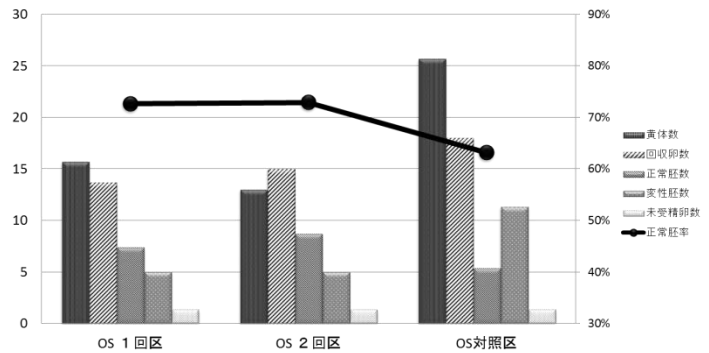


図6 採胚成績(試験2)

考 察

SOV処理におけるFSHとeCGの併用について、FSHの漸減投与プログラムの最後の2回をeCGに置き換える方法(eCG置換法)はこれまでにいくつかの報告があるが、なかでもMattosらはSindhi種においてFSHの漸減投与プログラム(4日間・FSH総量100mg)の最後の2回をeCGに置き換える(FSH総量90mg+eCG300単位)ことで、AI前日の6mm以上卵胞数および移植可能胚数が有意に増加すると報告している⁴⁾。この方法ではSOV処理の3日目までに全体の90%量のFSHを投与しているため、4日目にFSHを投与しないことによる影響が少なく、さらに4日目には卵胞がある程度成熟し、黄体形成ホルモン(LH)に対するレセプターの遺伝子が発現していると考えられる⁵⁾ことから、eCG投与への変更によりeCGのLH様作用が成熟した卵胞のLHレセプターを刺激し、加えてeCGの半減期が長いことからこの効果が持続し、その結果SOV反応が強化されて卵胞数と移植可能胚数の増加につながったとしている。一方、我々は前報でOS法により黒毛和種のSOV処理が可能であることを明らかにした。この時、OS法における卵胞発育状況、採胚成績などを漸減投与法と比較したところほぼ同等であったことから、黒毛和種におけるOS法の採卵成績向上のため、OS法にeCG置換法を組み合わせたプログラムで採胚を実施した。本試験ではまず、試験1としてeCG置換法を黒毛和種で実施した場合の効果を確認するため、3日間の漸減投与法にeCG投与を併用したプログラムを、試験2としてOS法にeCG投与を追加したプログラムを設定した。この時、eCGの投与は、既報⁴⁾の通り最終日となるday6の午前と午後に分けて投与する方法に加え、OS法の「SOV処理の簡易化」の利点をなるべく損なわないようにday6午前(PRID抜去と同時)に一度に投与する方法を設定し、それぞれの採胚成績および卵巣所見を比較・検討した。

卵巣所見について、卵胞の大きさについては前報と同様に“大”(5mm以上)、“小”(5mm未満)に区別⁷⁾した。また、今回はAIから採胚日までの推移も確認するため、day10~day14の黄体数および卵胞数の観察を行った。

試験1では、卵胞数のday8までの推移は各試験区ともほぼ同様となったが、漸減2回区のday9以降の大卵胞数が他の区と比べて多く推移した。また、採胚成績は漸減2回区が他の2試験区よりも黄体数・採胚総数・正常胚数のすべてが少なかった。これは、B179号牛が漸減2回区の処理の時にAI前後に排卵せず、大卵胞数の増加がday10まで続いたこと、およびこの時の採胚成績が悪かった(黄体2個、採胚総数および正常胚数0個)ことが平均値に大きな影響を与えたためであった。この原因としては、Mattosらのプロトコールでは臍内留置型黄体ホルモン製剤の抜去がeCGおよびFSHの最

終投与と同時に進行していることから、彼らの方法と比べて漸減2回区のeCG投与が相対的に遅くなってしまい、その結果eCGの長いFSH様作用およびLH様作用により卵胞発育が継続してしまい、想定よりも遅れて排卵した可能性が考えられた。なお、同牛に同じくeCGを投与した漸減1回区の処理、すなわちPRID抜去とeCGの投与を同時に行った場合には同様の現象が認められていない。なお、残り2頭の供試牛ではこのような傾向は見られず、また漸減1回区と漸減対照区の比較では、卵胞数の推移および採胚成績に差はなかったことから、今後さらに例数を増やして検討するとともに、eCGの投与やPRIDの抜去の最適なタイミングの検討も必要であると思われる。

試験2では、卵胞数の推移、採胚成績のいずれも各試験区ともほぼ同様の成績で、eCG投与による変化は認められなかった。ただし、黄体数のみOS対照区のAI後の増加が遅く、day15に急激に増加する結果であった。これは、B165号牛とB142号牛で排卵後の卵胞液の排出が完全に起こらず、黄体組織の充実に伴って徐々にこの腫様黄体とみられるエコー画像に移行する現象が特に多く見られた。黄体数がこのような推移を示したのは、「卵胞」から「黄体」にエコー画像の判定が変わってしまうタイミングがday14～day15に集中したことが原因と思われた。

以上のことから、本県実施データのみからは、今回のSOV処理プログラムにおけるeCG併用法の有効性は認められなかった。

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xx号 x-x (2015)
- 2) 及川 俊徳ら：黒毛和種過剰排卵処理の簡易化に向けた共同試験の取り組み；日本胚移植雑誌 第35巻 55-59 (2013)
- 3) 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)
- 4) M.C.C.Mattos ら：Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors；Anim. Replod. Sci. 125 119-123 (2011)
- 5) M.F.G.Nogueira ら：Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro；Mol. Replod. Dev. 74 680-686 (2007)