

1. 過剰排卵におけるヒアルロン酸添加 FSH 製剤投与法の検討

研究開発第二課 青森大輝・中山真

要 約

これまで当県が参加する共同研究グループでは、黒毛和種の過剰排卵処置における溶媒量減少・採胚成績の向上を目的として、ブタ由来卵胞刺激ホルモン（pFSH）製剤の溶媒にヒアルロン酸を添加して投与する方法を検証してきた。本試験ではヒアルロン酸無添加皮下1回投与を対照区として、試験区には溶媒にヒアルロン酸を添加した pFSH 製剤を皮下と筋肉内にそれぞれ1回投与した区（以下、筋肉内投与区と皮下投与区という）を設定し、投与経路の違いによる効果について比較・検討した。採胚成績は、採胚総数や正常胚数等すべての項目で筋肉内投与区が最大となったが、正常胚率は対照区で高い結果となった。胚のランクは、筋肉内投与区で A ランクおよび A' ランク胚の合計数が最大となったが、採胚総数に占める A ランクおよび A' ランク胚の割合は最低となった。一方、血中 FSH 動態は、pFSH 製剤投与直後から 24 時間以内において筋肉内投与区の濃度平均値が対照区及び皮下投与区よりも高い状態が維持されていた。本試験の結果から、筋肉内投与において良好な血中 FSH 動態を作り、卵胞の増加・成長の促進が見られたが、正常胚率や A ランクおよび A' ランク胚の割合が低い事など、胚品質において改善すべき課題もみつかった。本試験は他 5 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ための報告である。

緒 言

ウシの過剰排卵処置法では、ブタ由来卵胞刺激ホルモン（pFSH）製剤を複数回にわけて投与する漸減投与法が一般的となっている。しかし漸減投与法はその製剤投与回数の多さから、ウシへのストレスおよび術者の作業負担がかかるため、これらの軽減が課題となっている。

当県が参加する共同研究グループは、ウシ過剰排卵処置法の簡易化を目的として、生理食塩水 50 ml を溶媒とした pFSH 製剤の皮下 1 回投与により、これまでの漸減投与法と同等の採胚成績が得られることを明らかにした^{1) 2) 3)}。

また令和元年度からは、pFSH 製剤の溶媒としてヒアルロン酸に着目している。Biancucci らは 5% ヒアルロン酸溶液を溶媒に用いることで、その徐放効果（持続・制御放出、血漿中濃度の維持）により、過剰排卵処置におけるゴナドトロピン投与量および投与頻度が少なくすむこと、回収卵数や移植・凍結可能胚数が増加することを報告している⁴⁾。そこで令和元年度試験で、pFSH 製剤の溶媒にヒアルロン酸を添加（4 mg/ml）した場合での皮下 1 回投与を検討したところ、溶媒量を 50 ml から 10 ml に減量してもこれまでの pFSH 製剤 1 回投与法と同等の採胚成績が得られることが明らかとなった⁵⁾。

溶媒量の減少だけでなく採胚成績の向上を目指し、ヒアルロン酸添加 pFSH 製剤の投与方法についても検討を行ってきた（R2 年度：皮下 1 回投与、R3 年度：筋肉内 1 回投与）。いずれの投与方法においても、ヒアルロン酸の徐放効果は見られたが採胚成績に影響は及ぼさなかった。ヒアルロン酸添加により血中 FSH 濃度は長い時間高い値を維持するものの、投与直後の濃度が低くなるという課題が明らかになったため、令和 4 年度は、より良好な血中 FSH 動態にするため、ヒアルロン酸添加 pFSH 製剤の皮下投与

とヒアルロン酸無添加pFSH製剤の筋肉内投与を併用し、良好な血中FSH動態を確認した。

令和5年度は、本共同試験の総括として、今まで同時に比較検討していなかったヒアルロン酸添加pFSH製剤の皮下1回投与と筋肉内1回投与を行い、その効果の検証を行うこととした。なお、本試験は5県（宮城県、神奈川県、茨城県、奈良県、宮崎県）の共同研究として行っており、本報告は当県のデータのための報告である。

材料及び方法

1. 方法

採胚は表 1 に示したプログラムで行った。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 Day0 として、Day7 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 pFSH（アントリン R10：共立製薬株式会社）20AU をそれぞれの方法で頸部に投与した。12 日目午前に PGF2 α を 3ml 投与し、13 日目午後に GnRH 2.5ml を投与した。14 日目午後に定時人工授精（AI）、21 日目午前に採胚を行った。Day10 の pFSH の溶媒、投与方法は以下の通り試験区ごとに条件を変えて行った。

試験区：皮下投与区	pFSH 20AU/6ml 生食+4ml ハイオネート	皮下 1 回投与
筋肉内投与区	pFSH 20AU/6ml 生食+4ml ハイオネート	筋肉内 1 回投与
対照区：	pFSH 20AU/10ml 生食	皮下 1 回投与

表 1 採胚プログラム

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

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 回ずつ供試し、計 9 回の採胚を行った。それぞれの採胚間隔は 63 日以上とした。供試牛の詳細を表 2 に示す。

表 2 供試牛

牛番号	B234	B244	B239
生年月日	H29.8.23	R1.7.25	H30.9.12
産歴	3	2	2
最終分娩日	R5.1.12	R4.12.20	R5.1.10

3. 調査項目

(a) 採胚成績

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⁶⁾。

(b) 卵巣所見

CIDR 挿入日 (Day0) と GnRH 投与日 (Day7) から AI 日 (Day14) までの毎日午前中、および採胚日において、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。

(c) 血中 FSH 動態

供試牛 3 頭のうち 2 頭 (B248 及び B251) における両区で、pFSH 投与日 (day10) から AI 日 (day14) までの 5 日間表 3 のとおり採血を行い、血清を用いて時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA) により血中 FSH 濃度を測定した。

表 3 採血スケジュール

採血日	Day10 (FSH 投与日)				Day11		Day12 (CIDR 除去)		Day13 (GnRH)		Day14 (AI 日)	
回数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
採血時間	9:00	13:00	17:00	19:00	9:00	16:00	9:00	16:00	9:00	16:00	9:00	16:00
FSH 開始後時間	0	4	8	10	24	31	48	55	72	79	96	103

結 果

(a) 採胚成績

各区における採胚成績の平均値を表 4 に示す。筋肉内投与区においてすべての項目で他の区より高い値となったが、正常胚率は対照区が最も高値であった。また得られた胚の品質を表 5 に示す。A ランクと A' ランクのそれぞれの個数と合計数 (以下、A+A' 数) は筋肉内投与区で最大となったが、その割合は最も低値であった。

(b) 卵巣所見

CIDR 挿入日から採卵日までの大卵胞、中卵胞および小卵胞の平均個数の推移を図 1 に示す。大卵胞数推移では、CIDR 除去時に筋肉内投与区で大卵胞が少なくなっており、皮下投与区及び対照区よりも卵胞成長の遅延が起きている可能性が示唆された。また採卵時には筋肉内投与区で大卵胞が最も多く、次いで皮下投与区、対照区となっている。中卵胞数推移では、筋肉内投与区で Day10 (pFSH 製剤投与時) から Day12 (CIDR 除去時) にかけて急速に増加しており、Day12 から Day14 (AI 時) にかけて緩やかに増加している。大卵胞推移の結果と合わせると、筋肉内投与区では中卵胞へ成長する卵胞数が多く、それらの卵胞が大卵胞へ成長しているため、全区間で大卵胞数が最大となるが、成長の遅延が起こることで、AI 時においても中卵胞段階の卵胞が多く、採卵時の遺残卵胞数も多いこと

が示唆される。小卵胞推移においては、特に注目すべき所見は見られなかった。

(c) 血中 FSH 動態

pFSH 投与後直後からの各区における血中 FSH 濃度の平均の推移を図 2 に示す。筋肉内投与区は投与直後から血中 FSH 濃度の上昇が早く、投与後 24 時間まで他の区より高い血中 FSH 濃度を維持した。投与後 24 時間以降は全区同じような血中 FSH 動態となった。

表 4 採胚成績（全体）

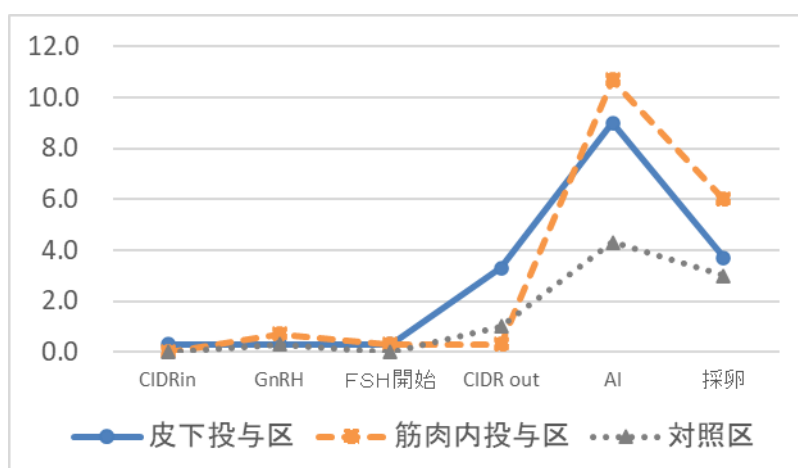
	黄体数	遺残 卵胞数	採胚総数	正常胚数	正常胚率	変性卵数	未受精 卵数
皮下投与区	15.3(9.6)	3.7(1.8)	9.7(7.7)	6.0(5.0)	43.6%(21.8)	0(0)	3.3(2.8)
筋肉内投与区	18.7(3.3)	6.0(3.5)	22.3(3.0)	12.3(3.3)	60.1%(19.3)	1.3(0.9)	8.3(5.3)
対照区	10.0(4.9)	3.0(2.1)	11.0(6.8)	8.0(4.0)	87.5%(12.5)	1.3(1.3)	1.7(1.7)

() 内は標準誤差

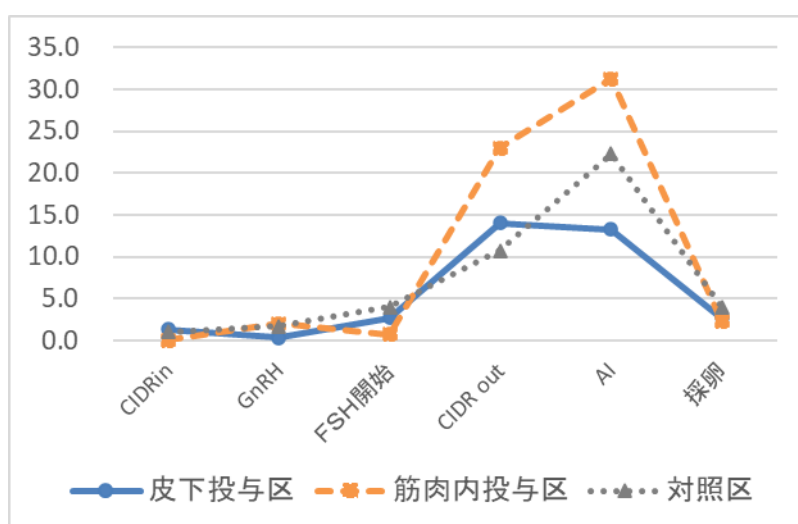
表 5 胚品質（全体）

	A	A'	B	C	A+A'	A+A'の割合
皮下投与区	2.0(1.5)	2.0(1.5)	1.3(1.3)	0.7(0.7)	4.0(3.1)	81.3%
筋肉内投与区	3.3(1.2)	5.0(1.5)	1.0(0.6)	3.0(1.5)	8.3(2.7)	64.4%
対照区	2.7(1.3)	3.7(1.8)	1.3(0.9)	0.3(0.3)	6.3(2.9)	86.9%

大卵泡数推移



中卵泡数推移



小卵泡数推移

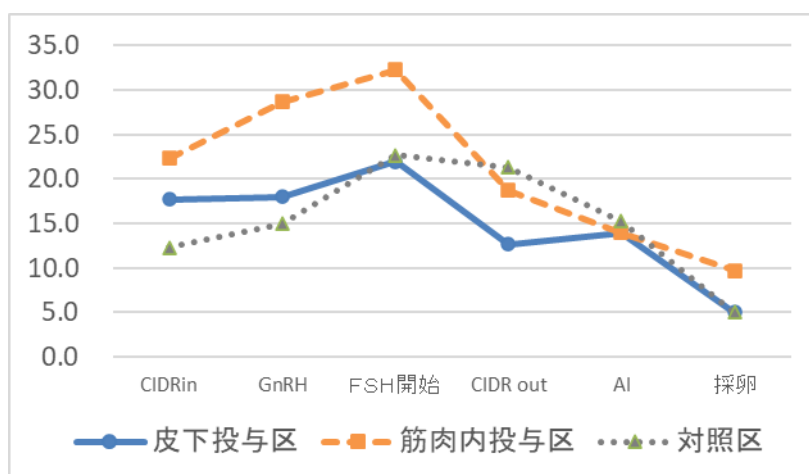


図 1 卵胞推移

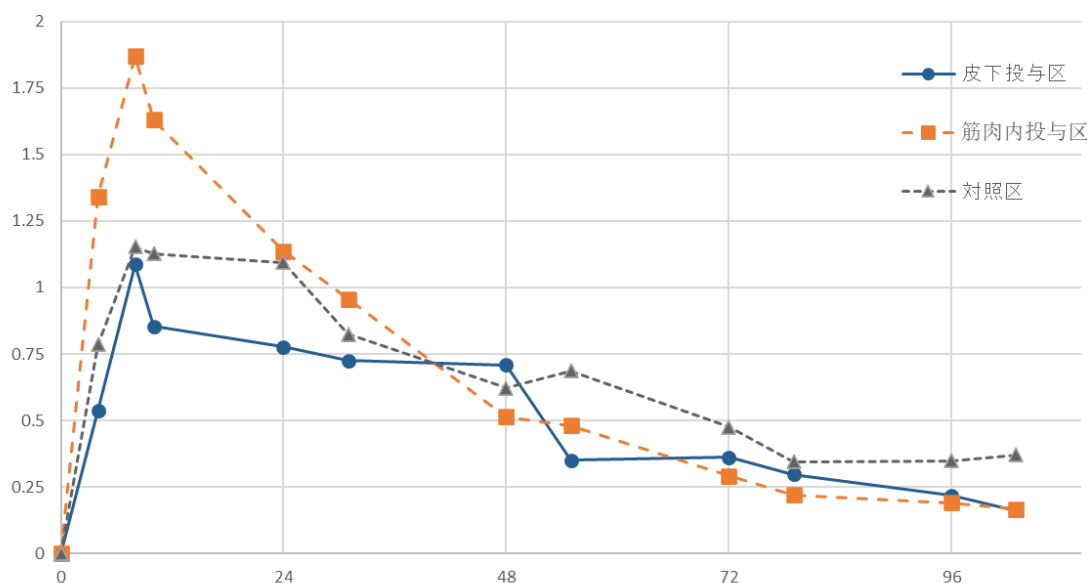


図2 血中 FSH 動態

考 察

R5 年度は、これまで比較検討できていなかったヒアルロン酸添加 FSH 製剤の皮下 1 回投与と筋肉内 1 回投与について、採胚成績や卵胞数推移、血中 FSH 動態でどのような違いが見られるか確認する事を目的として試験を行った。

血中 FSH 動態では、筋肉内投与において投与直後から他の投与方法と比較して血中濃度のピークが高く、投与から 24 時間まで高い血中濃度を維持した。卵胞数推移では、筋肉内投与区において成長する卵胞数は多いが、発育の遅延が見られた。採胚成績では、筋肉内投与で採胚総数や正常胚数が最も多いが、遺残卵胞数や未受精卵数も多く、正常胚率は最大ではなかった。また、胚品質においても A ランクおよび A' ランクの胚数は多いが、C ランクの胚数も多いため、総採胚数における A ランク及び A' ランク胚の合計数の割合は最低であった。これらのことから、ヒアルロン酸添加 FSH 製剤の筋肉内 1 回投与は、皮下 1 回投与と比較して、高い血中 FSH 濃度のピークにより Day10 (pFSH 製剤投与時) から中卵胞へ成長する卵胞数が急増しており、採胚総数が最大となったことが考えられる。一方で、増加した中卵胞数ほど大卵胞数は増加していない。これは、筋肉内投与では成長の遅延が起こることが示唆されており、Day14 (AI 時) で排卵しなかった卵胞も多く発生してしまったためであると考えられる。また、Day12 (CIDR 除去時) から Day14 (AI 時) においても中卵胞数が増加しており、これらの卵胞によって、採卵時の遺残卵胞数が多くなったと考えられる。これらのことから、ヒアルロン酸添加 FSH 製剤の投与方法でより多くの胚を採取するには、筋肉内 1 回投与が最適であるが、適正なタイミングで排卵しない卵胞や排卵せず遺残卵胞として残る卵胞の数も多いという課題があることも示唆された。また、採胚総数が多いため、正常胚数も多いが同時に未受精卵や変性卵といった繁殖に適さない

もの、正常卵ではあるが C ランクの質の悪い胚も多く発生していることなどの課題も本試験の結果から示唆された。

遺残卵胞の減少に関しては、排卵誘起に関わる GnRH 製剤の種類の検討すること、採胚プログラムによって GnRH 投与タイミングが異なるため、適切な投与タイミングの検討を行うこと等があげられる。また、正常卵や A 及び A' ランク胚の増加に関しては、過剰排卵処置前の飼料給与量の変更により、正常受精胚数が増加し未受精卵数が減少することが報告されているため¹⁰⁾、飼料給与に着目した追加試験を行うこと等があげられる。

本試験の結果を踏まえ、今後は上記のような追加試験を行う必要があるといえる。

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) 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)
- 5) 中島岳人ら：ヒアルロン酸添加 FSH 製剤 1 回投与法の検討 奈良県畜産技術センター研究報告 第44号 1-(2021)
- 6) 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)
- 7) Prisell, P. et al. : Evaluation of hyaluronan as a vehicle for peptide growth factors. International Journal of Pharmaceutics. 85, 51-56(1992).
- 8) Esposito, E. et al. : Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study. International Journal of Pharmaceutics. 288, 35-49(2005).
- 9) 大澤健司：牛の排卵同期化・定時人工授精 プログラムの現状と最近の進歩 日獣会誌 65 673-681 (2012)
- 10) 林武司ら：黒毛和種繁殖雌牛における栄養水準の増減が過剰排卵処置時の卵胞数および採胚成績に及ぼす影響 福岡県農林業総合試験場研究報告 10 (2024)