

生理食塩水に溶解したヒト閉経期性腺刺激ホルモンによる ウシ過剰排卵処理の簡易化(第2報)

中原 仁・小田頼政*・小田 亘**

Effects of superovulation in Japanese Black Cattle with one-shot method of human Menopausal Gonadotrophin dissolved in physiological salt solution(2nd)

Hitoshi NAKAHARA, Yorimasa ODA and Wataru ODA

要 約

ウシの過剰排卵処理の簡易化を目的に、ヒト閉経期性腺刺激ホルモンの1回投与による簡易過剰排卵処理方法について検討した。

- 1 胚の回収成績は、1回投与区で平均推定黄体数 15.6 個、回収総数 16.9 個、正常胚数 13.7 個であり、2回投与区ではそれぞれ 16.0 個、17.3 個、14.7 個と有意な差はなく、1回投与方法でも良好な胚回収成績が得られた。
- 2 正常胚率は、1回投与区で 81.1%であり、2回投与区で 84.8%と両者間に有意な差は認められなかった。
- 3 胚の品質は、1回投与区ではAランク 65.0%、Bランク 9.3%、Cランク 6.8%であり、2回投与区ではそれぞれ 64.7%、13.2%、6.9%と胚の品質においても両者間に差はなかった。

以上のことから、生理食塩水に溶解した hMG を用いたウシ過剰排卵処理の1回投与方法は、良好な胚回収成績が得られることから、処理の簡易化に有効な手技と考えられた。

キーワード：黒毛和種、過剰排卵処理、hMG、簡易化

緒 言

ウシの胚移植技術は普及が進み、本県では年間延べ 350 頭以上の供胚牛から胚回収が実施され、2,000 卵以上が移植されている。

胚移植に必要な良質な胚を確保するためには過剰排卵処理は必要不可欠である。これまでの研究からウシへの過剰排卵処理は、ブタ由来卵胞刺激ホルモン(以下「FSH」という)を用いた漸減投与方法が広く実施されている。しかし、この方法では1日2回、複数回のホルモン投与を行わなければならない、獣医師への労力の煩雑性や注射等による牛へのストレスの負荷などが問題点として残っており、過剰排卵処理の簡易化が望まれている。

近年、過剰排卵処理の簡易化方法としてポリビニルピロリドン(以下「PVP」という)や水酸化アルミニウムゲルを溶媒とした FSH の1回投与による簡易化が開発され、FSH の漸減投与方法と同等の胚回収成績が得られている^{1)~6)}が、

市販されるまでには至っていない。

一方、人領域の排卵誘発、不妊症の治療薬として広く用いられている⁷⁾ヒト閉経期性腺刺激ホルモン(以下「hMG」という)は、Lauria ら⁸⁾がウシの過剰排卵処理に使用し初めてその有効性を報告した。その後、江藤ら⁹⁾、勝見ら¹⁰⁾、菅野ら¹¹⁾は、hMG を用いた漸減投与方法による過剰排卵処理を実施し、FSH を用いた方法に比べ胚回収成績が向上したと報告している。また、菅野と篠木¹²⁾は hMG を PVP 溶液に溶解し投与することで過剰排卵処理の簡易化が図られることを報告しており、hMG の FSH 作用の有効性は明らかとなっているが、吸水性の早い生理食塩水に溶解した場合の効果は不明である。

我々は、先の報告¹³⁾で生理食塩水を溶媒として hMG300IU の2回投与により従来の FSH を用いた漸減投与方法と同等以上の胚回収成績が得られることを報告し、市販薬を用いた処理の簡易化を可能とした。

そこで、今回はさらに処理の簡易化を図る目的で hMG を用いた1回投与方法の可能性について

検討したので報告する。

材料及び方法

1 供胚牛

同一飼養条件で管理されている当センター繋養の黒毛和種経産牛(産歴1~13産)21頭を用いて、1頭につき各区の処理を1回ずつ反復処理し、各区ごとの処理は60日以上の間隔をあけて実施した。

2 実施期間

平成19年1月~平成20年12月

3 試験区分および方法

(1) 基準発情の同期化過剰排卵処理

供胚牛に対して臍内貯留型プロゲステロン製

剤(イージーブリード：家畜改良事業団)を性周期に関係なく挿入し、14日後に除去することにより基準発情を誘起した。直腸検査により発情と確認した個体は2%ポピドンヨード剤(ネオヨジン液：三鷹製薬)を子宮内に50ml注入した。

(2) 過剰排卵処理

発情後10日から12日目に直腸検査により開花期黄体を確認できた供胚牛に対して各試験区ごとに過剰排卵処理(以下「SOV」という)を実施した。SOV開始日(0日)にhMG(HMG注テイズー150：あすか製薬)を試験区分に従い投与し、3日目の朝と夕方にプロスタグランジンF_{2α}(プロナルゴンF：ファイザー製薬)をそれぞれ20mg、10mgの総量30mgを臀部筋肉内に投与し発情を誘起し、5日目の夕方と6日目の朝の計2回人工授精を実施した。

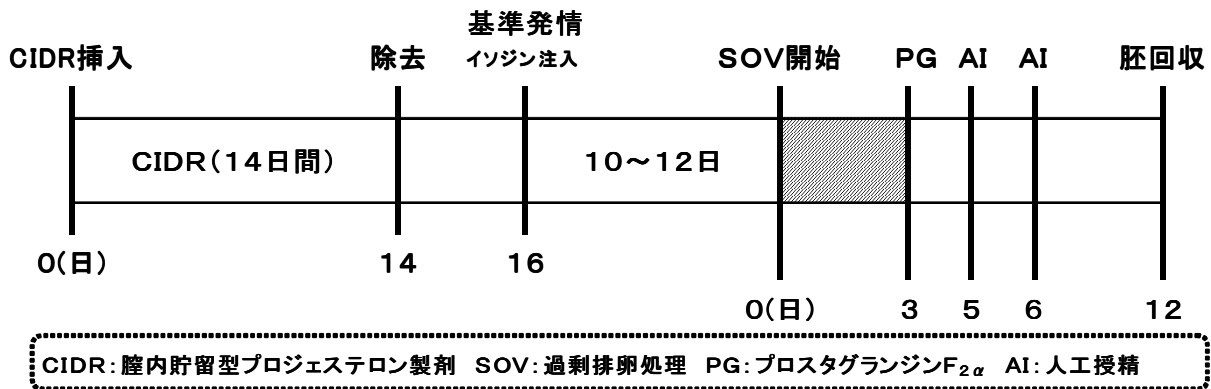


図1 黒毛和種における胚回収実施プログラム

(3) 試験区分

hMG総量300IUを規定量の生理食塩水4mlに溶解し、処理開始1日目の朝に1回のみ頸部皮下投与する1回投与区と、同量のhMGを処理開始1日目の朝と夕の2回に分けて150IU(2ml)ずつ頸部皮下投与する2回投与区を設け、図2に示したとおり処理を行った。

胚回収は、処理開始後12日目にバルーンカテーターを用いて非外科的に行った。胚回収後にプロスタグランジンF_{2α}類縁体(エストラメイト：ナガセ医薬)を2ml筋肉内投与すると共に2%ポピドンヨード剤を子宮内に50ml注入し、反復試験を実施するための発情発現を促した。回収胚は、Lindnerら¹⁰⁾に従って品質を評価した。また、黄体数は直腸検査により推定した。

(4) 胚回収



図2 hMG製剤を用いた過剰排卵処理プログラム

4 統計解析

データの統計処理は、t-検定により行った。

結果及び考察

表1に胚回収成績を示した。2回投与区の平均推定黄体数は16.0個、平均回収総数17.3個および平均正常胚数14.7個であったのに対して1回投与区ではそれぞれ15.6個、16.9個、13.7個とすべての結果において有意な差は認められず、2回投与区と同等の胚回収成績が得られた。また、回収総数に対する正常胚数の割合を示した正常胚率を比較してみても2回投与区が84.8% (308/363) に対し1回投与区で81.1% (287/354) と有意な差は認められなかった。

表1 過剰排卵処理方別の胚回収成績

処理区	1回投与区	2回投与区
処理頭数	21	21
推定黄体数	15.6 ± 9.1	16.0 ± 10.8
残存卵胞数	0.2 ± 0.7	0.2 ± 0.7
回収総数	16.9 ± 10.0	17.3 ± 12.4
正常胚数	13.7 ± 8.7	14.7 ± 11.5
正常胚率 (%) ¹⁾	81.1%	84.8%

値は平均値 ± 標準偏差

¹⁾ 正常胚率 = 正常胚数 / 回収総数 × 100

次に回収胚の品質を表2に示した。正常胚のA、B、Cランク別に割合では、2回投与区で64.7%、13.2%、6.9%であったのに対して1回投与区ではそれぞれ65.0%、9.3%、6.8%であり、品質においても両区に差が認められなかった。

表2 投与方法別回収胚の品質

区分	回収総数	回収総数に対する割合 (%)			変性卵
		Aランク	Bランク	Cランク	
1回投与区	354	65.0	9.3	6.8	18.9
2回投与区	363	64.7	13.2	6.9	15.2

ウシの過剰排卵処理ではFSHの半減期が短いため、頻回投与する必要がある¹⁵⁾とされており、特に吸収性の早い生理食塩水に溶解した場合、1日2回、3～4日間減量しながら投与する方法が一般的に利用されている。これまでの我々

の成績でも比較的良好な胚回収成績が得られている¹³⁾。前回の試験でhMGの2回投与法とFSHの漸減投与法で胚回収成績並びに胚の品質に差がないことを報告¹³⁾していることからhMGの1回投与法においても一般的に利用されているFSHの漸減投与法と差がないものと考えられる。このことからhMGはウシ過剰排卵処理方法の簡易化を図る上で市販化されている有効なホルモン剤であると考えられた。

これまで、ウシの過剰排卵処理を簡易化は、FSHをPVPや水酸化アルミニウムゲルに溶解し、1回のみ投与する方法が試みられ、漸減投与法と同等の胚回収成績が得られることが報告されている^{1) - 6)}。PVPや水酸化アルミニウムゲルは、物質の体内への吸収を遅延させ持続的にする効果があり、FSHをPVPや水酸化アルミニウムゲルに溶解して1回のみ投与した場合、血中レベルでのFSH動態は漸減投与法と同等であるとの報告^{6)、16)}がなされている。しかし、PVPや水酸化アルミニウムゲルは市販化に至っていない。

一方、hMGは1日2回、数日間減量投与する方法で、FSHと同等以上の胚回収成績が得られることが報告^{9) - 11)}されている。また、菅野と篠木¹²⁾はhMGをPVP溶液に溶解し1回投与することにより、hMGの漸減投与法と同等の採胚成績を得ていることから、FSHと同様の使用方法で高い卵胞刺激作用があることはわかっている。ただ、これまでホルモン動態を調査した報告はなく、作用機序は不明であり、FSHと同様に半減期の短いホルモンであると考えられていた。しかし、本試験において吸収性の早い生理食塩水に溶解し、1回のみ投与しても良好な胚回収成績が得られたことからhMGの中に含まれるFSH活性は高く、持続的に作用しているものと推測された。今後はhMGの血中のホルモンの動態を調査し、ホルモンの作用機序や体内吸収速度並びに持続時間等を明らかにすることが必要であろう。

また、本試験において投与部位を頸部皮下としたことから、一般的に投与されている筋肉内投与よりも体内への吸収速度が遅延し、持続的な吸収につながったとも考えられる。一方、hMGがFSHと同じ半減期の短いホルモンで同様の作用機序であると考えれば、ウシの過剰排卵処理において卵胞刺激作用が持続的に継続する必要がなくても良好な胚回収成績が得られるとも考えられる。このため、今度は生理食塩水に溶解したFSHを用いたウシの過剰排卵処理方法についても検討する必要があると思われた。

引用文献

- 1) 山本政生・大江正人・藤井千春・鈴木達行 (1993) : ポリビニルピロリドン溶解剤とした卵胞刺激ホルモンの1回投与による牛の過剰排卵処理. 日獣会誌, 46, 554-556.
- 2) 窪田 力・堤知子・山口 浩・加治佐修・川端健次・横山喜世志(1994) : 過剰排卵処理の簡易化の検討. 鹿児島県畜産試験場研究報告, 27, 1-3.
- 3) 永田浩章・三宅晃次・佐野文彦・齋藤美英・柴田正志(1995) : FSH 1回注射による過剰排卵処置法の検討. 静岡県畜産試験場研究報告, 21, 69-71
- 4) 須崎哲也・永田健一・溝邊敬美・中原高士・原好宏(1996) : 黒毛和種におけるPVPを溶解剤としたFSH 1回投与による過剰排卵処理の検討(第3報). 宮崎県畜産試験場試験研究報告, 9, 1-6.
- 5) 市野清博・松岡一仁・坂田昭次・伊藤 智・嶋屋佳子・榎原孝正(2000) : PVPを溶解剤としたFSH 1回投与による牛の過剰排卵処理の検討. 山口県畜産試験場報告, 16, 143-150.
- 6) Satoko Matoba, Masato Tagawa, Hideo Matsuba, Hajime Yoshioka, Koji Kimura, Hiroya Kadokawa, Miharu Yonai, Kei Imai(2007) : Super-ovulation treatment by single injection of FSH with Aluminum Hydroxide Gel in holstein cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, 19, 309.
- 7) 倉智敬一・鈴木雅州・小林拓郎(1983) : 産科と婦人科. 50, 130-137.
- 8) A. Luria, A. R. Genazzani, O. Oliva, P. Inaudi, F. Cremonesi, C. Monittola and G. Aureli (1982) : Clinical and endocrinological investigations on Superovulation induced in heifers by human menopausal gonadotrophin. *Repro. Fertil.*, 66, 219-225.
- 9) 江藤哲雄・石田和昭・早川俊司・牛島 仁 (1987) : 過剰排卵処理におけるFSH、HMG投与による採卵成績について. 繁殖技術研誌, 9, 121-123.
- 10) 勝見 晟・山口俊男・山口知恵野・山下洋治郎・氏家浩徳・小野寺政一・大地隆温(1994) : hMG (バーゴナル) による黒毛和種の過剰排卵誘起. 獣医畜産新報, 47, 185-189.
- 11) 菅野美樹夫・高野 徹・佐藤尚史・大崎次郎・渡辺 茂(1995) : 閉経期性腺刺激ホルモン(hMG)が黒毛和種供卵牛の過剰排卵処理に及ぼす影響. 福島県畜産試験場研究報告, 8, 5-9.
- 12) 菅野美樹夫・篠木 忠(1999) : Polyvinylpyrrolidone (PVP)溶液を用いたhMGの簡易過剰排卵誘起法の検討: 福島県畜産試験場研究報告, 9, 5-9.
- 13) 中原仁・小田頼政・小田亘(2009) : ヒト閉経期性腺刺激ホルモンを用いたウシ過剰排卵処理の簡易化(第1報) : 岡山県総合畜産センター研究報告, 18, 16-19.
- 14) G. M. Lindner and R. W. Wright Jr (1983) : Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20, 407-416.
- 15) M. M. Demoutier, J-Fr. Beckers, P. Van Der Zwalmen, J. Closset, J-L. Gillard, Fr. Ectors (1988) : Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*, 30, 379- 386.
- 16) T. Taketomi, M. Aoyagi, H. Konishi, K. Kishi, K. Taya, G. Watanabe, S. Sasamoto(1993) : Super-ovulation in holstein heifers by a single injection porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 39, 327.