

# ヒアルロン酸添加 FSH 製剤 1 回投与法における添加濃度の検討

研究開発第二課 中光大輔・麻植香菜子・中島岳人・武平有理子・億正樹

## 要 約

当県が参加する共同研究グループでは、黒毛和種牛の過剰排卵処置において、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た（4 mg/ml）皮下 1 回投与法を用いることで、溶媒量を減少させつつ従来の皮下 1 回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。本試験では、ヒアルロン酸添加濃度が異なる 3 つの試験区（1 区：4 mg/ml、2 区：2 mg/ml、3 区：0 mg/ml）を設定し、ヒアルロン酸添加濃度を低下させても従来の方法と同等の採胚成績が得られるかを検証した。採胚成績の結果としては、供試牛ごとの個体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。しかしながら血中 pFSH 濃度動態の結果から、ヒアルロン酸添加濃度が高い区ほど pFSH 濃度が高く維持される結果となり、より添加濃度が高い方がヒアルロン酸の効果が期待できることが示唆された。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みでの報告である。

## 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た研究開発の中で、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<sup>1) 2) 3)</sup>。

また Biancucci らは 5% ヒアルロン酸溶液を溶媒に用いることで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、受精卵数や移植・凍結可能胚数が増加することを報告している<sup>4)</sup>。ヒトの医療現場では、皮下注射でヒアルロン酸を溶媒に用いることで、持続・制御放出、血漿中濃度の維持といった徐放効果が期待できることが報告されており<sup>5) 6)</sup>、これによってゴナドトロピン投与量および投与頻度を少なくすることができると考えられる。そこで共同研究グループにおいても、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分かった<sup>7)</sup>。

本試験では、pFSH 製剤の溶媒に添加するヒアルロン酸濃度を低下させても同等の採胚成績が得られるかどうかを検証することを目的とした。なお、本試験は 5 県（宮城県、神奈川県、茨城県、長野県、宮崎県）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

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/ 6ml 生食＋ハイオネート 4ml （ヒアルロン酸濃度 4 mg/ml）

2区：20AU/ 8ml 生食+ハイオネート 2ml （ヒアルロン酸濃度 2 mg/ml）

3区：20AU/ 10ml 生食（対照区）

ハイオネート（ベ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（10 mg/1 ml）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 $\alpha$ （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日目午後には GnRH（イトレリン：あすか製薬株式会社）1.25ml を投与した。10日目午前には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 を頸部皮下に1回投与した。12日目午前には PGF2 $\alpha$  を3ml 投与し、13日目午後には GnRH2.5ml を投与した。14日目午後には定時 AI、21日目午前には採胚した（表1）。

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（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2）。

表2 供試牛

牛番号	B206	B174	B214
生年月日	H25.2.27	H20.3.22	H26.2.12
産歴	3	5	3
最終分娩日	R1.10.24	R1.11.14	R1.12.12
過去の平均正常胚数	10.1	2.6	5.0
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

(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<sup>8)</sup>。

(b) 卵巣所見

CIDR 挿入日 (0 日目) と GnRH 投与日 (7 日目) から AI 日 (14 日目) までの毎日、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) pFSH 動態

供試牛 3 頭のうち 2 頭 (B206 及び B174) における全ての試験区で、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 pFSH 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抜去)		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	36	43	48	55	72	79

## 結 果

(a) 採胚成績

供試牛 3 頭の各区における採胚成績を表 4 および表 5 に示す。B206 は、正常胚数が 1 区で最大 (67 個) となり、次に 3 区 (28 個)、2 区 (17 個) の順で多かった。また卵質において、A+A'ランクの割合は 2 区 (100.0%)、1 区 (97.10%)、3 区 (71.79%) の順で高かった。B174 は、正常胚数が 1 区の 3 個が最大であった。また 3 区では採胚総数が 0 という結果になり、他 2 頭と比較しても採胚成績は振るわなかった。卵質については、採胚が可能であった 1 区と 2 区で A+A'ランク割合が 100%であった。B214 は、正常胚数が 3 区で最大 (27 個) となり、次に 2 区 (11 個)、1 区 (1 個) の順で多かった。卵質については、A+A'ランク割合が 3 区 (81.82%)、2 区 (61.11%)、1 区 (8.33%) の順で高かった。

(b) 卵巣所見

供試牛 3 頭各区における、CIDR 挿入日から採卵日までの卵胞推移を図 1 に示す (小卵胞推移については省略している)。B206 では、AI 時点で大卵胞数が 1 区と 3 区で多くなっており、採胚総数の結果を反映したものとなっていた。B174 では、2 区の大卵胞数が AI 時点で最大となっていた。また 1 区の大卵胞数ピークは CIDRout 時であり、AI 時点で大卵胞数が少なくなっていた。B214 では各区それぞれの大卵胞数は類似した値を示した。

(c) pFSH 動態

B206 と B174 における pFSH 濃度の推移を図 2 に示す。B206 の pFSH 濃度は、全区で 0.6 ng/ml 以上の値は示さず低い値を推移した。その中でも 1 区で常に pFSH 濃度が最大となり、AI 時点まで FSH 濃度を維持していた。また 2 区についても、1 区と比較して濃度は少し小さいが pFSH 濃度が維持されていた。B174 は、pFSH 投与後約 24 時間で 1 区において高い濃度を示し、その後 AI 時点まで高濃度が維持されていた。2 区および 3 区については、1 区と比較して pFSH 濃度は小さく、AI 時点では約 0 ng/ml に近い値まで濃度が減少していた。

表4 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
B206	1区→	1区	48	12	69	67	1	1	97.10%
	2区→	2区	28	4	17	17	0	0	100.0%
	3区	3区	36	3	39	28	3	8	71.79%
B174	2区→	1区	4	1	3	3	0	0	100.0%
	3区→	2区	2	2	2	2	0	0	100.0%
	1区	3区	5	1	0	0	0	0	—
B214	3区→	1区	18	3	12	1	3	8	8.33%
	1区→	2区	32	4	18	11	2	5	61.11%
	2区	3区	40	1	33	27	5	1	81.82%

表5 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
B206	1区→	1区	8	53	61	2	4	91.04%
	2区→	2区	4	10	14	2	1	82.35%
	3区	3区	0	18	18	9	1	64.29%
B174	2区→	1区	0	3	3	0	0	100.0%
	3区→	2区	2	0	2	0	0	100.0%
	1区	3区	0	0	0	0	0	—
B214	3区→	1区	0	0	0	0	1	0%
	1区→	2区	0	8	8	1	2	72.73%
	2区	3区	5	19	24	2	1	88.89%

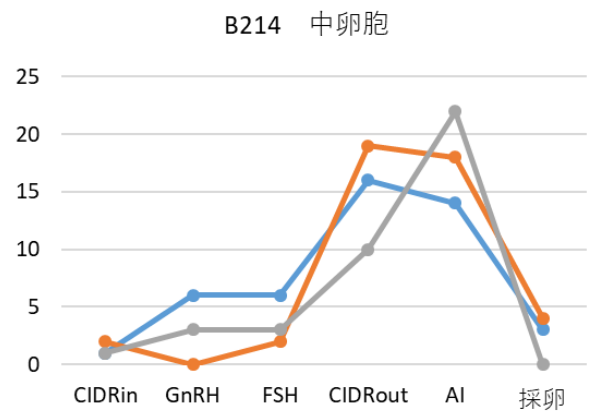
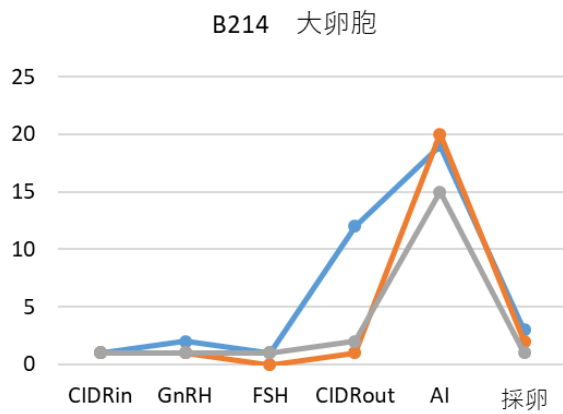
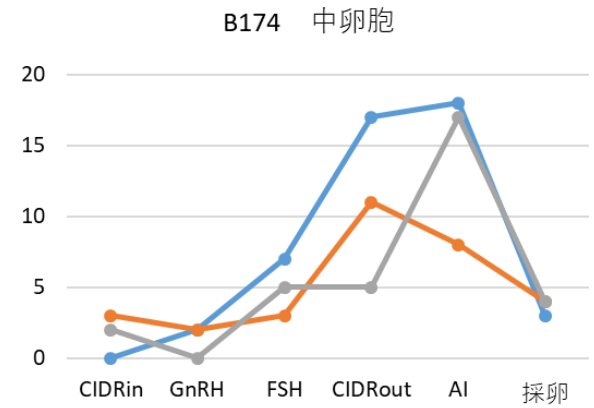
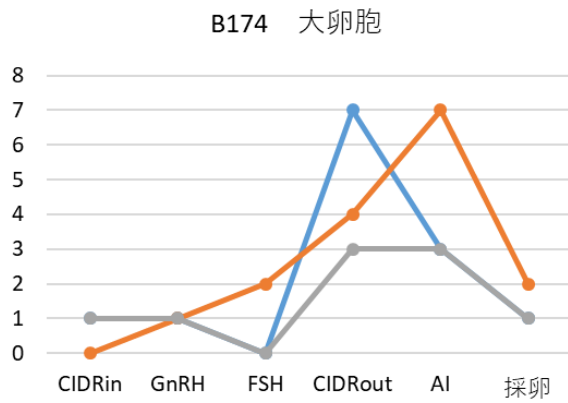
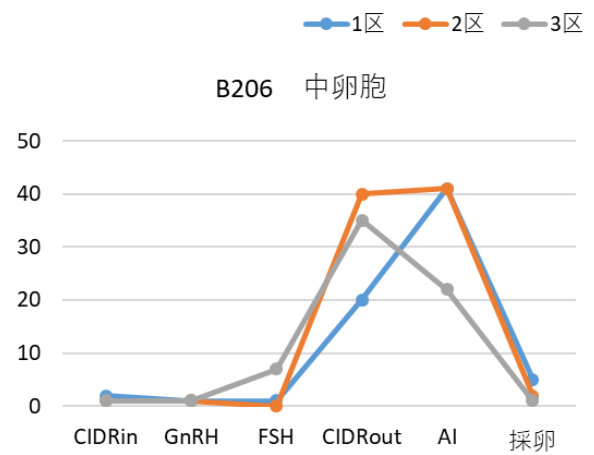
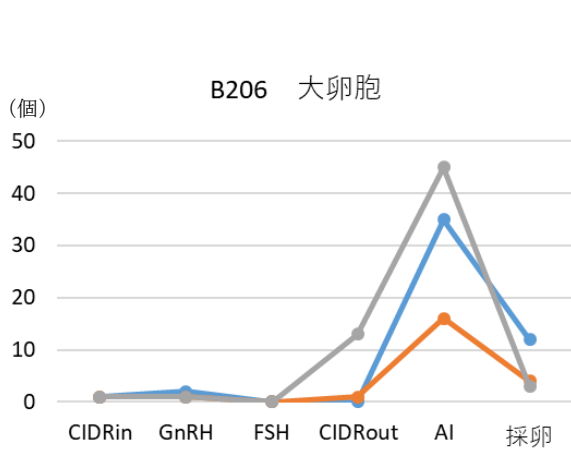


図1 個体ごとの卵胞推移

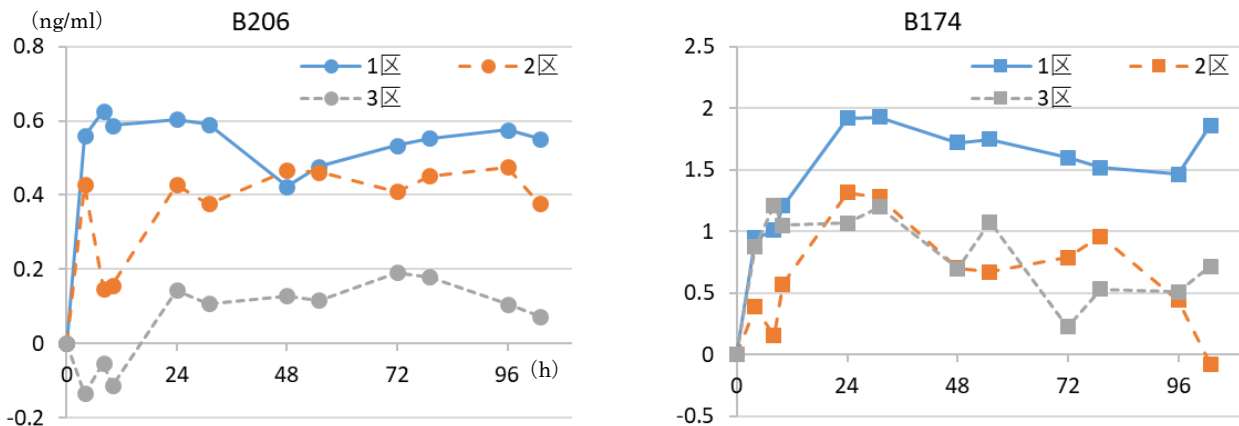


図2 pFSH 動態

## 考 察

本試験では pFSH 製剤の溶媒に添加するヒアルロン酸濃度を变化させた場合（1区：4 mg/ml、2区：2 mg/ml）に、従来の pFSH 皮下1回投与（3区）と同等の採胚成績が得られるかどうかを検証した。しかしながら採胚成績については個体差が大きく、ヒアルロン酸を添加した1区および2区での明らかな効果は見られなかった。B174ではヒアルロン酸添加濃度が高い区ほど正常胚数が多かったが、B206ではヒアルロン酸添加濃度が最も高い1区での正常胚数が最大値を示したもののヒアルロン酸を添加していない3区でヒアルロン酸を添加している2区よりも正常胚数が多かった（表4）。またB214ではヒアルロン酸添加濃度が低い区ほど正常胚数が多くなり、B174とは異なる結果となった（表4）。

一方pFSH濃度については、ヒアルロン酸を添加した1区および2区で投与時からAI時点までのFSH濃度が高く維持されていた。本試験でpFSH濃度測定に供したのは2頭（B206、B174）のみであったが、両頭でヒアルロン酸添加濃度が高い1区においてpFSH濃度が最も高く維持されていた（図2）。さらにB206ではpFSH濃度が1区、2区、3区の順で高く、ヒアルロン酸添加濃度が高い区ほどpFSH濃度が高く維持されていた。このことからヒアルロン酸添加濃度に比例してpFSHの徐放効果が大きくなっていることが示唆された。

しかしながら本試験の結果からは、ヒアルロン酸添加によるpFSH濃度維持が採胚成績に直接的な影響を及ぼすかどうかは個体差が大きいように見受けられた。B174はpFSH濃度が高く維持されていた1区で正常胚数が最大となり、pFSH濃度が類似した2区および3区では正常胚数も同程度であった。一方B206はpFSH濃度がともに高かった1区および2区における正常胚数に大きな差があり、さらに2区についてはpFSH濃度が最も低かった3区よりも正常胚数が少なかった。このようにpFSH濃度維持と採胚成績の関係については個体差が大きい結果となったが、これは個体ごとのFSH感受性が関与しているかもしれない。FSH感受性が高い個体は、特にpFSH濃度が高い状態でなくともpFSHに反応し、pFSH濃度の維持に大きく影響されることなく卵胞発育が行われる可能性がある。本試験でのB206はFSH感受性が高い個体であった可能性があり、それによってpFSH濃度と採胚成績が一致しなかったのかもしれない。またB174はFSH感受性の低い個体であったために、pFSH濃度が高い状態でなければ卵胞が発育せず、高pFSH濃度が維持されていた1区で正常胚数が最大となった可能性がある。

本試験では pFSH 製剤の溶媒に添加するヒアルロン酸濃度を低下させた場合に、従来の pFSH 皮下 1 回投与と同等の採胚成績が得られるかどうかを検証したが、ヒアルロン酸を添加した 1 区 (4 mg/ml) および 2 区 (2 mg/ml) における採胚成績の個体差が大きかったため、濃度を低下させた場合での明確な採胚成績の変化については明らかにできなかった。しかしながら、ヒアルロン酸添加濃度に比例した pFSH 濃度の維持が見られたことから、ヒアルロン酸濃度を低下させた 2 区 (2 mg/ml) よりも 1 区 (4 mg/ml) の方が、よりヒアルロン酸の徐放効果が期待でき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と考えられ、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) **Prisell, P. et al.** : Evaluation of hyaluronan as a vehicle for peptide growth factors. International Journal of Pharmaceutics. 85, 51-56(1992).
- 6) **Esposito, E. et al.** : Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study. International Journal of Pharmaceutics. 288, 35-49(2005).
- 7) 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 1-7(2021)
- 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)