

筋肉内投与によるヒアルロン酸添加 FSH 製剤 1 回投与法の検討

研究開発第二課 中光大輔・中山真・麻植香菜子・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、筋肉内 1 回投与によってその効果を検証した。採胚成績の結果としては、供試牛ごとの個体差が大きく各試験区について有意な差は見られなかった。しかしながら、血中 pFSH 動態の結果から、ヒアルロン酸濃度が高い 1 区で特に pFSH 濃度がゆるやかに上昇し、その後維持される傾向にあ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^{1) 2) 3)}。

また 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、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⁴⁾。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⁵⁾。また、ヒアルロン酸を添加した溶媒を用いた際、血中 pFSH 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など、採胚成績に及ぼす影響については更なる検討が必要と考えられた。

そこで本試験では、FSH の投与方法を皮下 1 回投与から筋肉内 1 回投与に変更し、投与方法の変化が血中 pFSH 動態および採胚成績に及ぼす影響を調査した。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 : ゼエティスジャパン) 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 12 時に 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 を頸部筋肉内に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日目午前に採胚を行った。

プログラム10日目での pFSH 投与は、以下の通り試験区ごとに溶媒条件を変えて行った。

1区：pFSH 20AU/ 6ml 生食+ハイオネート 4ml （ヒアルロン酸濃度 4 mg/ml）

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

3区：pFSH 20AU/ 10ml 生食（対照区）

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。供試牛の詳細と各個体の試験区の順番を表2および表3に示す。

表2 供試牛

牛番号	B213	B239	W143
生年月日	H26.2.4	H30.9.12	H19.10.4
産歴	3	1	4
最終分娩日	R2.4.15	R2.12.11	H29.9.16
過去の 平均正常胚数	8.4	7.0	5.0

表3 試験区の順番

B213	1区 (R3.4.13)	2区 (R3.7.6)	3区 (R3.11.9)
B239	2区 (R3.4.13)	3区 (R3.7.6)	1区 (R3.11.9)
W143	3区 (R3.6.8)	1区 (R3.10.12)	2区 (R3.12.21)

※（）内は実際の採卵日

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 (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 (B213 及び B239) 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 4 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 4 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)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
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を表 5・6 に示す。黄体数は 2 区で最も高い平均値を示したが、各区间で有意差は見られなかった。遺残卵胞数および採胚総数、正常胚数、正常胚率ともに 1 区で最も高い平均値を示したが有意差は見られなかった。胚ランクについては、どのランクにおいても有意差はなかったが、A ランクと A' ランクの合計数 (以下、A+A' 数) では 1 区が最も高い平均値を示した。

また供試牛 1 頭ごとの各区における採胚成績を表 7・8 に示す。B213 は、採胚総数・正常胚数・正常胚率ともに 3 区と比較して 1 区と 2 区で高かった。胚ランクにおいても、1 区と 2 区で A+A' 数が 3 区よりも多かった。B239 は、採胚総数および正常胚数で 1 区が最も多く、次いで 3 区、2 区の順で多い結果となった。また A+A' 数および A+A' 数の割合においても、1 区で最大となり、その次に 3 区、2 区の順で多かった。W143 は、いずれの区においても正常胚数が 0 であったが、黄体数は 2 区で最も多くその次に 1 区で多い結果となった。

(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大卵胞推移を図 1 に示す (小・中卵胞推移については省略している)。B213 では、AI 時点で 2 区および 3 区で多くなっており、1 区が最も少なかった。また同様に AI 時点において、B239 は 1 区および 3 区で多く、2 区が最も少なかった。W143 は、1 区において AI 時点で 54 個となり、他区と比較してかなり多かった。

(c) pFSH 動態

B213 と B239 における pFSH 濃度の推移を図 2 に示す。B213 の pFSH 濃度は、投与後 8 時間時点で 3 区が最も高く、その濃度は 1 区の 2 倍以上であった。最終採血時間に当たる投与後 103 時間時点では全区で同程度の濃度となっていた。B239 は、投与後 8 時間時点において 2 区および 3 区で同程度の高濃度を示し、1 区はそれらより約 0.5 ng/ml 程度低い値であった。一方、投与後 103 時間時点では、1 区が他 2 区よりも高い濃度を維持していた。

表 5 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
1 区	10.7 (3.7)	9.3 (6.1)	10.3 (6.8)	9.3 (6.6)	90%	0.0 (0.0)	1.0 (0.8)
2 区	12.3 (2.5)	7.0 (7.9)	9.0 (4.2)	6.0 (5.9)	67%	0.3 (0.5)	2.7 (2.4)
3 区	8.0 (4.2)	4.3 (3.3)	6.7 (4.8)	6.3 (4.6)	95%	0.0 (0.0)	0.3 (0.5)

表 6 胚質成績 (全体)

	A	A'	B	C	A+A'	A+A'の割合
1 区	1.3 (1.9)	7.0 (5.1)	0.3 (0.5)	0.7 (0.5)	8.3 (5.9)	89%
2 区	1.3 (1.9)	4.0 (4.3)	0.3 (0.5)	0.3 (0.5)	5.3 (6.2)	89%
3 区	1.7 (1.2)	3.3 (2.4)	0.7 (0.9)	0.7 (0.9)	5.0 (3.6)	79%

表 7 採胚成績 (個体ごと)

	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
B213	1 区	11	5	13	13	100.0%	0
	2 区	15	3	15	14	93.3%	0
	3 区	11	2	9	8	88.9%	0
B239	1 区	15	5	17	15	88.2%	0
	2 区	13	0	6	4	66.7%	1
	3 区	11	2	11	11	100.0%	0
W143	1 区	6	18	1	0	0.0%	0
	2 区	9	18	6	0	0.0%	0
	3 区	2	9	0	0	-	0

表 8 胚質成績 (個体ごと)

	A	A'	B	C	A+A'	A+A'の割合	
B213	1 区	0	12	0	1	12	92%
	2 区	4	10	0	0	14	100%
	3 区	3	5	0	0	8	100%
B239	1 区	4	9	1	1	13	87%
	2 区	0	2	1	1	2	50%
	3 区	2	5	2	2	7	64%
W143	1 区	0	0	0	0	0	-
	2 区	0	0	0	0	0	-
	3 区	0	0	0	0	0	-

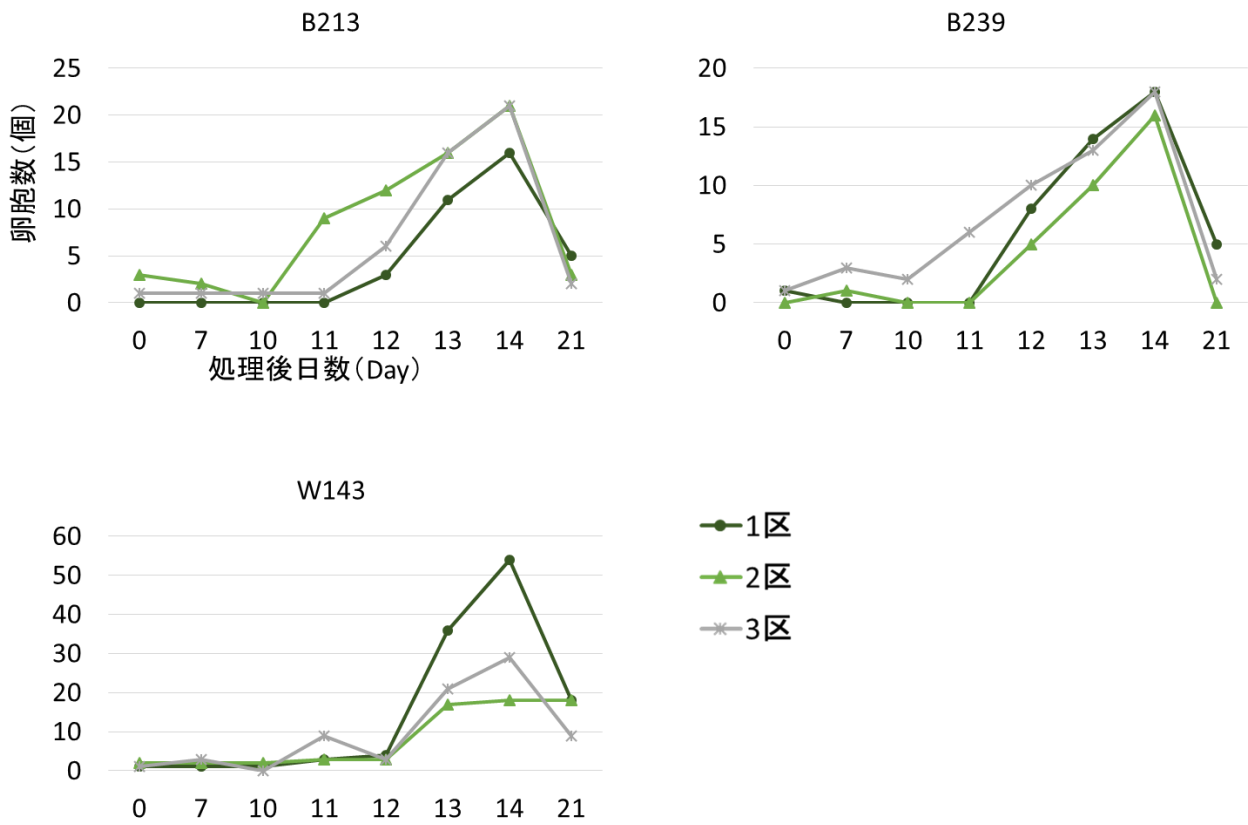


図1 大卵胞推移

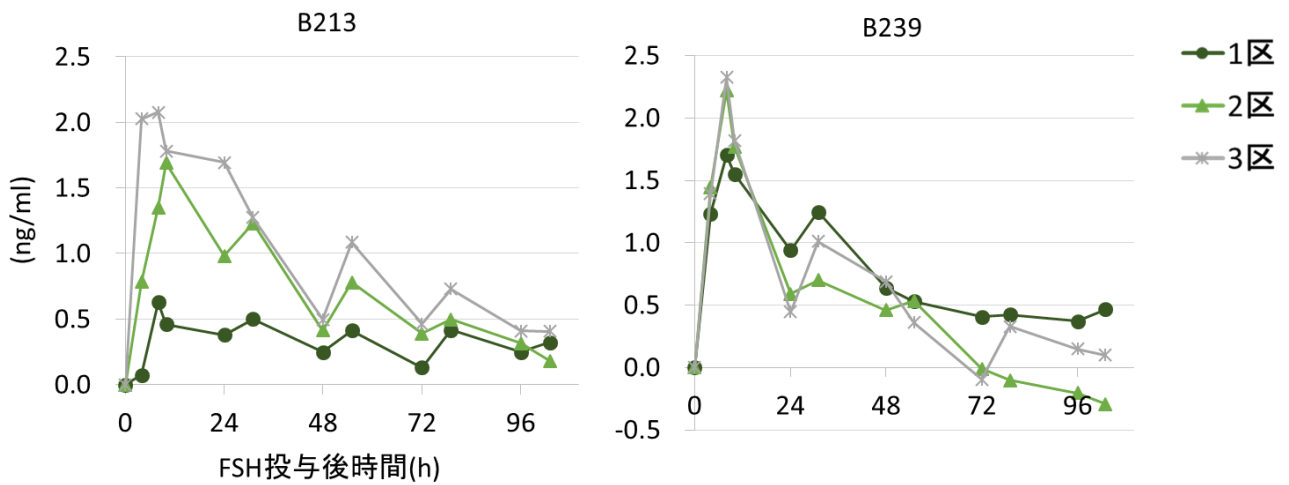


図2 pFSH 動態

考 察

本試験では、筋肉内 1 回投与におけるヒアルロン酸添加 FSH 製剤の効果を検証した。令和 2 年度試験では、皮下 1 回投与で同様の試験を行いヒアルロン酸添加 FSH 製剤の効果を検証したが、採胚成績への影響は見られなかった。本試験でも、採胚成績（採胚総数、正常胚数など）についてヒアルロン酸添加区（1 区および 2 区）と対照区である 3 区の間に有意差は見られなかった。しかしながら、個体ごとに分けて採胚成績を見た場合、ヒアルロン酸添加濃度が最も高い 1 区において、採胚成績良い個体や大卵胞数が AI 時点で多い個体などが見られた。B213 および B239 は 1 区で採卵総数・正常胚数が多く、W143 は全区で正常胚数が 0 という結果になったが AI 時点での大卵胞数が 1 区で最大となっていた。これらのことから、ヒアルロン酸添加が採胚成績に及ぼす影響は明確にあるとはいえないものの、何かしらの影響を及ぼしている可能性が考えられた。

さらに本試験では pFSH 濃度について 2 頭（B213 および B239）で調査を行ったが、ヒアルロン酸添加によって血中 pFSH の動態が変化していた。B213 では、1 区が投与直後の濃度が他 2 区よりも著しく低く、その後も低い濃度を維持していた。一方 2 区と 3 区は投与直後の濃度が高く、その後 1 区と同程度まで低下した。また B239 では、投与直後における 1 区の濃度が他 2 区よりも低かったものの、最終採血時点での濃度は 1 区が最も高く、濃度が維持されていた。このような pFSH 動態の違いは、ヒアルロン酸の徐放効果によるものと推察される。実際にヒトの医療現場では、皮下投与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いる^{7) 8)}。今回の筋肉内投与においてもヒアルロン酸を溶媒に用いることで、生理食塩水のみを溶媒に用いた場合よりもゆるやかに pFSH が吸収されたと考えられる。B213 および B239 両個体における 1 区での投与直後の濃度の低さや、B239 における最終時点までの濃度維持は、まさにヒアルロン酸の徐放効果に起因していると思われる。

一般的に過剰排卵では、多数の卵胞が閉鎖退行することなく発育を続けるためには、血中 pFSH 濃度を高い値で維持することが重要となる。そのため今回 2 頭で調査した pFSH 動態で、投与直後から最終採血時間（AI 時点）まで高い濃度を維持している場合において、卵胞発育が活発に行われると考えられる。そこで pFSH 動態と大卵胞推移を照合すると、やはり両者には相関関係があるように見受けられた。B213 は AI 時点での大卵胞数が 2 区と 3 区で多かったが、これは pFSH 投与直後の両区の高濃度に起因していると考えられる。1 区での大卵胞数が少なかったのは、pFSH 濃度が低い値を維持していたからであると思われる。また B239 は AI 時点での大卵胞数が 1 区と 3 区で多かった。1 区で pFSH 濃度が最後まで維持されていたこと、3 区で投与直後の濃度が最も高く最終的な濃度も 2 番目に高かったことから、大卵胞数がその両区で多かったことも説明できる。W143 は pFSH 動態を調査しなかったが、AI 時点における大卵胞数が 1 区で最大であったことから、この個体でも血中 pFSH 濃度が高く維持されていたのかもしれない。

以上のことから、FSH 製剤の筋肉内 1 回投与において、ヒアルロン酸を溶媒に用いることで、その徐放効果により血中 pFSH 濃度が維持され、卵胞の発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。しかしながら、採胚成績に直接影響するような結果は得られなかった。また令和 2 年度試験の皮下 1 回投与の場合と同様、ヒアルロン酸添加により pFSH 濃度が投与直後から低い値を維持してしまう（今回の B213 が顕著な例）など、pFSH 動態が期待するものにならない場合があることが明らかとなった。今後は採胚成績にも反映されるような pFSH 動態となるように、さらなる検証を続けていく必要がある。

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).