

過剰排卵におけるヒアルロン酸添加 FSH 製剤投与方法の検討

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方法を検証してきた。本試験では溶媒にヒアルロン酸を添加した pFSH 製剤を皮下 1 回投与すると同時に、ヒアルロン酸無添加の FSH 製剤を筋肉内 1 回投与する方法を検証した。採胚成績の結果としては、採胚総数や正常胚数に大きな差は見られなかった。遺残卵胞数は試験区でより多い結果となった。一方 pFSH 動態は、pFSH 投与後のほとんどの時間において試験区の濃度平均値が対照区よりも高い状態が維持されていた。本試験の投与方法により、採胚成績には影響は及ぼさないものの良好な pFSH 動態を作り出せ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方法が一般的となっている。しかし漸減投与方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方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 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、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 回投与方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 FSH 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 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という課題が明らかになり、採胚成績にまで影響を及ぼすような pFSH 動態にするためにはさらなる検証が必要と考えられた。

そこで令和 4 年度は、より良好な pFSH 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、引き続きヒアルロン酸の効果を検証する。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 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 GnRH 2.5ml を投与した。14 日目午後定時 AI、21 日目午前に採胚を行った。プログラム 10 日目の 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 : 筋肉内投与 pFSH 5AU/2.5ml 生食
 皮下投与 pFSH 15AU/ハイオネート 3ml+4.5ml 生食 (ヒアルロン酸濃度 4mg/ml)
 対照区 : 皮下投与 pFSH 20AU/10ml 生食

} 併用

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 6 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	B250	B248	B251
生年月日	R1.12.10	R1.10.24	R1.12.10
産歴	1	1	1
最終分娩日	R4.2.13	R4.3.18	R3.12.31

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⁹⁾。

(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 (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 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

両区における採胚成績の平均値を表 4 に示す。試験区において遺残卵胞数が対照区よりも多い結果となった。また黄体数については対照区で試験区よりも多かった。それ以外の採胚総数、正常胚数、正常胚率、変性卵数、未受精卵数のいずれの項目においても大きな差は見られなかった。また得られた胚の胚質成績を表 5 に示す。A'ランクが対照区で多く、A ランクと A'ランクの合計数 (以下、A+A'数) およびその割合でも対照区で多い結果となった。それ以外のランクでは差は見られなかった。

また供試牛 1 頭ごとの各区における採胚成績と胚質成績を表 6・7 に示す。B250 では、黄体数が対照区で試験区より多いのに対して、遺残卵胞数が試験区で多かった。B248 でも同様に、対照区で黄体数が多く試験区で遺残卵胞数が多かった。B251 では他 2 頭と比べて個数は少ないものの、黄体数と遺残卵胞数は同様の結果となった。胚質成績については、A+A'割合が試験区で大きい個体がある一方、その逆の結果となる個体もあるなど、特徴的な傾向等は見られなかった。

(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平均個数の推移を図 1 に示す。大卵胞数は 12 日目において試験区で増加する傾向があり、卵胞の成長が早く、より多く発育していた。さらに採卵日にあたる 21 日目においても試験区で増加しており、これは(a)採胚成績で遺残卵胞数が試験区で多かった結果と一致していた。中卵胞および小卵胞数はどの時点においても両区間で大きな差は見られなかった。

(c) pFSH 動態

FSH 投与後に採血を行った 2 頭 (B248 及び B251) の血中 pFSH 濃度の平均を図 2 に示す。両区と

もに投与後 8 時間の時点で濃度が最大となり、その後は徐々に低下していく結果となった。また投与後 96 時間を除く全ての時間帯において、試験区の濃度平均値が対照区よりも高い状態が維持されていた。

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
試験区	6(1.9)	6.7(1.5)	4.7(1.8)	4.3(1.5)	92.9%(3.0)	0(0)	0.3(0.3)
対照区	13.7(5.8)	0.7(0.3)	6.7(2)	4.7(1.4)	70.0%(16.3)	0(0)	2(1.6)

() 内は標準誤差

表 5 胚質成績 (全体)

	A	A'	B	C	A+A'	A+A'の割合
試験区	1.7(0.5)	1(0.5)	1(0.8)	0.7(0.5)	2.7(0.3)	61.5%(17.0)
対照区	1.3(0.3)	2.3(1.5)	0.7(0.3)	0.3(0.3)	3.7(1.4)	78.6%(12.3)

表 6 採胚成績 (個体ごと)

		黄体数	遺残 卵胞数 (大卵胞)	採卵 総数	正常 胚数	正常 胚率	変性 卵数	未受精 卵数
B250	試験区	6	8	3	3	100%	0	0
	対照区	11	1	8	8	100%	0	0
B248	試験区	10	9	9	8	89%	0	1
	対照区	27	1	10	4	40%	0	6
B251	試験区	2	3	2	2	100%	0	0
	対照区	3	0	2	2	100%	0	0

表 7 胚質成績 (個体ごと)

		A	A'	B	C	A+A'	A+A'の割合
B250	試験区	3	0	0	0	3	100%
	対照区	1.0	6.0	1.0	0.0	7.0	88%
B248	試験区	1.0	2.0	3.0	2.0	3.0	38%
	対照区	1	1	1	1	2	50%
B251	試験区	1	1	0	0	2	100%
	対照区	2	0	0	0	2	100%

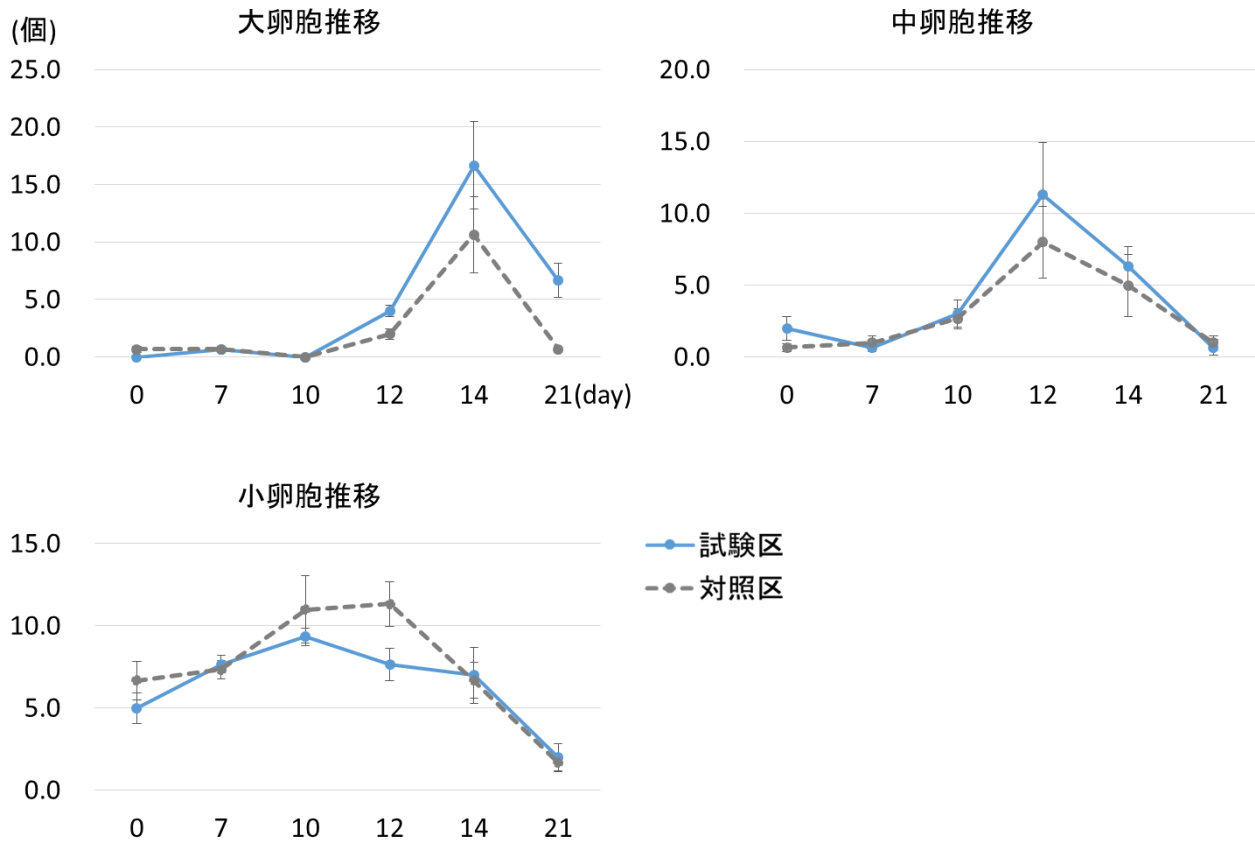


図1 卵胞推移

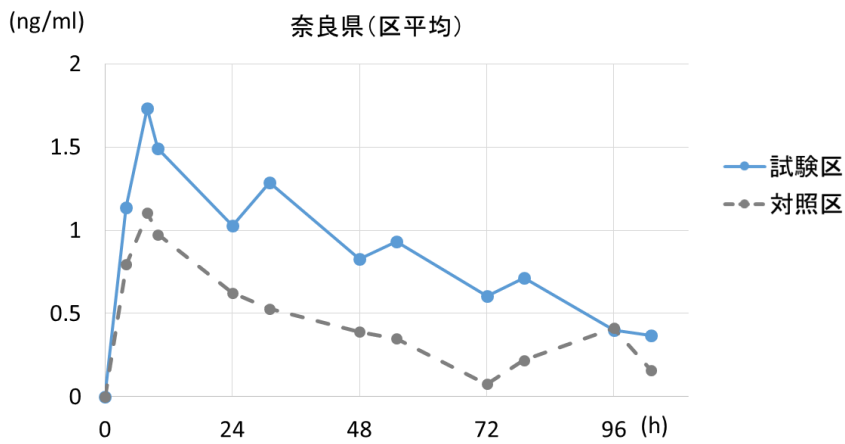


図2 pFSH 動態

考 察

R2年度およびR3年度では、それぞれ皮下1回投与と筋肉内1回投与を用いてヒアルロン酸添加pFSH製剤の効果を検証してきた。いずれもヒアルロン酸の徐放効果によるpFSH濃度の維持は確認されたが、投与直後の濃度が低くなる傾向にあり、理想的なpFSH動態は得られない結果となった。そのような課題を解決するため、本試験ではヒアルロン酸添加pFSH製剤の皮下1回投与と筋肉内投与を併用した投与方法を検討した。皮下1回投与（ヒアルロン酸添加pFSH製剤）に筋肉内1回投与（ヒアルロン酸無添加pFSH製剤）を加えることで、投与直後の濃度を一時的に引き上げ、その後は徐放効果によりある程度の濃度を維持したまま徐々に濃度が低下していくようなpFSH動態をつくりだすことが目的であった。

本試験のpFSH動態では、投与直後から103時間後にいたるまで試験区においてpFSH濃度が高い状態で維持されていた（図2）。8時間時点でも高いピークが形成されており、これまでの投与直後の濃度が低いという課題は解消されたといえる。本試験で用いた併用での投与方法で、上記のような理想的なpFSH動態をつくりだすことができた。しかし、採卵総数や正常胚数では両区間で大きな差は見られず（表4）、ヒアルロン酸添加pFSH製剤を用いることによる採胚成績の向上にはつながらなかった。

今回の両試験区間で唯一大きな平均値の差が確認されたのが大卵胞数推移と遺残卵胞数である。大卵胞数推移の結果から、試験区で卵胞がより早く、なお且つより多く発育していることが推測された（図1）。これはpFSH濃度が試験区で高濃度を維持していたことが影響していると考えられる。また21日目の大卵胞数すなわち遺残卵胞数も同様に試験区で多い結果となった（表4、図1）。これらのことから、試験区では理想的なpFSH動態によって卵胞発育が促進されたが、その卵胞のうち多くが排卵せず卵胞嚢腫として残った可能性が考えられる。個体ごとの採胚成績において黄体数が対照区の方が多くなっていることから（表6）、試験区での卵胞の多くが排卵せずそこから黄体が形成されなかったことが示唆される。卵胞嚢腫にすることなく排卵させることができれば、pFSH動態だけでなく採胚成績の向上につながると考えられる。

本試験で使用した採胚プログラム（表1）では、卵胞排卵を誘起する目的で14日目のAIの前日にGnRHを投与している。このGnRHによる排卵誘起を確実に起こせれば、卵胞嚢腫にとどめることなく採胚成績向上につなげることができると考えられる。本試験ではGnRHとして「イトレリン（あすか製薬株式会社）」（主成分：ブセレリン酢酸塩）を使用しているが、これを投与するタイミング、GnRHの成分等について改めて検討する必要があるかもしれない。採胚プログラムや定時人工授精プログラムにおける排卵誘起のためのGnRH投与タイミングは様々である。オブシンクであればPGF2 α 投与後の30～56時間後にGnRH投与、CIDRシンクであれば36～48時間後にGnRH投与するのが一般的である⁹⁾。本試験ではPGF2 α 投与後31時間と比較的早いタイミングでGnRHを投与しているが、タイミングが早かったことにより排卵が誘起されなかった可能性を考慮して、本試験より遅いタイミング（48時間など）で投与してみてもよいかもしれない。またGnRHの成分としては、本試験で使用したブセレリン酢酸塩以外にも酢酸フェルチレリンなどがあり、それぞれの成分の違いによる排卵効果についても検討していくとよいかもしれない。

以上より、本試験ではヒアルロン酸添加pFSH製剤の皮下1回投与と筋肉内投与を併用した投与方法により、理想的なpFSH動態を得られることが明らかになった。しかしながら採胚成績向上のためには、排卵誘起を確実に起こす方法を検討していく必要がある。

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).
- 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)