

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)

中原 仁・小田頼政・小田 亘*

Effects of superovulation in Japanese Black Cattle with two-shot method of human Menopausal Gonadotrophin dissolved in physiological salt solution

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、ウシへの有効性が報告されているヒト閉経期性腺刺激ホルモンの2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、hMG区では平均推定黄体数 16.4 個、回収胚数 16.8 個、正常胚数 13.7 個であり、FSH区ではそれぞれ 13.6 個、13.8 個、10.4 個と有意な差はないものの hMG区において良好な成績が得られた。
- 2 正常胚率は hMG区では 81.3%であり、FSH区では 75.9%と hMG区が高い傾向が認められた。
- 3 胚のランク別割合は、hMG区ではAランク 60.4%、Bランク 17.2%、Cランク 4.1%であり、FSH区ではそれぞれ 57.7%、12.3%、5.9%と hMG区がAおよびBランクともに若干高い割合であった。

以上のことから、hMGを用いたウシ過剰排卵処理の簡易投与法は、一般に実施されている FSHを用いた漸減投与法に比べ有意差はないものの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方法であることが示唆された。

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、本県において年間のべ 350 頭以上の供胚牛から胚回収が実施され、のべ 2,000 頭以上の胚移植が行われるようになってきている。

胚移植に必要な良質胚を多数確保するためには過剰排卵処理技術は必要不可欠である。ウシの過剰排卵処理は、これまでの研究から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法が開発され、FSH の漸減投与

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 溶液に溶解して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いる。

そこで、今回従来どおりの生理食塩水を溶媒とし、高い卵胞刺激作用を有する hMG の投与回数を減少した過剰排卵処理の簡易化について検討した。

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）16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日以上の間隔を設けて実施した。

2 実施期間

平成18年12月～平成19年9月

3 試験区分および方法

(1) 過剰排卵処理

供胚牛に対して腔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。発情は直腸検査により確認し、発情と判断できた個体に対しては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。発情後10日から12日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の過剰排卵処理を実施した。性腺刺激ホルモン（以下「GTH」という）は、hMG（hMG注テイゾー150：あすか製薬）とFSH（アントリンR：川崎三鷹製薬）を用い、GTH投与開始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た。人工授精は、GTH投与開始5日目の夕方と6日目の朝の計2回実施した。

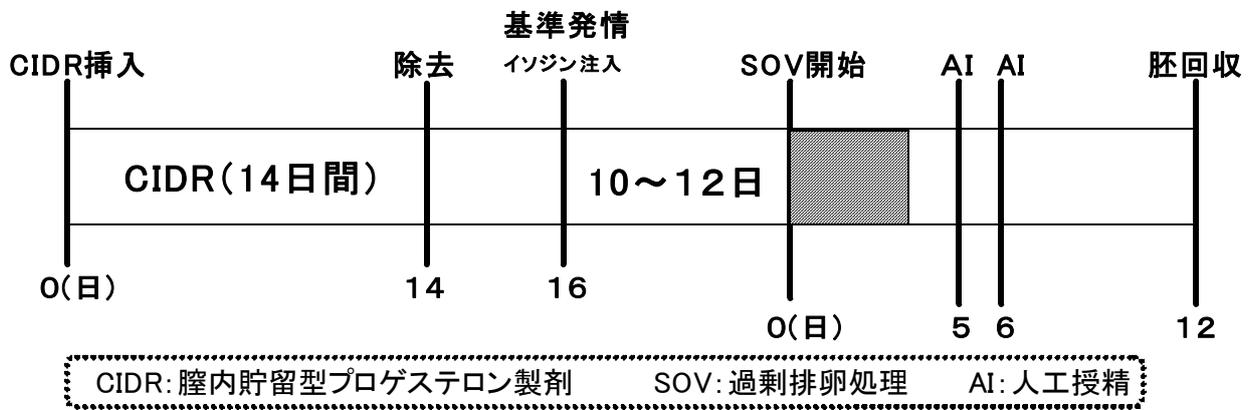


図1 黒毛和種における胚回収実施プログラム

(2) 試験区分

試験区の設定は、hMGを用いて投与回数を2回のみ減らしたhMG区と対照区として従来どおりにFSHを3日間の計6回投与するFSH区を設け、図1に示したとおり処理を行った。

(ア) hMG区

hMG区は、hMG総量300IUを生理食塩水に溶解

し、処理開始1日目の朝夕2回のみ150IUずつ頸部皮下に投与した。

(イ) FSH区

FSH区は、FSH総量20AUを頸部皮下に1日2回、3日間減量投与（5、5、3、3、2、2）する通常の漸減投与方法で行った。

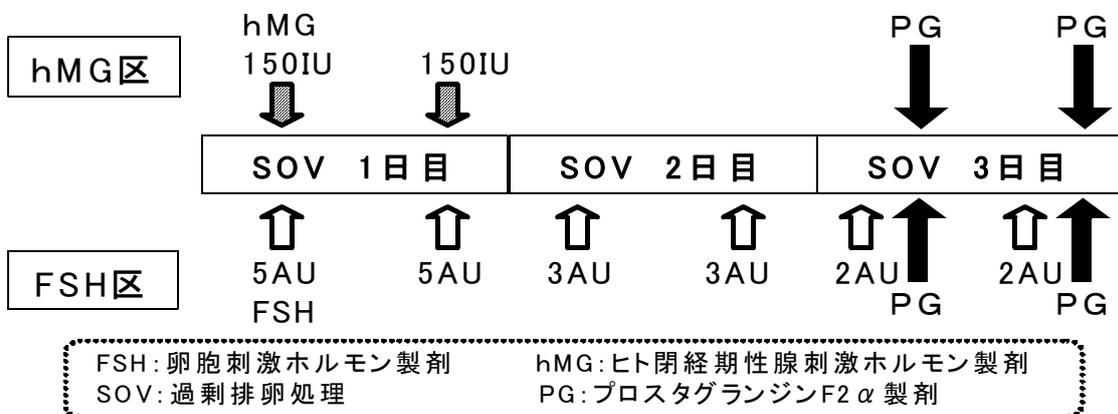


図2 hMG製剤を用いた過剰排卵処理方法

(3) 胚回収

胚回収は、過剰排卵処理後の発情日を0日として、7日目(GTH処理後12日目)にバルーンカテーテル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注入した。回収胚のランク分けは、Lindnerら¹³⁾に従って分類し、それぞれの胚回収成績ならびに胚の品質を比較検討した。なお、黄体数は直腸検査により推定した。

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

処理方法別の胚回収成績を表1に示した。hMG区の平均推定黄体数16.4個、平均回収卵数16.8個および平均正常胚数13.7個であったのに対してFSH区ではそれぞれ13.6個、13.8個、10.4個とすべての結果において有意な差は認められなかったが、投与回数を減らしたhMG区において良好な成績が得られた。また、回収総数に対する移植可能胚数の割合を示した正常胚率を比較してみるとhMG区で81.3%(219/268)に対しFSH区が75.9%(167/220)と有意な差はないもののhMG区が高い傾向であった。

表1 過剰排卵処理別の胚回収成績

処 理 区	h M G 2回投与	F S H 漸減投与
処理頭数	16	16
推定黄体数	16.4±9.9	13.6±10.9
残存卵胞数	0.2±0.5	0.2±0.5
回収総数	16.8±11.1	13.8±12.2
正常胚数	13.7±11.2	10.4±9.9
正常胚率(%) ¹⁾	81.3%	75.9%

値は平均値±標準偏差

¹⁾正常胚率=正常胚数/回収総数×100

次に処理方法別の回収胚のランクを表2に示した。回収された正常胚のランク割合を見ると、A、B、Cランク別の割合はhMG区で60.4%、17.2%、4.1%であったのに対してFSH区ではそれぞれ57.7%、12.3%、5.9%であり、hMG区が若干高い成績であった。

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(%)			
		Aランク	Bランク	Cランク	変性卵
h M G区	268	60.4	17.2	4.1	18.3
F S H区	220	57.7	12.3	5.9	24.1

FSHは、半減期が短いため、過剰排卵処理には頻回投与する必要がある¹⁴⁾とされており、吸収性の早い生理食塩水に溶解しウシの過剰排卵処理に利用する場合には、1日2回、3~4日間減量しながら投与する方法が一般的である。今回試験に用いたhMGも、FSHと同様に半減期が短いホルモンと推定されており、FSHと同様に1日2回、数日間減量投与する方法においては、FSHと同等以上の胚回収成績が得られると報告^{9)~11)}されている。今回、私たちが行ったhMGを2回のみ投与する簡易法は今までのところ報告されておらず、これまでの報告と比較することはできないが、一般に利用されているFSHを用いた漸減投与方法に比べ若干ではあるが高い胚回収成績ならびに回収胚の品質が得られたことから生理食塩水を溶媒に用いたウシ過剰排卵処理方法の簡易化を図る上で有効な手技であると考えられた。

これまで、ウシ過剰排卵処理の簡易化はFSHをPVPや水酸化アルミニウムゲルに溶解して投与する方法で試みられ、漸減投与方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)}。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の漸減投与方法と同等の採胚成績を得ている。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動態は漸減投与方法と同等であると武富ら¹⁵⁾は報告している。また、水酸化アルミニウムゲルを溶媒とした場合でも同様の報告⁶⁾がなされている。しかし、hMGを用いたウシの過剰排卵処理では、血中レベルでのホルモン動態を調査した報告はなく、作用機序や体内への吸収速度などは不明である。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が、今回、血中のホルモンの動態を調査していないため、ホルモンの持続時間等を明らかにすることができず、今後の検討が必要であろう。

しかし、ホルモン等の作用機序を明らかにできなかったので推測の域を脱しえないが、今回得られた結果から 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 を投与した場合の FSH、LH、エストロゲン等のホルモン動態や卵胞発育の観察などを検討し、hMG の作用機序や体内吸収速度を明らかいくと共に hMG を用いたウシ過剰排卵処理のさらなる簡易化方法を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を溶媒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 を溶媒とした 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・檜原孝正 (2000) : PVP を溶媒とした 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, Miharuru 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 Surepovuration 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) G. M. Lindner and R. W. Wright Jr (1983) : Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20, 407-416.
- 14) 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 tretment in cows. *Theriogenology*, 30, 379- 386.
- 15) T. Taketomi, M. Aoyagi, H. Konishi, K. Kishi, K. Taya, G. Watanabe, S. Sasamoto (1993) : Super-ovuration in holstein heifers by a single injection porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 39, 327.