

# ヒト閉経期性腺刺激ホルモンを用いた黒毛和種供胚牛への 過剰排卵処理の検討

澤 香代子 長谷川清寿 岡崎尚之

**要約** ウシの過剰排卵処理の簡易化と胚採取成績の高位安定化を目的に、黒毛和種経産牛におけるヒト閉経期性腺刺激ホルモン製剤 (hMG) を用いた過剰排卵処理方法を検討する2つの実験を行った。実験1では、黒毛和種経産牛6頭を、hMG (総量300IU) を1日のみ2回投与するhMG区と、卵胞刺激ホルモン製剤 (pFSH、総量20AU) を3日間漸減投与するFSH区にそれぞれ供試し、処理開始時、プロスタグランジンF<sub>2α</sub> (PG) を投与した処理開始後56時間目、処理開始後104時間目に超音波画像で大卵胞 (8 mm以上) 数、中卵胞 (5 mm以上8 mm未満) 数および小卵胞 (2 mm以上5 mm未満) 数を計測した。また、供試牛のプロジェステロン (P4) およびエストラジオール-17β (E2) 濃度を測定し、血中動態を解析した。実験2では黒毛和種経産牛17頭をhMG区およびFSH区にそれぞれ供試し、人工授精後7日目に胚採取を行い、胚採取成績を比較検討した。実験1において、卵巣動態、血中ホルモン濃度の変化は両区間で差は見られなかったが、処理開始後56時間目および104時間目における大卵胞数 (平均値±標準誤差) はhMG区 (8.7±3.3および19.7±9.3個) がFSH区 (14.0±3.5および32.2±6.4個) よりもやや少なかった。実験2の成績では、胚採取成績は推定黄体数がFSH区 (25.0±2.9個) よりもhMG区 (14.9±3.1個) で有意に少なく、回収卵数についてもFSH区 (22.1±3.0個) よりhMG区 (13.5±3.0個) の方が少ない傾向であった。正常胚数はhMG区 (9.6±2.5個) とFSH区 (12.1±3.5個) で有意な差はなく、A、Bランク胚数はhMG区 (7.6±2.1個) とFSH区 (7.8±2.2個) でほぼ同値であった。正常胚率はhMG区が59.6±9.2%、FSH区が48.2±9.1%であった。以上のことから、今回のhMGによる過剰排卵処理方法は胚採取成績の向上は見られなかったが、処理の簡易化は可能であることが示唆された。

**キーワード**：ウシ 過剰排卵処理 簡易化 hMG

ウシの過剰排卵処理は、一般にブタ由来卵胞刺激ホルモン製剤 (pFSH) の漸減投与によって行われており、現状では3または4日間、合計6ないし8回の投与プログラムが必要とされている。その一方で、pFSH投与回数を減らす目的で特殊なアジュバントとの混合による1回投与方法<sup>1-3)</sup>も検討されているが、実用化に至っていない。

近年、ヒト閉経期性腺刺激ホルモン製剤 (human menopausal gonadotrophin; hMG) を黒毛和種の過剰排卵処理に用いたところ、pFSHの場合と比べて回収卵数、正常胚数、正常胚率などの胚採取成績が良好であったと報告された<sup>4-6)</sup>。しかし、現状では、hMGの投与量や方法は研究者によって様々であり、完全には確立されていない。一方、hMGについてもpFSHと同様に1回投与方法<sup>7)</sup>が検討されており、処理プログラムの簡易化の可能性がでてきた。

そこで今回は、供胚牛1頭当たりの胚採取成績の向上と過剰排卵処理の簡易化を目的に、hMGの1日のみ2回投与方法と従来のpFSHの3日間漸減投与方法について、卵巣動態および血中ホルモン濃度の変

化を調べるとともに、胚採取成績を比較検討した。

## 材料および方法

### 実験1

手法の異なる過剰排卵処理法別に、卵巣の反応を血中性ステロイドホルモンの濃度変化とともに調べた。供試牛は、当センター内の黒毛和種経産牛6頭とし、hMG (HMG注テイゾー150、あすか製薬) 総量300IUを1日のみ朝夕2回同量筋肉内投与するhMG区と、pFSH (アントリンR・10、川崎三鷹製薬) 総量20AUを朝夕2回、3日間の漸減投与するFSH区に、それぞれ供試した。両区ともに過剰排卵処理は発情後9ないし14日目に開始し、初回投与の56時間後にプロスタグランジンF<sub>2α</sub> (PG) 類縁体 (d-クロプロステロール、ダルマジン、川崎三鷹製薬) を0.225mg、104時間後に性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 類縁体 (酢酸フェルチレリン、コンサルタン注射薬、あすか製薬) 100μgをそれぞれ筋肉内投与した (図1)。すべての供試牛について、処理開始時、処理開始後56時間目 (PG投与時)

および同104時間目（PG投与後48時間目）に超音波画像診断装置（SSD-1200、7.5MHzプローブ、ALOKA）を用いて、大卵胞（直径8mm以上）数、中卵胞（直径5mm以上8mm未満）数および小卵胞（直径2mm以上5mm未満）数を計測した。また、血中プロジェステロン（P4）濃度、エストラジオール-17β（E2）濃度を測定するための採血は、処理開始後128時間までの期間中は朝夕の1日2回、以降は処理開始後264時間目（胚採取日）まで1日1回朝のみ行った。供試牛の血液は頸静脈よりヘパリン加試験管に採取、その後直ちにサンプル血漿を分離し（4℃、3,000rpm、20分）、測定まで-30℃で保存した。P4およびE2の測定は、時間分解蛍光免疫法<sup>8,9)</sup>で行った。

### 実験2

過剰排卵処理方法別に胚採取成績を比較した。供試牛は当センター内の黒毛和種経産牛17頭とし、実験1と同様にhMG区とFSH区の2区を設定した。供試牛への人工授精（AI）は、2回（PG投与後48および64時間目）行った。初回AI後7日目に超音波画像で推定黄体数を計測した後、子宮灌流によ

て卵を回収した。回収卵の評価は胚の衛生的取り扱いマニュアル<sup>10)</sup>に準じて行った。

### 統計処理

実験1および2のそれぞれの調査項目について、Student's t-testを行った。

## 結 果

### 実験1

供試牛の大卵胞数、中卵胞数および小卵胞数の推移は、図2に示すとおりであった。処理開始時の大卵胞および中卵胞数（平均値±標準誤差）は、hMG区が1.3±0.2個および1.7±0.5個、FSH区が1.5±0.2個および2.8±1.0個であった。処理開始後56時間目（PG投与時）の大卵胞および中卵胞数はhMG区が8.7±3.3個および15.8±4.6個、FSH区が14.0±3.5個および17.5±2.4個、処理開始後104時間目（PG投与後48時間目）の大卵胞および中卵胞数はhMG区が19.7±9.3個および6.3±1.6個、FSH区が32.2±6.4個および5.7±1.0個であった。処理開始後56時間目および104時間目において、hMG区の大卵胞数がFSH区と比べて少ない傾向であったが、差はみられ

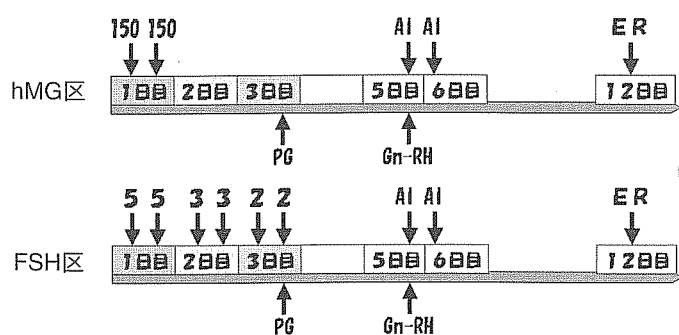


図1 各区の過剰排卵処理方法。処理開始日を1日目として、hMG区は、150IUを1日目のみ朝夕投与（総量300IU）。FSH区は朝夕2回の3日間漸減投与（総量20AU）。AI：人工授精，ER：胚採取。

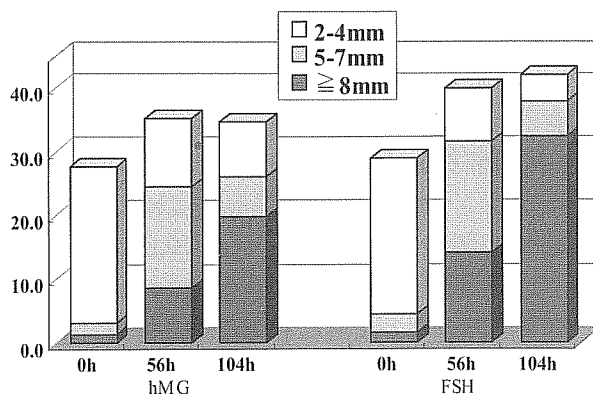


図2 卵巣内各サイズの卵胞数の推移（n=6）。0h：処理開始時，56h：PG投与時，104h：PG投与後48時間目。

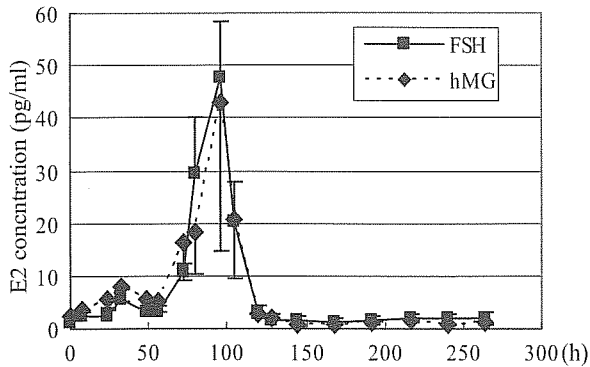
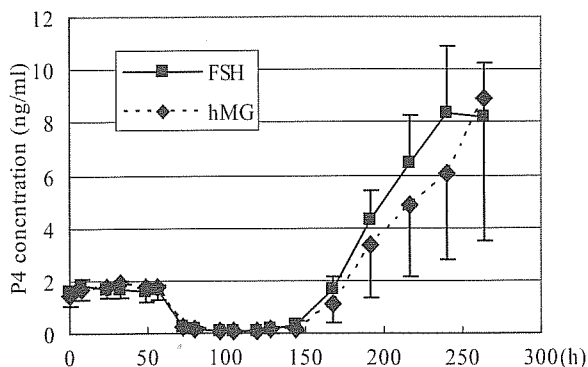


図3 各区の血中ホルモン濃度の推移（n=6）。横軸は、処理開始からの経過時間。処理開始日（1日目）を0時間（0h）として、処理開始から128h（6日目）までは朝夕採血。それ以降264h（12日目）までは1日1回朝採血。

表1 過剰排卵処理後の胚採取成績

項目\区分	hMG	FSH
供試頭数	17	17
推定黄体数	14.9±3.1 <sup>a</sup>	25.0±2.9 <sup>b</sup>
回収卵数	13.5±3.0	22.1±3.0
正常胚数	9.6±2.5	12.1±3.5
正常胚率(%)	59.6±9.2	48.2±9.1
A、Bランク胚数	7.6±2.1	7.8±2.2
A、Bランク胚率(%)	48.3±8.2	32.9±7.4

値は平均値±標準誤差

正常胚率=正常胚数/回収卵数×100

A、Bランク胚率=A、Bランク胚数/回収卵数×100

異なる文字間に有意差有り a:b P<0.05

なかった。

血中P4およびE2濃度の推移は図3に示した。P4濃度(平均値±標準誤差)は両区ともに、PG投与後急激に低下し、同投与後4から5日目に上昇し始め、胚採取日にhMG区は8.9±5.4ng/ml、FSH区は8.2±2.1ng/mlを示した。E2濃度(平均値±標準誤差)は、処理開始後徐々に上昇し、PG投与後は著しく上昇し、同投与後40時間目にhMG区は42.8±28.1pg/ml、FSH区は47.7±10.9pg/mlのピークを示した後、急激に低下し、PG投与後4日目以降は基底レベルで推移した。

#### 実験2

各区の胚採取成績を表1に示した。胚採取時の推定黄体数(平均値±標準誤差)はhMG区がFSH区と比べて明らかに少なく(P<0.05)、回収卵数(平均値±標準誤差)についてもhMG区の方が少ない傾向であった。正常胚数(平均値±標準誤差)はhMG区がFSH区と比べてやや少なかったものの、有意差はなく、A、Bランク胚数(平均値±標準誤差)ではhMG区が7.6±2.1個、FSH区が7.8±2.2個とほぼ同値であった。正常胚率およびA、Bランク胚率ではhMG区がFSH区よりも比較的高率であった。

#### 考 察

現在ウシの過剰排卵処理は、主にpFSHの3または4日間の漸減投与によって行われている。しかし、胚採取成績には個体差があり、その要因として供胚牛の産歴や年齢、処理に用いるホルモン剤の種類と用量<sup>11, 12)</sup>、飼養環境<sup>13, 14)</sup>、ストレス<sup>15, 16)</sup>などが考えられている。また、pFSHを用いる場合、1日2回の投与が数日間必要であるため、確実性の高い胚の採取に加えて過剰排卵処理の簡易化が求められてい

る。そこで今回、pFSHと同等あるいはそれ以上の胚採取成績が得られている<sup>4-6)</sup> hMGを用いて、投与量および投与回数を設定して検討した。

菅野ら<sup>5)</sup>はhMGの投与量と投与回数を比較した試験で、総量600IUの3日間投与で高品質(Aランク)胚の回収率が高く、回収卵数は投与量が増すにつれて増加する傾向が見られたが、移植可能胚数には差がなかったため、600IUが黒毛和種における適当量であるとしている。また阪田ら<sup>6)</sup>は、pFSHで胚採取成績が不良であった牛に対する総量750IUの3日間投与が正常胚数、正常胚率を向上させることを示した。さらに、hMGとpFSHの併用法でpFSHに対する反応不良牛の成績が改善したという報告<sup>17, 18)</sup>もある。一方、大田ら<sup>19)</sup>は、総量900IUの4日間投与は胚回収成績はpFSHと差がないが、バラツキが大きかったと報告している。これらの報告と比べて、我々が設定したhMG投与量は低用量であり、150IUを2回投与する総量300IUは、これまでの450ないし900IUの2から4日間投与<sup>4-6, 19, 21)</sup>での1日目のみ、併用法<sup>17, 18)</sup>での1日目のみを実施したということになる。今回の成績では、hMG区の平均推定黄体数がFSH区よりも明らかに少なく、回収卵数においても少ない傾向であった。また、実験1で処理開始後56時間目および104時間目の大卵胞数がhMG区でやや少なく、小卵胞数は逆にhMG区の方がやや多かった。これらの結果は、総投与量が300IUで1日2回のみでの投与という、既報<sup>4-6, 19, 21)</sup>よりも低用量で投与回数が少ないことが影響したのかもしれない。菅野ら<sup>5)</sup>はhMGの投与量により回収卵数が増減する傾向があることを示しており、今回のhMG区では卵胞発育の促進が比較的弱かった可能性がある。一方、実験2において正常胚数およびA、Bランク胚数は両区間で有意な差はなく、正常胚率とA、Bランク胚率はhMG区がFSH区よりも比較的高率であった。したがって、今回のhMG投与法はpFSHよりも卵巣反応が低いものの、一供胚牛あたりでは同レベルの数の正常胚採取が期待できることから、この方法による過剰排卵処理の簡易化は可能と推察された。ただし、pFSHと同様に胚採取成績に個体差が大きく、目的であった胚採取成績向上もみられなかったため、投与量や投与方法を再検討する必要もあると考えられた。

胚採取成績は、P4、E2、黄体形成ホルモン(LH)等の血中ホルモン濃度変化との関連性が報告されている<sup>20, 21)</sup>。Suganoら<sup>21)</sup>は、hMGを600IU投与した場合に、処理開始後のE2濃度の上昇開始がpFSHと比

べて早く、それに引き続くLHサージの出現も早い傾向を認めている。その理由として、hMGの卵胞発育刺激活性の強さを挙げており、それが胚採取成績に影響したと考察している。今回の実験では、P4およびE2濃度は両区間で同様な変化を示したが、hMG区がFSH区と比べ卵巣反応がやや低く、hMGの卵胞発育刺激活性は用量依存的である可能性が推察された。

一方、pFSHにおいてはLH含量が低い方が胚採取成績が良いことが知られている<sup>7,19)</sup>。今回用いたpFSHはLH含量が極めて低いレベルになるよう精製され、製造ロット差が少ないとされる<sup>20)</sup>。これに対して、hMGはFSHとLHの活性比が約1とされ<sup>23)</sup>、製造ロットによるLH含量差が比較的大きいことも想定される。今回、hMG区がFSH区と比べて卵巣反応が不良であったことの理由の1つにLH含量差が推察される。それにも関わらず正常胚数およびA、Bランク胚数で両区に差がなかった理由は今回の実験からは明確にできなかったが、hMGの製造ロットによるLH含量差が胚採取成績に何らかの影響を及ぼした可能性もあると考えられた。また、今回は血中FSH濃度変化も調べていないため、各ホルモン剤の血中濃度推移や作用時間などが不明であり、それぞれの処理方法に対する反応について、詳細な解析ができなかった。今回のように、新たな過剰排卵処理プログラムを検討する場合には、FSHやLHの血中動態の分析を追加することが必要であると考えられた。

今回のhMG投与法は、従来のpFSH漸減投与法と同等レベルの正常胚数およびA、Bランク胚数が得られ、正常胚率が高率傾向であることが明らかになった。さらなる検討は必要であるが、今回の結果から、黒毛和種経産牛の過剰排卵処理にhMGを用いる場合、総量300IUの1日のみ2回投与で行えば、比較的低用量での投与回数の低減が可能であることが推察された。

#### 参 考 文 献

- 1) Yamamoto M., et al. *Theriogenology*, 41: 747-755. 1994.
- 2) Satoh H., et al. *Theriogenology*, 45: 332. 1996.
- 3) Kimura K., et al. *Theriogenology*, 68: 633-639. 2007.
- 4) 菅野美樹夫ら. 福島県畜産試験場研究報告, 8: 1-4. 1995.
- 5) 菅野美樹夫ら. 福島県畜産試験場研究報告, 8: 5-9. 1995.
- 6) 阪田昭次ら. 山口県畜産試験場報告, 16: 137-141. 2000.
- 7) Sugano M., et al. *Animal Reproduction Science*, 55: 175-181. 1999.
- 8) Hemmila I., et al. *Analytical Biochemistry*, 137: 335-343. 1984.
- 9) Takahashi T., et al. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66: 225-229. 2004.
- 10) 社団法人畜産技術協会. 胚の衛生的取り扱いマニュアル (IETSマニュアル第3版), 164-167. 東京. 2001.
- 11) 前原 智ら. 鳥根県立畜産試験場研究報告, 32: 1-5. 1999.
- 12) Lerner S.P., et al. *Journal of Animal Science*, 63: 176-183. 1986.
- 13) 若槻義弘ら. 鳥根県立畜産試験場研究報告, 23: 56-59. 1988.
- 14) 安部茂樹ら. 鳥根県立畜産試験場研究報告, 24: 6-9. 1989.
- 15) Dobson H., et al. *Theriogenology*, 55: 65-73. 2001.
- 16) Hansen P.J., et al. *Theriogenology*, 55: 91-103. 2001.
- 17) 水谷将也ら. 第21回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会要旨集, 42-43. 2006.
- 18) 安川幸子ら. 奈良県畜産技術センター研究報告, 33: 1-5. 2007.
- 19) 大田 均ら. 鹿児島県畜産試験場研究報告, 23: 8-12. 1991.
- 20) 佐々木恵美ら. 鳥根県立畜産試験場研究報告, 36: 29-32. 2003.
- 21) Sugano M., et al. *Reproduction in Domestic Animals* 36: 57-63. 2001.
- 22) 川口 擁. 農林水産技術研究ジャーナル, 28: 24-26. 2005.
- 23) あすか製薬. [http://www.aska-pharma.co.jp/iryuuiyaku/seihin/if/if\\_hmg\\_inj.pdf](http://www.aska-pharma.co.jp/iryuuiyaku/seihin/if/if_hmg_inj.pdf)