

黒毛和種のワンショット過剰排卵処理法の確立に関する研究(第1報)

筋肉内投与法の検討

誌名	岐阜県畜産研究所研究報告
ISSN	13469711
著者名	林, 登 加藤, 誠二 坂口, 慎一 澤田, 幹夫 関, 誠 竹内, 昭司 木村, 康二 角川, 博哉
発行元	岐阜県畜産研究所
巻/号	5号
巻号補足	
掲載ページ	p. 30-34
発行年月	2005年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



黒毛和種のワンショット過剰排卵処理法の確立に関する研究 —第1報 筋肉内投与法の検討—

林 登・加藤誠二・坂口慎一・澤田 幹夫・関 誠¹⁾・竹内昭司¹⁾・木村康二²⁾・角川博哉²⁾

¹⁾ 川崎三鷹製菓株式会社

²⁾ 農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所

牛の過剰排卵処理法の簡易化・省力化を図るため、水酸化アルミニウムゲルを卵胞刺激ホルモン（FSH）の溶解剤として用いたFSHの1回投与（ワンショット法）による過剰排卵処理法の有効性を検討した。

黒毛和種経産牛9頭を用い、1頭の牛について水酸化アルミニウムゲルを用いたワンショット法（30AU 1回、筋肉内投与）と従来の漸減投与法（5, 5, 3, 3, 2, 2, 計6回、20AU、筋肉内投与）による過剰排卵処理をそれぞれ1回ずつ実施し、発情の状況、採卵時の黄体数、卵胞数および採卵成績を比較した。

1. ワンショット区では9頭中8頭に、漸減投与区では9頭中全頭に明瞭な発情が観察された。
2. 採卵時の平均黄体数、大卵胞数は、ワンショット区でそれぞれ8.7±5.3個、2.9±1.5個、漸減投与区で9.6±5.7個、1.9±1.7個でいずれも有意な差は認められなかった。
3. 平均回収卵数、正常卵数は、ワンショット区でそれぞれ6.7±6.4個、4.1±3.4個、漸減投与区で8.6±5.8個、4.1±2.8個でいずれも有意な差は認められなかった。

以上の結果から、黒毛和種において、水酸化アルミニウムゲルを用いたFSHの1回投与による過剰排卵処理を行うことにより、従来の漸減投与法と比較し遜色ない採卵成績が得られ、この方法が過剰排卵処理法の簡易化、省力化を図るための技術として利用可能であることが示唆された。

キーワード（黒毛和種、過剰排卵誘起、水酸化アルミニウムゲル、ワンショット）

緒 言

牛の過剰排卵処理は、一般的に卵胞刺激ホルモン（FSH）を漸減投与する方法が用いられており、黒毛和種の場合1日2回、3～4日間にわたり、総量18～24AUのFSHを筋肉内に投与する方法が用いられている。しかしこの方法では牛に対するストレスが大きい上、ホルモン処理も煩雑となるため、過剰排卵処理法の簡易化が求められている。

過剰排卵処理法の簡易化については、山本ら¹⁾がポリビニルピロリドン（PVP）に溶解したFSHの1回投与により漸減投与法と同等の採卵成績を得たと報告して以来、多くの研究機関でこの方法を基本にした過剰排卵処理法の検討がされている¹⁾²⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾。しかし、この方法では高濃度のPVP溶液を使用するため、FSHとの混合が容易でないなどの問題点が指摘されている³⁾。

近年、木村ら⁴⁾はワクチンのアジュバントや、他の薬剤の賦形剤として利用されている水酸化アルミニウムゲルについて、FSHに対して高い吸着、放出能を有することを明らかにしている。さらにこれを溶解剤とした

FSHの単回投与による過剰排卵処理と従来の漸減投与法による処理における採卵成績を比較した結果、有意な差がなかったことを報告している。

牛の過剰排卵処理に対する反応は個体差が大きいいため、今回、同一牛について、水酸化アルミニウムゲルを用いたFSHの1回投与法（ワンショット法）と従来の漸減投与法による過剰排卵処理をそれぞれ1回ずつ実施し、採卵成績を比較した。

材料及び方法

1. 試験区分及び供試牛

試験区分は、過剰排卵処理として水酸化アルミニウムゲルを溶解剤としたFSH30AUの溶液を1回投与するワンショット区と、生理食塩水に溶解した合計20AUのFSHを3日間にわたり減量投与する漸減投与区の2区を設定し、当所に繋養している黒毛和種経産牛9頭を用い、各処理を1～4ヶ月の間隔で1回ずつ行った。

2. 試験期間

平成16年7月から平成17年4月に試験を実施した。

3. 試験方法

1) 薬剤調整

過剰排卵処理には高度精製FSH製剤（アントリン10、川崎三鷹製薬、Lot No. 203221、以下FSH）を用いた。ワンショット区ではFSH30AUを3mg/ml濃度の水酸化アルミニウムゲル（川崎三鷹製薬）5mlに溶解した。漸減投

与区ではFSH10AUを5mlの生理食塩水で溶解し、必要量を処理に用いた。

2) 過剰排卵処理

ワンショット区、漸減投与区の過剰排卵処理スケジュールについて図1に示した。

Days		-7	...	1	2	3	4	5	6	...	12
ワンショット区	AM	(CIDR in)		FSH 30AU +ゲル 5ml		PG 0.75mg (CIDR 抜去)			AI		採卵
	PM					PG 0.75mg		AI			
漸減投与区	AM	(CIDR in)		FSH 5AU	FSH 3AU	FSH 2AU PG 0.75mg (CIDR 抜去)			AI		採卵
	PM			FSH 5AU	FSH 3AU	FSH 2AU PG 0.75mg		AI			

図1 過剰排卵誘起スケジュール

過剰排卵処理は、発情日を0日目として性周期の9～14日目に、あるいは一部陰内留置型プロゲステロン製剤（イーザーブリード・CIDR、（社）家畜改良事業団）を用いて性周期に関係なく処理を開始した。各区の処理スケジュールに従い、ワンショット区では頸部筋肉内にFSHの1回投与、漸減投与区では3日間にわたる朝、夕2回の減量投与を行い、各区ともFSH投与開始後48時間目及び56時間目に黄体退化作用のあるクロブプロステノール製剤（クロブプロメイトーC、住友製薬、以下PGF_{2α}）750μgを頸部筋肉内に投与した。

3) 人工授精

人工授精は処理開始日を1日目として3日目の夕方及び4日目の朝の2回行った。

4) 採卵及び処理

採卵は、人工授精後7日目に当所の常法に従い行った。回収卵は実体顕微鏡下で形態を観察し、正常胚、変性胚、及び未受精卵に分類し、正常胚についてはA、B、Cの3段階に分類を行った。

5) 卵巣の反応観察

採卵終了時に、直腸検査とともに超音波診断装置（アロカSSD-1200）を用い、黄体数、直径8mm以上の大卵胞数をカウントした。

結 果

各区において、処理開始後5日目に明瞭な発情が観察された頭数は、ワンショット区では9頭中8頭で、漸減投与区では9頭全頭で発情が観察された。

採卵成績について表1に、また採取された胚のランクを表2に示した。

表1 採卵成績

試験区	実施頭数	成功頭数	黄体数	大卵胞数	回収卵数	正常胚数
ワンショット	9	7	8.7±5.3	2.9±1.5	6.7±6.4	4.1±3.4
漸減投与	9	9	9.6±5.7	1.9±1.7	8.6±5.8	4.1±2.8

平均±標準偏差

表2 回収卵のランク

試験区	回収卵数	回収卵数に占める割合(%)				未受精卵
		A	B	C	変性胚	
ワンショット	60	38.4	18.3	5.0	18.3	20.0
漸減投与	77	28.5	15.6	3.9	26.0	26.0

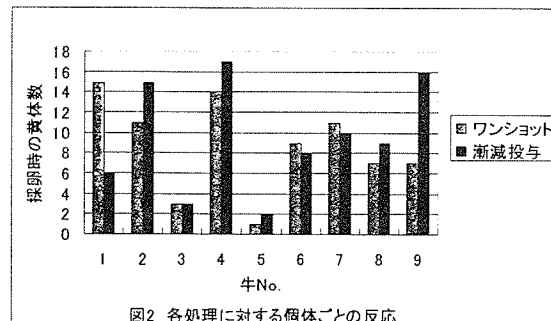


図2 各処理に対する個体ごとの反応

採卵成功頭数はワンショット区で7頭、漸減投与区で9頭であった。

採卵時の黄体数は、ワンショット区で8.7個、漸減投与区で9.6個、大卵胞数はワンショット区で2.9個、漸減投与区で1.9個といずれも有意な差は認められなかった。回収卵数については、ワンショット区が6.7個、漸減投与区が8.6個で、ワンショット区で低い傾向が見られたが有意差はなく、正常胚数も両区ともに4.1個で差はなかった。

回収卵のランクについては、ワンショット区では漸減投与区と比較し、良質胚が多く変性胚が少ない傾向が見られた。

図3には、各処理区における採卵時の黄体数を個体ご

とに示した。採卵時の黄体数を個体別に比較した場合、ワンショット区、漸減投与区の方が多いというような一定の傾向は見られなかった。

考 察

今回ワンショット区では2頭の牛からは卵が回収できなかった。このうち1頭は漸減投与法でも反応が悪い個体であり、またもう1頭については、採卵時に行った卵巣の超音波観察で数個の黄体が観察されたが、大卵胞も数個観察された個体で、子宮の収縮が強く卵回収が十分行えなかった可能性があった。個体別にワンショット法と漸減投与法による卵巣の反応を比較した場合、個体ごとにその成績は異なり、一定の傾向は認められなかった。また、採卵成績にも差がなかったことから水酸化アルミニウムゲルを用いたFSHのワンショット処理による方法は、従来の漸減投与法の代わりに利用できる方法と考えられた。

胚の品質について、ワンショット区でやや良い傾向が見られたが、これがワンショットによるストレス軽減に起因するものであるかどうかは、さらに検討が必要であると思われる。

今回FSHの溶解剤として用いた水酸化アルミニウムゲルに関し、木村ら³⁾は、*in vitro*において水酸化アルミニウムゲルはFSHを高率に吸着する能力を有し、吸着されたFSHは体液の主要成分である血清アルブミンと置換され放出されると報告している。また、*in vivo*においてもゲルに吸着させたFSHを筋肉内投与した場合、血中のFSH濃度は約12時間後にピークとなり、その後緩やかに減少し、数日間にわたりFSHが血中に存在していることを確認している。

これまでFSHの1回投与による過剰排卵処理として主に行われてきたPVPを用いた方法における血中FSHの消長について、Takedomiら⁸⁾は投与後6時間目から血中レベルが上昇し、その後60～72時間ピークレベルを維持すること、また生理食塩水に溶解した場合には投与後6時間目にはピークレベルに達することを報告しており、PVPを用いた方法では漸減投与法に比べ血中のFSHレベ

ルがピークに達するまでに時間がかかると考えられる。これを補う方法として、PVP溶液に溶解したFSH25AUまたは30AUと生理食塩水に溶解したFSH5AUを同時に投与する方法が試みられ、漸減投与法と比較し遜色ない成績が得られたという報告がされている⁵⁾⁶⁾⁷⁾。

一方、今回行った水酸化アルミニウムゲルを用いた方法における血中のFSHの動態について、木村ら³⁾は血中FSHレベルが投与後徐々に上昇し、約12時間後にピークとなり、その後緩やかに減少、投与後4日後も血中にFSHが存在したと報告している。このことから水酸化アルミニウムゲルを用いた方法では、PVPの単独処理法に比べ、漸減投与法に近い血中FSHの動態を示すのではないかと推察され、このため今回および木村ら³⁾⁴⁾が行った水酸化アルミニウムゲルを用いたワンショット法において、漸減投与法と比較して遜色ない採卵成績が得られたものと思われる。

また、PVPは粘性が高く、FSHの溶解が容易ではないため、武田ら⁸⁾は三方活栓を用い交互に200回以上ポンピングしたFSHとPVP溶液の混合液を過剰排卵処理に用いているが、今回用いた水酸化アルミニウムゲルは粘性が低く、FSHの溶解も容易であった。このことから、FSHの1回投与で過剰排卵処理を行う場合、PVP溶液を溶解剤として用いた方法より、水酸化アルミニウムゲルを用いた方法が優れているものと考えられた。

以上から、黒毛和種において、水酸化アルミニウムゲルを用いたFSHの1回投与による過剰排卵処理を行うことにより従来の漸減投与法と比較し遜色ない採卵成績が得られ、この方法が過剰排卵処理の簡易化、省力化を図るための技術として利用可能であることが示唆された。今後さらに1回投与を行う際のFSHの量、投与を行う部位などの検討を行うとともに、野外での実証試験を行う必要があると思われる。

なお、この研究は「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」における「牛のワンショット過剰排卵誘起法の確立」に関する研究の一環として行われた。

文 献

- 1) 原 好宏・永田建一・立山松男・溝邊敬美, PVPを溶媒としたFSH1回投与によるウシの過剰排卵成績について(第1報). 宮崎県畜産試験場研究報告, 8: 22-23. (1995)
- 2) 市野清博・松岡一仁・阪田昭次・伊藤 智・嶋屋佳子・榎原孝正, ポリビニルピロリドン(PVP)を溶媒としたFSH1回投与による牛の過剰排卵処理の検討. 山口県畜産試験場研究報告, 16: 143-150. (2000)

- 3) 木村康二, 水酸化アルミニウムゲルを用いたFSH 1 回投与によるウシ過剰排卵誘起法. 畜産技術, 590 : 2-4. (2004)
- 4) 木村康二・平子 誠・岩田尚孝・青木真理・高橋ひとみ, 水酸化アルミニウムゲルを用いた単回投与によるウシ過剰排卵誘起法. 日本畜産学会第103回大会講演要旨, 123. (2004)
- 5) 窪田 力・堤 知子・山口 浩・加治佐修・川畑健次・横山喜世志, 過剰排卵処理簡易化の検討 (FSHの一回の投与による黒毛和種経産牛の過剰排卵処理効果). 鹿児島県畜産試験場研究報告, 27 : 1-3. (1994)
- 6) 須崎哲也・永田建一・溝邊敬美・中原高士・原 好宏, 黒毛和種におけるPVPを溶媒としたFSH1回投与による過剰排卵処理の検討 (第2報). 宮崎県畜産試験場研究報告, 8 : 24-25. (1995)
- 7) 須崎哲也・永田建一・溝邊敬美・中原高士・原 好宏, 黒毛和種におけるPVPを溶媒としたFSH1回投与による過剰排卵処理の検討 (第3報). 宮崎県畜産試験場研究報告, 9 : 1-6. (1996)
- 8) 武田 聡・北村 篤, 黒毛和種におけるPolyvinylpyrrolidone (PVP) 溶液を用いた簡易過剰排卵処理法の検討. 平成9年度岐阜県家畜保健衛生所業績発表会要旨集, 1-3. (1997)
- 9) T. Takedomi・Y. Aoyagi・M. Konishi・H. Kishi・K. Taya・G. Watanabe・S. Sasamoto, Superovulation in holstein heifers by a single injection of porcine FSH dissolved in Polyvinylpyrrolidone. Theriogenology, 39 : 327. (1993)
- 10) 山本政生・黒木光博・川口 擁・鈴木達行, PVPを溶媒としたFSHの1回投与によるウシの過剰排卵処理効果. 第80回家畜繁殖学会講演要旨, a31. (1991)

Superovulation induced by one-shot administration of FSH in Aluminum hydroxide gel in Japanese Black Cattle (1st report ; intramuscular administration)

Noboru HAYASHI, Seiji KATO, Shinichi SAKAGUCHI, Mikio SAWADA,
Makoto SEKI, Syoji Takeuchi, Koji KIMURA, Hiroya KADOKAWA

Abstract

In the present study, FSH was administrated to 9 Japanese Black Cattle by one intramuscular injection (one-shot FSH) and repeated intramuscular injections (repeated FSH) and their superovulation effects were compared. For one-shot FSH the hormone (30AU) was used in the form of a mixture with 5ml Aluminum hydroxide gel (3mg/ml) and for repeated FSH the hormone dissolved in saline was used in decreasing doses (5,5,3,3,2 and 2, 20AU in total) six times every 12 hours over three days. PGF_{2α} analogue (750μg) was also administrated twice 48 and 56 hours after one-shot FSH or the first injection of repeated FSH. Artificial insemination was performed on the animals during their metestrus, and 7days later embryos were collected and corpora lutea and large ovarian follicle were examined.

Obvious signs of estrus appeared in 8 out of 9 cows in one-shot FSH and all of the 9 cows in repeated FSH. Corpora lutea, large ovarian follicles, collected embryos and transferable embryos were 8.7 ± 5.3 (mean $\pm$ S.D), 2.9 ± 1.5 , 6.7 ± 6.4 and 4.1 ± 3.4 in number per cow in one-shot FSH, and 9.6 ± 5.7 , 1.9 ± 1.7 , 8.6 ± 5.8 and 4.1 ± 2.8 in repeated FSH. There was no significant difference between the means in any of the examined items.

These results suggest that one-shot administration of FSH can be used as a simple and effective treatment with the hormone to induce superovulation.

(Key Words: Japanese Black Cattle, superovulation, Aluminum hydroxide gel, one-shot administration)