

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(2)

筋肉内投与法におけるホルモン量および試作ゲルの有効性の検討

誌名	岐阜県畜産研究所研究報告
ISSN	13469711
著者名	林,登 星野,洋一郎 加藤,誠二 坂口,慎一 三品,賢三 関,誠 竹内,昭司 角川,博哉 木村,康二
発行元	岐阜県畜産研究所
巻/号	7号
巻号補足	
掲載ページ	p. 21-25
発行年月	2007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2報 筋肉内投与法におけるホルモン量 および試作ゲルの有効性の検討—

林 登・星野洋一郎・加藤誠二・坂口慎一・三品賢三・関 誠¹⁾・竹内昭司¹⁾・角川博哉²⁾・木村康二³⁾

¹⁾ 川崎三鷹製薬株式会社

²⁾ 山口大学農学部獣医学科

³⁾ 農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所

黒毛和種における水酸化アルミニウムゲルを用いた卵胞刺激ホルモン (FSH) の1回投与法 (ワンショット法) による過剰排卵処理法について、FSHの投与量及び試作水酸化アルミニウムゲルの実用性を検討した。

試験1として、ワンショット法におけるホルモンの投与量を検討するため、黒毛和種経産牛にFSH30AU (n=15) あるいは25AU (n=13) を筋肉内投与する過剰排卵処理を実施し、採卵成績として採卵時の黄体数、大卵胞数、採卵数および正常胚数を調査し比較した。

また試験2として、従来の市販水酸化アルミニウムゲル (Sigma社) に替えて、川崎三鷹製薬株式会社で開発された試作水酸化アルミニウムゲルを用いたワンショット法 (FSH 25AU 筋肉内投与) と漸減投与法 (FSH 5, 5, 3, 3, 2, 2 計20AU 筋肉内投与) による過剰排卵処理を、黒毛和種経産牛8頭に各1回ずつ実施し採卵成績を比較した。

1. 試験1における採卵時の平均黄体数と大卵胞数は、30AU区でそれぞれ 7.0 ± 4.8 個と 1.7 ± 1.0 個、25AU区でそれぞれ 7.2 ± 6.4 個と 1.0 ± 0.8 個であり、いずれにおいても両区間に有意な差は認められなかった。また、採卵個数と正常胚数についても、30AU区でそれぞれ 5.2 ± 4.7 個と 3.5 ± 4.2 個、25AU区でそれぞれ 5.8 ± 6.0 個と 4.8 ± 5.4 個であり、いずれにおいても両区間に有意な差は認められなかった。しかし、胚の品質は25AU区でより優れていた。
2. 試験2における採卵時の平均黄体数と大卵胞数は、ワンショット区でそれぞれ 7.9 ± 6.6 個と 3.6 ± 4.8 個、漸減投与区でそれぞれ 9.4 ± 6.3 個と 5.1 ± 5.4 個であり、いずれにおいても両区間に有意な差は認められなかった。また、採卵個数と正常胚数も、ワンショット区でそれぞれ 6.1 ± 5.8 個と 4.5 ± 4.4 個、漸減投与区でそれぞれ 6.0 ± 3.5 個、 2.6 ± 3.0 個であり、いずれにおいても両区間に有意な差は認められなかった。しかし、胚の品質ではワンショット区でより良い結果が得られた。

以上の結果から、黒毛和種における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では、FSHの投与量を25AUまで減量できることが示唆された。また新たに開発された水酸化アルミニウムゲルも従来のゲルの代わりに用いることができることが明らかとなった。

キーワード (黒毛和種、過剰排卵処理、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で行われている。黒毛和種の場合1日2回、総量18~24AUのFSHを数回に分けて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。

近年、Kimura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が、FSHに対して高い吸着能及び放出能を有することを明らかにし、さらにこれをFSHの吸着剤としたFSH

の1回投与（ワンショット法）による過剰排卵処理と従来の漸減投与法による処理の間で採卵成績を比較した結果、有意な差がなかったことも報告している。

我々も¹⁾同様な成績をすでに報告した。しかし、通常漸減投与法に用いられているFSHの量は18～24AUであるのに対して、我々が行ったワンショット法では30AUのFSHを用いたためか、採卵時に卵巣内に観察される大卵胞数が漸減投与法と比較して多い傾向があった。そこで、ワンショット法に用いるFSH量を25AUまで減量した時の採卵成績を30AUで行った場合と比較した。また、従来使用してきた市販水酸化アルミニウムゲルの代わりに、共同研究を行った川崎三鷹製薬株式会社で開発された試作水酸化アルミニウムゲルを使用したワンショット法による過剰排卵処理の実用性を検討した。

材料及び方法

試験1 ワンショット法におけるFSH量の違いが採卵成績に及ぼす影響

1. 試験区分及び供試牛

試験区分は、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、FSH30AUを投与する区（30AU区）と、FSH25AUを投与する区（25AU区）を設定した。供試牛にはそれぞれ黒毛和種経産牛15頭、13頭を用いた。

2. 試験期間

平成17年4月～平成17年10月に試験を実施した。

3. 試験方法

1) 薬剤調整

FSHは高度精製FSH製剤（アントリンR10、川崎三鷹製

薬）を用いた。30AU区ではFSH30AUを3mg/ml濃度の水酸化アルミニウムゲル5mlに吸着させたものを用いた。また25AU区では、FSH30AUを6mlの水酸化アルミニウムゲルに吸着させたものから5mlをとって用いた。

2) 過剰排卵処理

各試験区における過剰排卵処理スケジュールについて図1に示した。

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、あるいは一部腔内留置型プロゲステロン製剤（シダー1900、ファイザー株式会社、以下CIDR）を用いて性周期に関係なく開始した。各区の処理スケジュールに従い、頸部筋肉内にFSHの1回投与を行った。FSH投与後48時間目及び56時間目に黄体退化作用のあるクロプロステノール製剤（クロプロメイトーC、住友化学、以下PGF_{2α}）0.75mg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5日目の夕方及び6日目の朝に行った。

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、正常胚についてはさらに品質の良い順にA、B及びCの3段階⁶⁾に分類した。

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以上の大卵胞数を数えた。

Day	-7	...	1	2	3	4	5	6	...	12
30AU区	AM (CIDR挿入)		FSH 30AU +ゲル 5ml		PGF _{2α} 0.75mg (CIDR 抜去)			人工授精		採卵
	PM				PGF _{2α} 0.75mg		人工授精			
25AU区	AM (CIDR挿入)		FSH 25AU +ゲル 5ml		PGF _{2α} 0.75mg (CIDR 抜去)			人工授精		採卵
	PM				PGF _{2α} 0.75mg		人工授精			

図1 過剰排卵誘起スケジュール(試験1)

Day	-7	...	1	2	3	4	5	6	...	12
試作ゲル区	AM (CIDR挿入)		FSH 25AU +ゲル 5ml		PGF _{2α} 0.75mg (CIDR 抜去)			人工授精		採卵
	PM				PGF _{2α} 0.75mg		人工授精			
漸減投与区	AM (CIDR挿入)		FSH 5AU	FSH 3AU	FSH 2AU PGF _{2α} 0.75mg (CIDR 抜去)			人工授精		採卵
	PM		FSH 5AU	FSH 3AU	FSH 2AU PGF _{2α} 0.75mg		人工授精			

図2 過剰排卵誘起スケジュール(試験2)

試験 2 試作ゲルを用いたワンショット法の検討

1. 試験区分および供試牛

試験区として、ワンショット法で川崎三鷹製薬株式会社で新たに開発された試作アルミニウムゲルを用いる区（試作ゲル区）とFSH20AUを漸減投与する区（漸減投与区）を設定した。当所繁養の黒毛和種経産牛8頭を供試して1頭につき両区の処理を1回ずつ行った。

2. 試験期間

平成18年6月～平成19年2月に試験を実施した。

3. 試験方法

1) 薬剤調整

試作ゲル区ではゲル以外は試験1の25AU区と同様に行った。漸減投与区では、FSH製剤10AUあたり生理食塩水5mlで溶解して用いた。

2) 過剰排卵処理

各試験区の過剰排卵処理スケジュールを図2に示した。

3) 人工授精、採卵及び処理、卵巢の反応観察

これらの項目については、試験1と同様に行った。

結 果

試験1の採卵成績について表1に、また採取された卵の品質を表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
30AU区	15	13	7.0±4.8	1.7±1.0	5.2±4.7	3.5±4.2
25AU区	13	11	7.2±6.4	1.0±0.8	5.8±6.0	4.8±5.4

平均±標準偏差

表2 回収卵の品質

試験区	回収卵数	同一品質内a-b間に有意差あり(p<0.05)				
		回収卵数に占める割合(%)				
		A	B	C	変性胚	未受精卵
30AU区	78	33.3 ^a	20.5	12.8 ^a	19.2 ^a	14.1
25AU区	76	51.3 ^b	28.9	1.3 ^b	5.3 ^b	13.2

採卵成功頭数は30AU区で15頭中13頭、25AU区では13頭中11頭であった。

採卵時の黄体数と大卵胞数は、両区間に差は認められなかった。また、回収卵数と正常胚数についても両区間に差は認められなかった。しかし、回収卵の品質については25AU区の方がより良い成績であった。

試験2における採卵成績については、表3及び表4に示した。

表3 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
試作ゲル区	8	8	7.9±6.6	3.6±4.8	6.1±5.8	4.5±4.4
漸減投与区	8	8	9.4±6.3	5.1±5.4	6.0±3.5	2.6±3.0

平均±標準偏差

表4 回収卵の品質

試験区	回収卵数	a-b間に有意差あり(p<0.05)				
		回収卵数に占める割合(%)				
		A	B	C	変性胚	未受精卵
試作ゲル区	49	24.5	40.8 ^a	8.2	18.4	8.2
漸減投与区	48	12.5	18.8 ^b	12.5	35.4	20.8

両区ともに8頭の全頭から卵の回収が出来た。

採卵時の黄体数と大卵胞数については両区間に差は認められなかった。また、回収卵数と正常胚数も両区間に差は認められなかったが、回収卵の品質については試作ゲル区の方がより良い傾向があった。

考 察

黒毛和種における水酸化アルミニウムゲルを利用したワンショット法による過剰排卵処理については、Kimuraら⁴⁾及び磯崎ら³⁾はFSHを30AU投与することにより良好な採卵成績が得られたことを報告している。我々も同様な成績を報告している。しかし我々が行ったFSH30AUのワンショット法ではFSH20AUの漸減投与法に比べて卵巢内に大卵胞がより多く残存している傾向が見られた。阪田ら⁵⁾は、残存卵胞数はFSHの投与量を少なくするほど減少する傾向が見られたと報告する。一方、水酸化アルミニウムゲルではなくポリビニルピロリドンを用いた方法では、FSH量は20AUでは不足し採卵成績が低下したとの報告^{5) 7)}もある。そこで今回のFSH投与量を25AUとしたが、採卵成績は30AUで行った場合と遜色なく、黒毛和種における水酸化アルミニウムゲルを用いたワンショット法では、FSHの投与量を25AUまで減量することが可能であることが示唆された。

ホルモン量の減量は利用者にとってコスト面で有利であるので、推奨する投与量を決めるにはさらに検討が必要があると考ええる。一方、現在利用できるFSH製剤は10AU単位のアンプルで用意されているため、製剤の新たな単位量での供給が望まれる。

試作ゲルを使用したワンショット法の採卵成績は、漸減投与の成績に匹敵し、従来のゲルを用いたワンショット法の成績とも同等であった。このことから今回使用した試作ゲルは従来の水酸化アルミニウムゲルに代わりうるゲルとして実用化できることが示された。

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) 林 登・加藤誠二・坂口慎一・沢田幹夫・関 誠・竹内昭司・木村康二・角川博哉, 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－. 岐阜県畜産研究所研究報告, 5: 30-34. (2004)
- 2) 市野清博・松岡一仁・阪田昭次・伊藤 智・嶋屋佳子・樫原孝正, 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) 磯崎良寛・稲田 淳・浅田研一・古賀鉄也・木村康二・角川博哉・平子 誠, 黒毛和種雌牛における卵胞刺激ホルモン皮下1回投与による過剰排卵誘起法－第1報 水酸化アルミニウムゲル吸着卵胞刺激ホルモン投与牛における血漿中卵胞刺激ホルモン濃度の推移および過剰排卵誘起効果－. 福岡県農業総合試験場研究報告, 26: 61-64. (2007)
- 4) Kimura K., Horako M., Iwata H., Aoki M., Kawaguchi M., Seki M., Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. Theriogenology 68:633-639. (2007)
- 5) 阪田昭次・松岡一仁・藤山 繁・藤井陽一, 牛の胚移植に関する研究(第4報)－過剰排卵処理に用いるFSH投与量と製剤について－. 山口県畜産試験場研究報告, 13:23-28. (1997)
- 6) (社)日本家畜人工授精師協会, 家畜人工授精講習会テキスト(家畜受精卵移植編). 172-176. (2001)
- 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)

Superovulation induced by one-shot administration of FSH in
aluminum hydroxide gel in Japanese Black Cattle
(2nd report ; dosage of FSH and use of newly-developed gel)

Noboru HAYASHI, Youichiro HOSHINO, Seiji KATO, Shinichi SAKAGUCHI, Kenzo MISHINA,
Makoto SEKI, Syoji Takeuchi, Hiroya KADOKAWA, Koji KIMURA

Abstract

In the present study, we tried to determine a recommended dosage of FSH in one-shot administration of FSH in aluminum hydroxide gel in Japanese Black Cattle and to use newly-developed gel as a substitute for the gel.

In experiment 1, 30AU and 25AU FSH were administered to 15 and 13 Japanese Black Cattle, respectively, by one intramuscular injection (one-shot 30AU FSH and one-shot 25AU FSH). The hormone was used as a mixture with 5ml aluminum hydroxide gel (3mg/ml).

In experiment 2, FSH was administered to 8 Japanese Black Cattle by one-shot 25AU FSH used newly-developed gel (Kawasaki Mitaka Pharmaceutical Co., Ltd.) and repeated intramuscular administrations (repeated FSH), and their effects were compared. For repeated FSH, the hormone dissolved in saline was used in decreasing doses (5,5,3,3,2 and 2, 20AU in total) twice a day (morning and evening) for three days.

PGF_{2α} analogue (750μg) was administered 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. 7days after the artificial insemination embryos were collected, and corpora lutea and large ovarian follicles were examined.

In experiment 1, corpora lutea, large ovarian follicles, collected embryos and transferable embryos counted 7.0 ± 4.8 (mean $\pm$ S.D), 1.7 ± 1.0 , 5.2 ± 4.7 and 3.5 ± 4.2 in number per cow in one-shot 30AU FSH, and 7.2 ± 6.4 , 1.0 ± 0.8 , 5.8 ± 6.0 and 4.8 ± 5.4 in one-shot 25AU FSH. There was no significant difference between the means in any of the examined items. Collected embryos were better in quality in one-shot 25AU FSH than in one-shot 30AU FSH.

In experiment 2, Corpora lutea, large ovarian follicles, collected embryos and transferable embryos counted 7.9 ± 6.6 , 3.6 ± 4.8 , 6.1 ± 5.8 and 4.5 ± 4.4 in one-shot FSH, and 9.4 ± 6.3 , 5.1 ± 5.4 , 6.0 ± 3.5 and 2.6 ± 3.0 in repeated FSH. There was no significant difference between the means in any of the examined items. Collected embryos were better in quality in one-shot FSH than in repeated FSH.

These results suggest that we can reduce the dose of FSH to 25AU in one-shot administration of FSH for superovulation treatment of Japanese Black Cattle, and newly-developed gel can be used as a substitute for conventional aluminum hydroxide gel.

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