

# 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

磯崎良寛\*・稲田 淳・浅田研一・古賀鉄也<sup>1)</sup>・木村康二<sup>2)</sup>・角川博哉<sup>3)</sup>・平子 誠<sup>4)</sup>

現行の牛過剰排卵誘起 (SOV) においては、豚由来卵胞刺激ホルモン (FSH-P) を数日間にわたり多回投与する必要があり、作業や牛の負担が大きい。そこで、高分子吸着・徐放能を有する水酸化アルミニウムゲル (AG) に吸着させた FSH-P 1 回投与 (ワンショット) による SOV 効果について検討した。

30AU (アーマー単位) の FSH-P を AG に吸着 (最終アルミニウム濃度: 1.3mg/ml) させた後に黒毛和種雌牛の皮下に投与し、その 2 日後にプロスタグランジン F<sub>2α</sub> 類縁体製剤を投与することによりワンショット SOV を実施した。血漿中 FSH-P 濃度の推移および胚採取成績について、20AU の FSH-P を 3 日間朝夕漸減投与した群と比較した。FSH-P をワンショットすることにより、漸減投与の場合と同様に 72 時間以上血漿中 FSH-P 濃度が高値を維持し、複数の卵胞が発育した。ワンショットおよび漸減投与により SOV を実施した場合の胚採取総数は、12.0 および 8.2 個/頭 とワンショットの方が有意 (P<0.05) に多く、正常胚採取数については、7.8 および 5.8 個/頭とワンショットの方が多い傾向にあった。

本研究の結果より、FSH-P を AG に吸着させて牛皮下に 1 回投与することにより、3 日間朝夕漸減投与と同等の過剰排卵誘起効果が得られることが明らかとなった。

[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, 卵胞刺激ホルモン, ワンショット]

Superovulation in Japanese Black Cow by a Single Subcutaneous Administration of FSH. (1) Changes in Concentration of Porcine FSH in Plasma and Superovulatory Response Following a Single Subcutaneous Administration of Porcine FSH with Aluminum Hydroxide Gel Suspension. ISOZAKI Yoshihiro, Sunao INADA, Kenichi ASADA, Tetsuya KOGA, Koji KIMURA, Hiroya KADOKAWA and Makoto HIRAKO. (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 26:61-64 (2007)

In cattle, conventional superovulation is induced by multiple administrations of follicular stimulating hormone (FSH) for 3-4 days, which is labor-consuming and giving stress to cows. This study was conducted to evaluate the superovulatory effects of a single subcutaneous administration of porcine FSH (FSH-P) with aluminum hydroxide gel suspension (AG) in Japanese Black Cow. FSH-P concentrations in plasma increased following a single subcutaneous administration of FSH-P (30AU) with AG containing 1.3mg/ml aluminum, and were maintained at relatively high levels for 72 hours after the administration. These changes FSH-P concentrations in plasma after the administration were almost the same with those following multiple administrations of FSH-P (20AU) for 3 days. The number of embryos recovered from the cattle superovulated by a single FSH-P administration was significantly more (P<0.05) than that by multiple FSH-P administrations. Furthermore, the number of transferable embryos at the single FSH-P administration was almost the same or more, compared with that at the multiple FSH-P administrations. These results suggest that a single subcutaneous administration of FSH-P with AG induces a superovulatory response in Japanese Black Cow.

[Key words: Japanese Black Cow, superovulation, Aluminum hydroxide gel, FSH, single administration, embryo recovery]

### 緒 言

胚移植技術により牛の改良を促進するためには、優秀な牛から過剰排卵誘起 (SOV) 人工授精・胚採取により、できるだけ多くの体内受精胚を生産する必要がある。

SOV では血液中の卵胞刺激ホルモン濃度を一定期間高

値に保持する必要があり、現行の豚由来卵胞刺激ホルモン (FSH-P) は効果の持続時間が短い<sup>1)</sup> ため、3~4 日間連続で 1 日 2 回投与する必要がある。この FSH-P 連続投与は、作業が繁雑であるとともに、牛にも大きなストレスとなっている。これまで、高分子ポリマーであるポリビニルピロリドン (PVP) に FSH-P を混合して牛に投与することにより、1 回の投与で SOV が可能<sup>7, 8)</sup> であることが報告されている。しかし、PVP は粘稠性が非常に高いために FSH-P の混合が困難である等の問題があり、実用化には至っていない。

水酸化アルミニウムゲル (AG) は、蛋白質等の高分子を吸着して生体内で徐々に放出する徐放能を有しており、ワクチンのアジュバントや薬剤の賦形剤として利用され

\*連絡責任者 (家畜部)

- 1) 現福岡県筑後家畜保健衛生所
- 2) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所
- 3) 現山口大学農学部獣医学科
- 4) 現独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

ている。AGは粘性が低いために取り扱いが容易であり、FSH-PをAG溶液に混合することにより、AGにFSH-Pが吸着される。Hirakoら<sup>2)</sup>、木村ら<sup>4)</sup>は、徐放能を有するAGにFSH-Pを吸着させて牛筋肉内に1回投与することにより、SOV効果が得られたことを報告している。この技術が実用化されることにより、SOVの省力化および処理牛のストレス軽減が図られるが、投与部位の違い等がSOV効果に及ぼす影響については不明である。そこで本研究では、筋肉内投与より体内吸収が緩やかな牛皮下にAGに吸着させたFSH-Pを1回投与(ワンショット)することが、牛の血漿中FSH-P濃度推移およびSOV効果に及ぼす影響について検討した。

### 材料および方法

#### 試験1 AG吸着FSH-Pを皮下1回投与した牛の血漿中FSH-P濃度推移

##### 1 供試牛

当場繋養の黒毛和種雌牛4頭(年齢:3.7~6.8歳,初産分娩後6~12回のSOVを実施,供試前3回の平均正常胚採取数:3.0~5.3/回)を供試した。

##### 2 試験区設定および試験方法

SOVは発情後9~13日目から開始し、SOVの方法により、漸減投与区およびワンショット区の2区を設定した。

漸減投与区では、合計20AU(アーマー単位)のFSH-Pを3日間朝夕漸減法(5,5,3,3,2,2AU)により皮下投与し、初回投与から48時間後にプロスタグランジンF<sub>2α</sub>類縁体製剤(PG)としてクロプロステノール750μgを筋肉内投与した。PG投与の56時間後に性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH;酢酸フェルチレリンとして200μg)を筋肉内投与し、PG投与の56および72時間後に直腸膣法により人工授精を実施した。

本試験では、アルミニウム濃度が1.6mg/mlになるように川崎三鷹製薬が調製したAG試作品を、FSH-Pの徐放剤として使用した。ワンショット区におけるFSH-Pの投与量は、既報<sup>2),4)</sup>と同様に30AUとした。ワンショット区では、30AUのFSH-Pを2.5mlの生理食塩水に溶解した後、10mlのAGと混和したもの(最終アルミニウム濃度:1.3mg/ml)を皮下投与し、56時間後に漸減投与区と同量のPGを投与した。PG投与の48時間後に漸減投与区と同量のGnRHを投与し、PG投与の48および64時間後に人工授精を実施した。

SOV成績の個体差の影響を少なくするため、4~7カ月の間に供試牛3頭を2試験区で反転実施した。また、5mlの生理食塩水に溶解したFSH-P30AUを皮下投与した対照牛1頭を設定し、血漿中FSH-P濃度推移を試験牛と比較した。

##### 3 調査項目

FSH-P投与開始前および投与の10分~80時間後において、血液を経時的に採取して遠心分離(4℃,3000回転/分,30分)により血漿を分離し、-40℃以下で凍結保存した。漸減投与区において、血液採取とFSH-P投与が重複する場合には、FSH-P投与前に血液を採取した。血漿中FSH-P濃度は、独立行政法人畜産草地研究所におい

て、放射免疫測定法により測定した。

#### 試験2 AG吸着FSH-Pを皮下1回投与した牛のSOV効果

##### 1 供試牛

当場繋養の黒毛和種雌牛5頭(年齢:2.4~7.1歳,初産分娩後0~12回のSOVを実施,供試前3回の平均正常胚採取数:1.7~3.7/回)を供試した。

##### 2 試験区設定および試験方法

試験1と同様に、漸減投与区およびワンショット区の2区を設定した。漸減投与区のFSH-P投与方法は、試験1と同様とした。また、ワンショット区では30AUのFSH-Pを1mlの生理食塩水に溶解した後、4mlのAGと混和したもの(最終アルミニウム濃度:1.3mg/ml)を皮下投与した。PGは、FSH-P投与開始から48時間後に試験1と同量を筋肉内投与した。GnRH投与および人工授精方法は両試験区とも既報<sup>3)</sup>と同様にPG投与の48時間後にGnRH(試験1と同量)を投与し、PG投与の56時間後に人工授精を実施した。SOV成績の個体差の影響を少なくするため、3~11カ月の間に漸減投与区→ワンショット区の順番で反転実施した。

##### 3 調査項目

###### (1) 卵巣反応

SOV開始時およびSOVにより誘起された発情時におけるサイズ別卵胞数について、超音波診断装置(5MHz経膣コンバックスプローブ)を用いて調査した。卵胞サイズについては、直径により大:10mm以上,中:5mm以上10mm未満,小:5mm未満に分類した。

###### (2) 胚採取成績

SOVにより誘起された発情の7日後に、頸管經由子宮灌流法により胚を採取し、正常胚数,変性胚数および未受精卵数を調査した。各採取数についてはt検定を、正常胚,変性胚,未受精卵の割合については $\chi^2$ 検定を用いて解析した。

### 結果および考察

#### 試験1 AG吸着FSH-Pを皮下1回投与した牛の血漿中FSH-P濃度推移

供試牛3頭(123,131,134号)および対照牛(139号)の血漿中FSH-P濃度の推移を第1図に示した。

123号牛では、漸減投与区における血漿中FSH-P濃度の変動が大きく、投与の際に一部が筋肉内投与になったことが推察されたため、データを除外した。ワンショット区では、SOV開始の4時間後から血漿FSH-P濃度が上昇して、80時間後まで高値(本報告では、FSH-P濃度が0より高い場合を「高値」とする。)が持続していた。

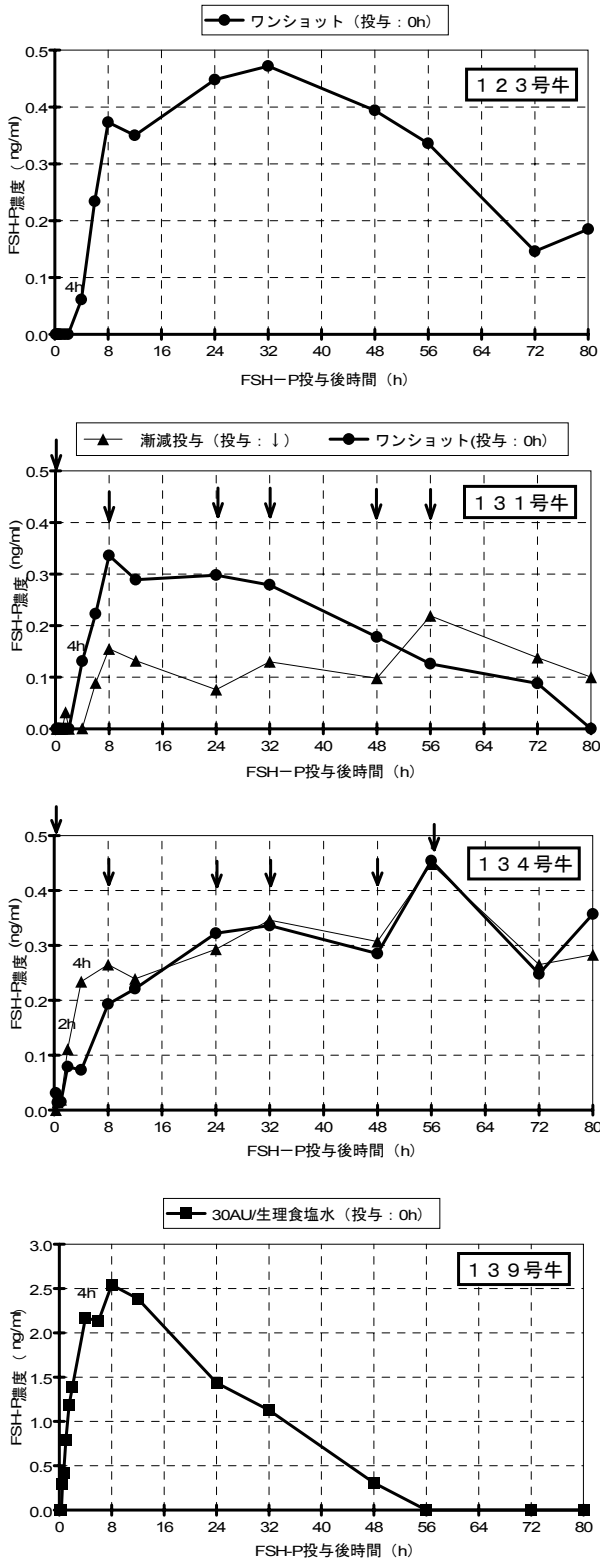
131号牛では、漸減投与区における血漿中FSH-P濃度がSOV開始6時間後から上昇して、80時間後まで高値を持続したが、ワンショット区ではSOV開始の4時間後から上昇して、72時間後まで高値が持続していた。

134号牛の血漿中FSH-P濃度は、漸減投与区およびワンショット区ともにほぼ同様に推移し、SOV開始2時間後から上昇して、80時間後まで高値が持続していた。

以上の結果から、FSH-PをAGに吸着させて牛皮下に

1回投与することにより、血漿中 FSH-P 濃度が3日間朝夕漸減投与法の場合と同様に推移することが判明した。

30AU の FSH-P を生理食塩水に溶解して皮下に1回投与した139号牛では、血漿中 FSH-P 濃度が投与直後から上昇して8時間後に非常に高い濃度(2.5ng/ml)に達し、



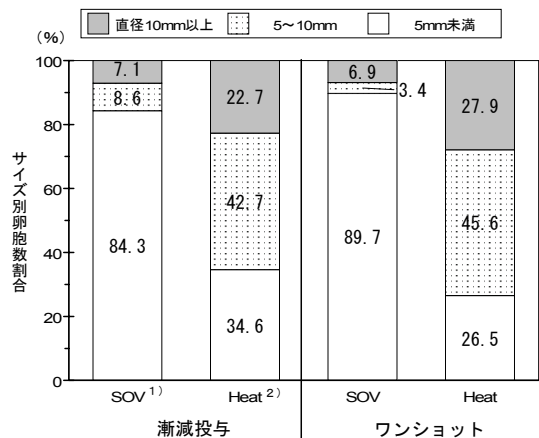
第1図 FSH-P 投与後の血漿中 FSH-P 濃度推移

その後急速に低下して56時間後に基底値(0ng/ml)となった。一方、ワンショット区における FSH-P 濃度は、ピークの状態が長時間持続して SOV 開始 72 時間後以降まで血漿中 FSH-P 濃度が高値を維持していた。

AG と FSH-P を混合すると電氣的結合により FSH-P が AG に吸着され、その混合物を牛に投与すると、体液中の血清アルブミンと FSH-P が置換されることにより、徐々に FSH-P が血液中に放出される<sup>5)</sup>。本試験におけるワンショット区の血漿中 FSH-P 濃度推移から、今回使用した AG についても、このような FSH-P 徐放能が発揮されていたことが推察された。

Hirako ら<sup>2)</sup> は、5ml の AG に 30AU の FSH-P を吸着させて黒毛和種雌牛の筋肉内に投与すると、投与後1時間以降に血漿中 FSH-P 濃度が上昇して12時間後にピークに達した後に低下傾向となり、72時間後に基底値に戻ったと報告している。本報告におけるワンショット区の血漿中 FSH-P 濃度推移は、Hirako ら<sup>2)</sup> の報告に比べて投与後の濃度上昇が緩やかでピークが長く、SOV 開始 72 時間後以降でも高値が持続していた。このことから、AG に吸着させた FSH-P を牛皮下にワンショットすることにより、血漿中 FSH-P 濃度は筋肉内投与の場合より緩やかに上昇・低下するものと推察された。

Hirako ら<sup>2)</sup> は、20AU および 30AU の FSH-P を AG に吸着させて筋肉内に投与した黒毛和種雌牛の血漿中 FSH-P 濃度の推移について比較した結果、30AU 投与時の最高値は 20AU の 1.5 倍であり、30AU 投与牛は 20AU 投与牛より高い FSH-P 濃度で推移したと報告している。この結果を受けて木村ら<sup>4)</sup> は、30AU の FSH-P を AG に吸着させて黒毛和種雌牛の筋肉内に投与することにより、漸減投与と同様の SOV 効果があったと報告している。これらの報告と同様に、本報告においてもワンショット区の FSH-P 投与量を 30AU と設定したが、その血漿中 FSH-P 濃度推移は 20AU (当場における漸減投与時の慣行投与量) を漸減投与した場合と同様に推移していた。このことから、AG を用いたワンショット SOV における FSH-P 投与量は、30AU が適当であると考えられた。



第2図 処理開始時および発情時のサイズ卵胞割合 (試験2)

- 1) 過剰排卵誘起開始時
- 2) 発情時

第 1 表 FSH-P 投与方法の違いが胚採取成績に及ぼす影響 (試験 2)

FSH 投与	sn <sup>2)</sup>	採取総数	正常胚数 (%) <sup>3)</sup>	変性胚数 (%)	未受精卵数 (%)
漸減投与	5	8.2 <sup>a</sup> ± 1.97	5.8 ± 1.45 (70.7)	1.2 ± 0.52 (14.6 <sup>c</sup> )	1.2 ± 1.07 (14.6 <sup>c</sup> )
ワンショット	5	12.0 <sup>b</sup> ± 2.10	7.8 ± 1.15 (65.0)	0.6 ± 0.36 (5.0 <sup>d</sup> )	3.6 ± 1.51 (30.0 <sup>d</sup> )

- 1) 表記値は、平均 ± 標準誤差
- 2) 供試頭数 (同一供試牛 5 頭を反転実施)
- 3) 割合 (%) は、採取総数に対する割合
- 4) a, b: 同列異符号間に有意差あり (t 検定, p<0.05)
- 5) c, d: 同列異符号間に有意差あり ( $\chi^2$  検定, p<0.05)

### 試験 2 AG 吸着 FSH-P を皮下 1 回投与した牛の SOV 効果

試験 2 における SOV 開始時および発情時におけるサイズ別卵割割合を第 2 図に示した。SOV 開始時には漸減投与区およびワンショット区の総卵胞数は 14.0 および 17.4 個/頭で、両区とも 84% 以上が小卵胞であった。一方、SOV で誘起された発情時の総卵胞数は 25.3 および 27.2 個/頭で、中卵胞: 42.7 および 45.6%, 大卵胞: 22.7 および 27.9% となっており、両区において SOV により複数の卵胞が同様に発育したことが確認された。

試験 2 における胚採取成績を第 1 表に示した。漸減投与区およびワンショット区における胚採取総数は 8.2 および 12.0 個/頭であり、ワンショット区が漸減投与区より有意に多かった (P<0.05)。正常胚数については、5.8 および 7.8 個/頭とワンショット区が多い傾向にあったが、有意差は認められなかった。漸減投与区の変性胚数はワンショット区より多い傾向にあり、変性胚率は有意に高かった (p<0.05)。また、未受精卵数は、漸減投与区がワンショット区より少ない傾向にあり、未受精卵率は有意に低かった (p<0.05)。以上の結果から、ワンショット区においても、漸減投与区と同等の胚採取成績が得られることが判明した。

木村ら<sup>4)</sup>は、3.2mg/ml のアルミニウムを含む AG に 30AU の FSH-P を吸着させて黒毛和種雌牛の筋肉内ワンショットにより、漸減投与と同様の SOV 効果があったと報告している。また、田川ら<sup>6)</sup>は、3.0mg/ml のアルミニウムを含む AG に 40AU の FSH-P を吸着させてホルスタイン種乾乳牛の筋肉内ワンショットにより、SOV 効果があったと報告している。本報告では、1.3mg/ml のアルミニウムを含む AG に 30AU の FSH-P を吸着させて皮下ワンショットによる SOV 効果が実証され、筋肉内より体内吸収が緩やかな皮下に投与することにより、既報<sup>4), 8)</sup>よりアルミニウム濃度が低い AG を使用してもワンショット SOV 効果があることが示唆された。本報告においては、1 種類の AG 濃度によるワンショット SOV しか調査していないため、皮下投与時における AG 濃度がワンショット SOV 効果に及ぼす影響は解明されておらず、今後の検討が必要である。

本研究の結果より、FSH-P を AG に吸着させて牛皮下に 1 回投与することにより、3 日間朝夕漸減投与と同等

の SOV 効果が得られることが明らかとなった。AG を利用したワンショット過剰排卵誘起法は非常に省力的で牛に対するストレスも軽減できる技術であり、今後実用化に向けた技術の確立が期待される。

### 引用文献

- 1) Demoustier, N.M., Beckers, J.F., Van Der Zwalmen, P., Closset, J., Gillard, J.L., and F. Ectors (1988) Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology* 30: 379-386.
- 2) Hirako, M., Takahashi, H., and K. Kimura (2003) Change in concentration of porcine FSH in bovine peripheral blood following a single intramuscular injection with aluminum hydroxide gel suspension. *Theriogenology* 59: 526.
- 3) 磯崎良寛・古賀鉄也・稲田淳 (2006) 性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤による黒毛和種牛過剰排卵処理後の人工授精回数低減. 福岡農総試研報 25: 121-124.
- 4) 木村康二・平子誠・岩田尚孝・青木真理・高橋ひとみ (2004) 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.
- 5) 木村康二 (2004) 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.
- 6) 田川真人・的場理子・今井敬・木村康二・角川博哉・米内美晴 (2006) 乳用牛におけるワンショット過剰排卵処理法の検討. 日本畜産学会第 106 回大会講演要旨: 92.
- 7) Takedomi, T., Aoyagi, Y., Konishi, M., Kishi, H., Taya, K., Watanabe, G., and S. Sasamoto (1995) Superovulation of holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 43: 1259-1268.
- 8) Yamamoto, M., Ooe, M., Kawaguchi, M., and T. Suzuki (1994) Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 41: 747-755.