

## デヒドロエピアンドロステロンを用いた牛体内受精卵採取成績向上に関する研究

飯盛和也・藤原謙一郎<sup>1)</sup>・鹿島悠幹<sup>2)</sup>・山口大輔<sup>3)</sup>・大浦俊彦<sup>4)</sup>・白谷浩之<sup>5)</sup>

1) 現：茨城県鹿行家畜保健衛生所 2) 現：茨城県庁畜産課 3) 現：茨城県県北家畜保健衛生所

4) 現：茨城県畜産センター肉用牛研究所・5) 現：茨城県県央農林事務所

Research on the improvement of bovine embryo collection performance using dehydroepiandrosterone

Kazuya ISAGARI, Kenichiro FUJIWARA, Yuki KASHIMA, Daisuke YAMAGUCHI, Toshihiko OURA, Hiroyuki SHIRATANI

### 要 約

本県では銘柄和牛である「常陸牛」の生産拡大や受胎率向上対策として受精卵移植が行われており、黒毛和種受精卵の需要が高まっている。一方、ウシの体内受精卵採取においては成績不良な個体への対策が求められている。そこで本研究では、ヒトの生殖補助医療分野で利用されている DHEA に着目し、効率的な体内受精卵採取方法を確立することを目的とした。血中 DHEA および DHEA-S 濃度と体内受精卵採取成績との関連性を解析した結果、血中 DHEA 濃度と A・A'・B ランク卵率との間に弱い正の相関がみられた。また、DHEA-S 製剤投与が体内受精卵採取成績に及ぼす影響を解析した結果、平均採取卵数は DHEA-S 製剤を投与することによって、有意に増加することが明らかとなり、平均受精卵数および平均正常卵数は有意な差がみられなかったものの、増加する傾向がみられた。これらの結果より、血中 DHEA 濃度は体内受精卵採取成績の指標となる可能性が示唆され、DHEA-S 製剤の投与により、体内受精卵採取成績が向上することが明らかとなった。

キーワード：黒毛和種、体内受精卵採取、DHEA、DHEA-S

### 緒 言

本県では銘柄和牛である「常陸牛」のブランド力向上のため、品質向上とともに、優良繁殖雌牛の増頭および肥育素牛の生産拡大が求められている。また、本県の人工授精の初回受胎率は平成 26 年から平成 29 年の 4 年間で、肉用種では 57.0%から 47.3%に、乳用種では 57.0%から 49.3%に低下している<sup>1, 2)</sup>。これらの理由により、乳用種や交雑種の借り腹を利用した効率的な黒毛和種子牛生産および受胎率向上対策として、受精卵移植が行われている。一方で、ウシの体内受精卵採取において、採取卵数および正常卵数に個体差があるため<sup>3)</sup>、効率的な体内受精卵採取方法が求められている。また、当センター繫養の黒毛和種繁殖雌牛の体内受精卵採取成績を解析した結果では、回数を重ねるごとに採取卵数が減少することが明らかになっていることから<sup>4)</sup>、採取卵数が低下している個体への対策が求められている。

デヒドロエピアンドロステロン (DHEA : dehydroepiandrosterone) は性ホルモンであるアンドロゲンやエストロゲンの前駆物質であり、その硫酸抱合体で相互変換し得るデヒドロエピアンドロステロン

サルフェート (DHEA-S : dehydroepiandrosterone-sulfate) と合わせて体内で最も多く存在するステロイドホルモンであり、主に副腎皮質網状帯で合成される<sup>5)</sup>。ヒトの血中 DHEA-S 濃度は年齢とともに減少し<sup>6)</sup>、20 歳から 30 歳の女性において、血中 DHEA-S 濃度が低い女性は通常又は高い女性と比較すると、卵巣機能不全になるリスクが高いという報告がある<sup>7)</sup>。また、ヒトの生殖補助医療分野では、過剰排卵処理に対する卵巣の反応性が低下した患者に DHEA を投与することで、採取卵数が増加し、受精卵の品質も向上することが報告されている<sup>8)</sup>。しかしながら、ウシでは DHEA に関する報告が少なく、その効果や利用方法は明らかになっていない。

そこで本研究では、黒毛和種繁殖雌牛の血中 DHEA および DHEA-S 濃度と体内受精卵採取成績との関連性を解析することで、血中 DHEA および DHEA-S 濃度が体内受精卵採取成績の指標となるか明らかにすることを目的とした。また、DHEA-S 製剤の投与により体内受精卵採取成績を向上させる方法を明らかにし、効率的な体内受精卵採取方法を確立することを目的とした。

## 材料および方法

### 1 黒毛和種繁殖雌牛の発情周期中および過剰排卵処理中の血中 DHEA および DHEA-S 濃度動態の解明

#### 1) 供試牛

発情周期中および過剰排卵処理中にある、当センター繋養の黒毛和種繁殖雌牛を各 3 頭ずつ供試した。

#### 2) 方法

##### (1) 採血

##### ① 発情周期中

スタンディング発情日を 0 日とし、21 日後の次回発情日まで 6 ステージ (発情後期、黄体前期、黄体開花期、黄体退行期、発情前期、発情日) で頸部静脈内採血を行った。

##### ② 過剰排卵処理中

膣内留置型黄体ホルモン製剤 (CIDR : Controlled Internal Drug Release) 挿入日を 0 日とし、21 日後の体内受精卵採取日まで 5 ステージ (CIDR 挿入、FSH 投与開始、CIDR 除去 + PGF<sub>2α</sub> 投与、人工授精、体内受精卵採取) で頸部静脈内採血を行った。

なお、分析には血清が用いられることから、採材された血液は速やかに真空採血管に分注後、遠心分離 (3000rpm、10 分、25°C) した。血清については測定まで -20°C で冷凍保存した。

##### (2) 血中 DHEA および DHEA-S 濃度の測定

(株) あすか製薬メディカルに依頼し、液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析法 (LC-MS/MS 法) により、血中 DHEA および DHEA-S 濃度の測定を行い、発情周期中および過剰排卵処理中の血中動態の確認を行った。

### 2 黒毛和種繁殖雌牛における血中 DHEA および DHEA-S 濃度と体内受精卵採取成績との関連性の解明

#### 1) 供試牛

当センターおよび県内農家が繋養する延べ 61 頭の黒毛和種繁殖雌牛を供試した。

#### 2) 方法

##### (1) 過剰排卵処理および人工授精

過剰排卵処理 (SOV : Super-Ovulation) は、発情日以外の任意の時期に CIDR を挿入した日またはスタンディング発情日を 0 日とし、その後 9~13 日目より卵胞刺激ホルモン (FSH : Follicle Stimulating Hormone) 18~24AU を 3 日間、朝夕漸減的に筋肉内投与することにより実施した。プロ

スタグランジン F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub> : ProstaglandinF<sub>2α</sub>) を SOV 開始 3 日目に朝 20 mg・夕 15 mg 筋肉内投与し、最初の PGF<sub>2α</sub> 投与時に CIDR を抜き取った。SOV 開始 4 日目の夕に性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤 (GnRH : Gonadotropin releasing hormone) を投与し、5 日目の夕に人工授精を行った。

##### (2) 体内受精卵採取および受精卵の品質判定

体内受精卵採取は、人工授精後 6.5 日目に左右の子宮角を計 1L のエンブリオテックで洗浄還流させる方法で実施した。採取した体内受精卵の品質判定は、実体顕微鏡下で観察し、家畜人工授精テキスト<sup>9)</sup>に基づき、可視域の細胞変性率が 0% のものを excellent (A ランク)、15% 以下のものを good (A' ランク)、50% 以下のものを fair (B ランク)、75% 以下のものを poor (C ランク)、著しく発育の遅れているもの、変性度合が著しいものおよび未分割のものをランク外とした。

##### (3) 採血

体内受精卵採取直後に頸部静脈内採血を行った。採材された血液については、1 2) (1) と同様の手法にて測定まで保存した。

##### (4) 血中 DHEA および DHEA-S 濃度の測定

(株) あすか製薬メディカルに依頼し、LC-MS/MS 法により、血中 DHEA および DHEA-S 濃度の測定を行った。

### 3) 解析項目

採取卵数、受精卵数、正常卵数 (A・A'・B・C ランク卵数)、正常卵率 (正常卵数/採取卵数×100)、A・A' ランク卵数、B ランク卵数、C ランク卵数、A・A'・B ランク卵率 (A・A'・B ランク卵数/採取卵数×100)、ランク外卵数の 9 項目とし、血中 DHEA および DHEA-S 濃度との関連性を解析した。

### 4) 統計処理

体内受精卵採取成績と血中 DHEA および DHEA-S 濃度との相関は、連続変数の相関係数の検定 (Spearman の順位相関係数) にて行った。統計ソフトは EZR version 1.36 を使用した。

### 3 黒毛和種繁殖雌牛への DHEA-S 製剤投与後の血中 DHEA および DHEA-S 濃度動態の解明

#### 1) 供試牛

当センター繋養の黒毛和種繁殖雌牛を頸部静脈内投与区および頸部皮下投与区で各 1 頭ずつ供試した。

#### 2) 方法

##### (1) DHEA-S 製剤の投与

発情日以外の任意の時期に DHEA-S 製剤 (レボス

パ、サンファーマ(株)) 200 mg/注射用水 20ml を頸部静脈内および頸部皮下に投与した。

## (2) 採血

DHEA-S 製剤投与時を 0 時間とし、頸部静脈内投与区では 24 時間後まで、頸部皮下投与区では 96 時間後まで経時的に頸部静脈内採血を行った。採材された血液については、1) 2) (1)と同様の手法にて測定まで保存した。

## (3) 血中 DHEA および DHEA-S 濃度の測定

(株) あすか製薬メディカルに依頼し、LC-MS/MS 法により、血中 DHEA および DHEA-S 濃度の測定を行い、DHEA-S 製剤の頸部静脈内投与区および頸部皮下投与区の血中 DHEA および DHEA-S 濃度動態の比較を行った。

## 4 黒毛和種繁殖雌牛への DHEA-S 製剤投与が体内受精卵採取成績に及ぼす影響の解明

### 1) 供試牛

当センター繋養の黒毛和種繁殖雌牛のうち、直近 2 回の体内受精卵採取成績の正常卵数の平均値が 3.0 個以下のものを 5 頭選定し、供試した。DHEA-S 製剤投与後の体内受精卵採取試験は同一牛で 2 回繰り返した (5 頭×2 回=延べ 10 頭)。また、卵巣機能および子宮内膜の回復の期間を考慮し、1 回目と 2 回目の間隔を最短でも 60 日間空けた。

### 2) 方法

#### (1) 過剰排卵処理および DHEA-S 製剤投与

SOV は発情日以外の任意の時期に CIDR を挿入し、その後 9~13 日目より FSH18~24AU を 3 日間、朝夕漸減的に筋肉内投与することにより実施した。SOV 開始時に DHEA-S 製剤 200 mg/注射用水 20ml を頸部皮下投与した。PGF<sub>2α</sub> を SOV 開始 3 日目に朝 20 mg・夕 15 mg 筋肉内投与し、最初の PGF<sub>2α</sub> 投与時に CIDR を抜き取った。SOV 開始 4 日目の夕に GnRH を投与した。

#### (2) 人工授精

GnRH 投与の翌日の夕方人工授精を行った。同一牛に使用する精液は同一種雄牛、同一ロットのものを用いた。

#### (3) 体内受精卵採取および受精卵の品質判定

2) (2) の (2) と同様に、体内受精卵採取および受精卵の品質判定を行った。

#### (4) 卵巣の観察

体内受精卵採取時に血流測定付き超音波画像診断装置 (MyLabOneVET、(株)メディカルタスクフォース) を使用し、卵巣を観察した。観察項目は、

黄体数、遺残卵泡数、反応数 (黄体数と遺残卵泡数の合計) とした。

## 3) 解析項目

採取卵数、受精卵数、正常卵数、A・A'ランク卵数、B ランク卵数、C ランク卵数、ランク外卵数、黄体数、遺残卵泡数、反応数の 10 項目とした。また、供試牛 5 頭の DHEA-S 製剤投与試験前直近 2 回 (5 頭×2 回=延べ 10 頭) の体内受精卵採取成績および卵巣所見を DHEA-S 製剤非投与区とし、DHEA-S 製剤投与区と比較した。

## 4) 統計処理

DHEA-S 製剤投与区と非投与区間の有意差検定は Mann-Whitney U 検定にて行った。統計ソフトは EZR version 1.36 を使用した。

## 結果および考察

### 1 黒毛和種繁殖雌牛の発情周期中および過剰排卵処理中の血中 DHEA および DHEA-S 濃度動態の解明

血中 DHEA および DHEA-S 濃度動態を解析した結果、発情周期中および過剰排卵処理中どちらにおいても、変動が少なく、特徴的な動態は示さなかった (図 1、2)。これらの結果より、2) では当センターおよび県内農家の両方で採材しやすい、体内受精卵採取直後に採血を行い、血中 DHEA および DHEA-S 濃度と体内受精卵採取成績との関連性を解析することとした。

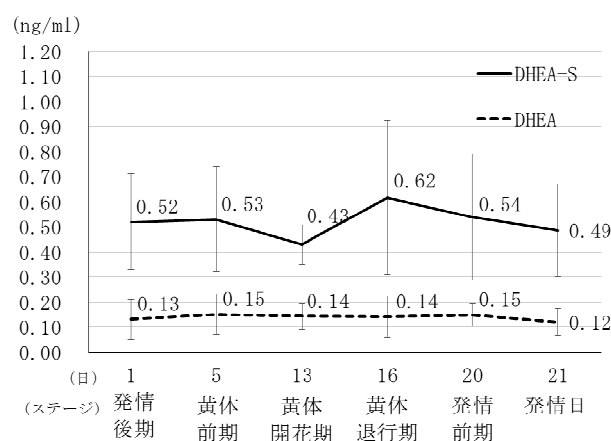


図 1. 発情周期中の血中 DHEA および DHEA-S 濃度の動態

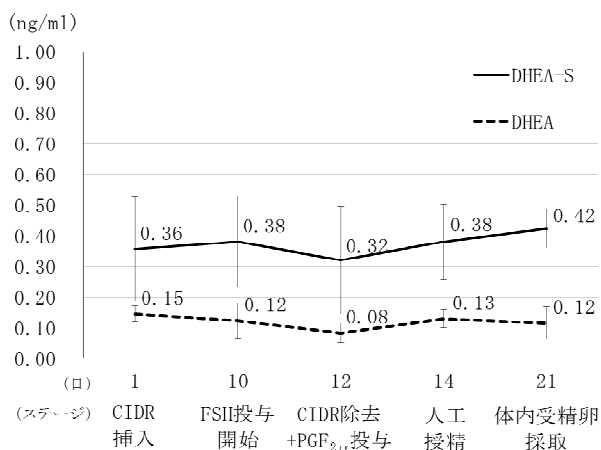


図2. 過剰排卵処理中の血中 DHEA および DHEA-S 濃度の動態

### 2 黒毛和種繁殖雌牛における血中 DHEA および

DHEA-S 濃度と体内受精卵採取成績との関連性の解明  
 血中 DHEA および DHEA-S 濃度と体内受精卵採取成績の関係を解析した結果、血中 DHEA 濃度と A・A'・B ランク卵率との間に弱い正の相関がみられた ( $r=0.254$ ,  $p<0.05$ ) (図3)。この結果より、血中 DHEA 濃度は体内受精卵採取成績の指標となる可能性が示唆された。また、血中 DHEA 濃度とその他の体内受精卵採取成績および血中 DHEA-S と体内受精卵採取成績に相関はみられなかった。

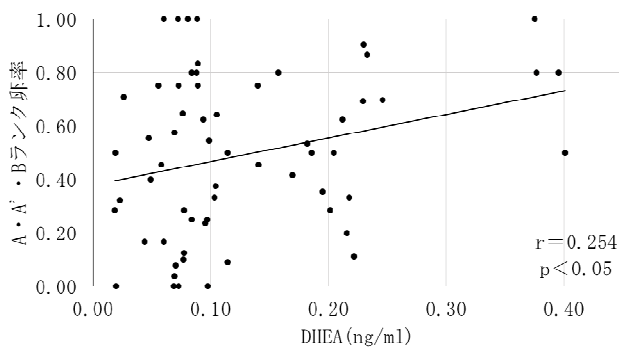


図3. 体内受精卵採取時の血中 DHEA 濃度と A・A'・B ランク卵率との関係

### 3 黒毛和種繁殖雌牛への DHEA-S 製剤投与後の血中 DHEA および DHEA-S 濃度動態の解明

頸部静脈内投与区において、血中 DHEA および DHEA-S 濃度は投与後 1 時間で最大となり、24 時間後までには投与前の血中濃度まで減少することが確認された。また、頸部皮下投与区において、血中 DHEA および DHEA-S 濃度は投与後 4 時間で最大となり、血中 DHEA-S 濃度については、32 時間後までには投与前の血中濃度まで減少したが、DHEA 濃度については、96 時間後まで緩やか

に減少しながら維持されることが確認された (図4、5)。この結果より、血中 DHEA 濃度は頸部皮下投与の方が頸部静脈内投与より長く維持されることが明らかとなり、体内受精卵成績における DHEA-S 製剤投与試験は頸部皮下投与により行うこととした。

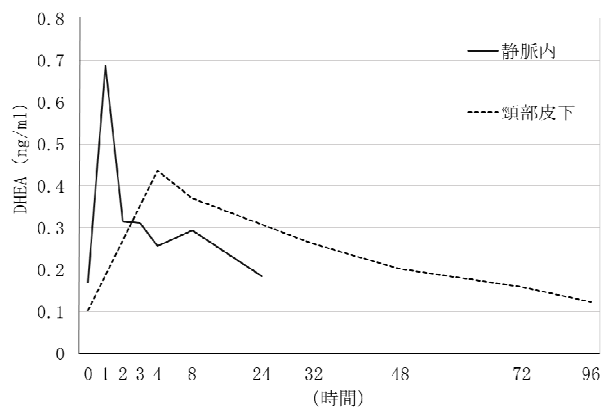


図4. 頸部静脈内および頸部皮下への DHEA-S 製剤投与時の血中 DHEA 濃度の動態

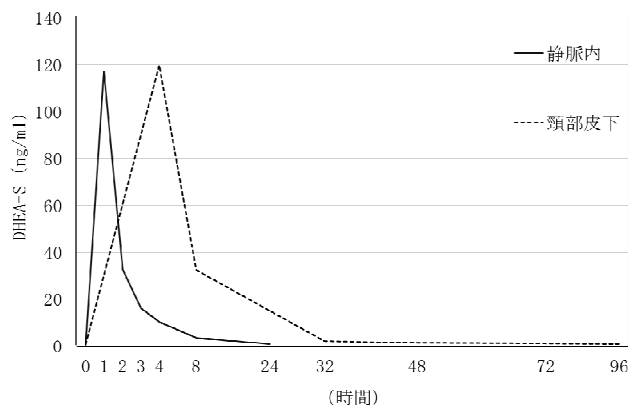


図5. 頸部静脈内および頸部皮下への DHEA-S 製剤投与時の血中 DHEA-S 濃度の動態

### 4 黒毛和種繁殖雌牛への DHEA-S 製剤投与が体内受精卵採取成績に及ぼす影響の解明

体内受精卵採取成績については、DHEA-S 製剤投与区において、平均採取卵数は 13.4 個、平均受精卵数は 7.7 個、平均正常卵数は 5.9 個、平均 A・A' ランク卵数は 3.8 個、平均 B ランク卵数は 1.4 個、平均 C ランク卵数は 0.7 個、平均ランク外卵数は 7.5 個であった。また、DHEA-S 製剤非投与区において、平均採取卵数は 6.0 個、平均受精卵数は 4.4 個、平均正常卵数は 2.6 個、平均 A・A' ランク卵数は 1.4 個、平均 B ランク卵数は 0.7 個、平均 C ランク卵数は 0.5 個、平均ランク外卵数は 3.4 個であった (表1)。この結果より、平均採

取卵数はDHEA-S製剤を投与することによって、有意に増加することが明らかとなった ( $p < 0.05$ )。また、平均受精卵数および平均正常卵数は有意な差がみられなかったものの、DHEA-S製剤を投与することによって、増加する傾向がみられた。

体内受精卵採取時の卵巣所見については、DHEA-S製剤投与区において、平均黄体数は13.0個、平均遺残卵胞数は10.4個、平均反応数は23.4個であった。また、DHEA-S製剤非投与区において、平均黄体数は9.6個、平均遺残卵胞数は7.1個、平均反応数は16.7個であった(表2)。この結果より、DHEA-S製剤を投与することによって、平均黄体数および平均反応数は増加する傾向がみられた。

今回、SOV開始時にDHEA-S製剤200mg/注射用水20mlを頸部皮下投与した結果、採取卵数は有意に増加し、受精卵数、正常卵数、黄体数、反応数も増加する傾向がみられた。ヒトの生殖補助医療分野では、卵巣予備能低下やpoor responderと呼ばれる卵巣反応不良

の患者に対して、サプリメントによるDHEA投与が行われており、この有効性をまとめた論文において、採取卵数が増加したと報告されていることから<sup>10)</sup>、今回の黒毛和種を供試した結果においても同様の結果が得られたと考えられる。一方で、採取卵数の増加に伴い正常卵数は増加するものの、ランク外卵数や遺残卵胞数も増加する傾向がみられたことから、DHEA-S製剤を投与した場合、FSHに対して卵巣が過剰に反応したために、ランク外卵数が増加した可能性が示唆された。当センターの先行研究では、メラトニン投与によって、卵品質が改善される可能性が示唆されており<sup>11)</sup>、DHEA-S製剤とメラトニンの併用によって、採卵数および正常卵数の増加と伴にランク外卵数を減少させることが可能となるのではないかと考えられる。

今回の研究でDHEA-S製剤投与の有効性を示す基礎的知見が得られた。しかしながら現在、DHEA-S製剤については製造中止になっていることから、これに代わる製剤等を検討する必要があると考えられる。

表1. DHEA-S製剤投与区および非投与区の体内受精卵採取成績

	供試頭数	採取卵数	受精卵数	正常卵数	ランク			ランク外卵数
					A・A'	B	C	
DHEA-S製剤投与区	10	13.4 ± 9.6 <sup>a</sup>	7.7 ± 7.0	5.9 ± 6.5	3.8 ± 5.7	1.4 ± 1.4	0.7 ± 0.9	7.5 ± 10.4
DHEA-S製剤非投与区	10	6.0 ± 5.7 <sup>b</sup>	4.4 ± 4.0	2.6 ± 2.7	1.4 ± 1.5	0.7 ± 0.9	0.5 ± 0.7	3.4 ± 3.4

平均値±標準偏差、a-b :  $p < 0.05$

表2. DHEA-S製剤投与区および非投与区の体内受精卵採取時の卵巣所見

	供試頭数	内訳		合計 (反応数)
		黄体数	遺残卵胞数	
DHEA-S製剤投与区	10	13.0 ± 6.3	10.4 ± 9.1	23.4 ± 14.1
DHEA-S製剤非投与区	10	9.6 ± 5.1	7.1 ± 8.8	16.7 ± 10.5

平均値±標準偏差

参考文献

- 1) 一般社団法人家畜改良事業団、2016、平成 26 年受胎調査成績、11
- 2) 一般社団法人家畜改良事業団、2020、平成 29 年受胎調査成績、11
- 3) 栃木県酪農試験場繁殖技術研究室、2010、超音波画像診断を用いた卵巣観察に基づく牛体内胚生産能力の推定、平成 22 年「関東東海北陸農業」研究成果情報、畜産草地部会（大家畜）、7
- 4) 茨城県畜産センター飼養技術研究室、黒毛和種供卵牛の胚採取成績に影響する要因の解析、2018、第 2 回日本胚移植技術研究会大会講演要旨集、38
- 5) Krzysztof Rutkowski, Paweł Sowa, Joanna Rutkowska-Talipska, Anna Kuryliszyn-Moskal, Ryszard Rutkowski、2014、Dehydroepiandrosterone (DHEA) :hypes and hopes、*Drugs*、74(11)、1195-207
- 6) Mika Enomoto, Hisashi Adachi, Ako Fukami, Kumiko Furuki, Akira Satoh, Maki Otsuka, Shun-ichi Kumagae, Yasuki Nanjo, Yoshiyuki Shigetoh, Tsutomu Imaizumi、2008、Serum dehydroepiandrosterone sulfate levels predict longevity in men:27-year follow-up study in a community-based cohort (Tanushimaru study)、*J Am Geriatr Soc*、56(6)、994-8
- 7) Masao Jinno, Hiroshi Tamura, Yoshikazu Yonei、2012、Anti-Aging Medicine and Reproductive Health、*ANTI-AGING MEDICINE*、9(1)、6-13
- 8) David Barad, Norbert Gleicher、2006、Effect of dehydroepiandrosterone on oocyte and embryo yields, embryo grade and cell number in IVF、*Human Reproduction*、21(11)、2845-2849
- 9) 一般社団法人日本授精師協会、2017、家畜人工授精テキスト(家畜体内受精卵・家畜体外受精卵編)、84-85
- 10) Lin Xu, Chunxia Hu, Qun Liu, Yaxuan Li、2019、The Effect of Dehydroepiandrosterone (DHEA) Supplementation on IVF or ICSI:A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials、*Geburtshilfe Frauenheilkd*、79(7)、705-712
- 11) 鹿島悠幹、坪井佑季、2016、メラトニン濃度を指標とした牛の卵巣機能解析法に関する研究、茨城県畜産センター研究報告、47