

1. 牛の受精卵移植技術の実用化に関する研究

(2) 受胎率向上のための前後処置法の検討

Examination of Hormone Administration Method for Pregnancy Rate Improvement in Bovine Embryo Transfer.

梅木英伸・志村英明¹⁾・藤田達男・久々宮公二²⁾・志賀一穂

要 旨

胚移植における受胎牛の黄体機能を促進することによる受胎率の改善を目的に、試験1区として受胎牛へ5日目(発情日を0日目として)に絨毛性性腺刺激ホルモン(以下hCG)を1,500単位投与、試験2区は胚移植日(発情日を0日目として7または8日目)にhCGを1,500単位投与、試験3区は対照区として無投与とし、受胎成績と血中プロジェステロン(以下P)および血中エストラジオール17β(以下E₂)の濃度測定を行い、胚移植におけるhCGの投与の効果について検討した。

1. 試験1区の受胎率は60.0%(3/5頭)、試験2区は80.0%(4/5頭)、試験3区は40.0%(2/5頭)であり、3処理区間の受胎率に有意差は認められなかった。しかし、共同試験(10県参加)の受胎成績において、試験1区の受胎率は53.5%(53/99頭)、試験2区は55.4%(62/112頭)、試験3区は39.8%(43/108頭)であり、試験1区、2区は試験3区と比較して受胎率は有意(P<0.05)に高く差を認めた。
2. 黄体と共存していた主席卵胞(以下DF)が、hCG投与により排卵し誘起黄体の形成状況を hCG 投与後7日目の直腸検査で検査した結果、試験1区は4/5頭; 80.0%、試験2区は5/5頭; 100%、試験3区は0/5頭; 0%の誘起黄体形成状況であった。また、誘起黄体を形成した受胎牛の受胎率は7/9頭(77.8%)、誘起黄体無形成の受胎牛は2/6頭(33.3%)であった。
3. 血中P値の動態は、試験1区では試験2区、3区と比較して有意な差は認められなかったが、移植日から14日目にかけて他区より高く推移する傾向にあった。また、試験2区では14日目の血中P値は3区と比較して有意に高い(P<0.05)P値を示した。
4. 血中E₂値の動態は、試験1区、2区ではhCG投与による血中E₂値の下降効果を認めなかった。

以上のことから、今回の試験においては受胎牛への5日目と移植直後のhCG1,500単位の投与は、受胎牛の14日目の血中P値を上昇させ、このことが受胎牛において胚の発育に適する子宮環境に整え、胚移植における受胎牛の受胎性が改善したと思われる。

(キーワード：胚移植、hCG、受胎率、血中プロジェステロン)

背景及び目的

当県では1983年から実施してきた受精卵移植事業は20年を経過し、当场より供給された胚からすでに1,000頭以上の胚移植産子が生産されている。また当场の供胚牛は、産肉性等の能力が高い牛を選

抜し、種雄牛造成を目的の一つとして県下へ胚を供給していることから、農家の牛群産肉形質に関する遺伝能力の向上を図るなど家畜改良の一端を担っている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。

しかし、県下の胚移植の実施頭数はここ数年伸び

1)三重家畜保健衛生所、2)宇佐家畜保健衛生所

悩んでおり、また凍結胚移植において受胎率は40%程度に停滞している。この受胎率の低迷が県内における胚移植が農家段階で普及定着しない最大の障害と考えられ、更なる普及を図るためにもより一層の受胎率向上が望まれる。

また胚移植において受胎率を高めるのには胚移植前に受胎の可能性の高い受胎牛の選定と、品質の良い胚の移植により受胎率を高めると考えられるが、受胎牛(品種、産歴、移植時期等)や胚(ステージ、ランク、凍結方法等)の受胎率を左右する要因は様々あり未解決な問題が多く現在に至っている。

近年、受胎牛に性腺刺激ホルモン放出ホルモン(以下 GnRH)⁵⁾⁶⁾⁷⁾や hCG⁸⁾を移植前後に投与することによる受胎率の向上の検討がなされているが、その効果の有効性には未だ結論が得られていない。

これまで牛における胚移植の受胎率向上のため、受胎牛の移植前日あるいは移植後5～7日後の受胎牛に、下垂体前葉からの黄体形成ホルモン(以下 LH)放出を促す GnRH の投与や LH 作用の強い hCG の投与を行い、受胎牛に与える黄体機能促進の効果および受胎率向上の効果について、受胎成績と血中 P および血中 E₂ の濃度測定を実施し検討を行ってきた。しかしながら、GnRH の投与は、受胎牛の移植日の血中 E₂ 値と E₂/P 比を下降させ、発情後14日目の血中 P 値を上昇させる効果を認めたが、受胎率の向上には至らなかった⁹⁾¹⁰⁾。このことから本年度は、投与ホルモン製剤を GnRH から hCG へ変更し、受胎牛に胚移植前または胚移植直後に hCG を投与し、受胎率向上の効果について検討を行った。

なお、本試験は受精卵普及定着化事業(技術高度化)の10県(青森、宮城、奈良、宮崎、秋田、神奈川、静岡、高知、山口、大分)による共同試験で実施した当場の成績である。

試験方法

1. 供試牛

受胎牛は当場で飼養している黒毛和種経産牛の15頭を用い、発情後7または8日目に直腸検査により副生殖器に異常が認められず、また黄体は Lindner と Wright¹¹⁾の分類により、Excellent、Good

あるいは Fair と判定した牛を受胎牛とし本試験に供試した。

2. 試験区分

試験区は1区、2区、3区とし、受胎牛を無作為に各区に5頭毎に区分し、計15頭の受胎牛を供試した。胚の移植日は受胎牛の発情日を0日目とし、7日目または8日目とした。

表1で示すように試験1区は、受胎牛の発情日を0日目として5日目に hCG (プベローゲン：三共ゾーキ) 1,500 単位を (プベローゲンとして 5.0ml) 頸部筋肉内投与。試験2区は、受胎牛の胚移植直後に hCG1,500 単位を頸部筋肉内投与。試験3区は対照として無投与区とした。

表1 試験区分

試験区	頭数	処 理 方 法
1区	5	5日目にhCG1,500単位投与
2区	5	胚移植直後にhCG1,500単位投与(7または8日目)
3区	5	無投与(対照区)

注)日数は発情日を0日とする

3. 胚の採取方法

当場で採胚牛として飼養している黒毛和種経産牛のうち、発情日を0日として発情確認後7～14日目の供胚牛に対して過剰排卵処理を施した。過剰排卵処理は FSH 製剤(アントリン：デンカ製薬)の総量 20AU を3日間減量法(5・5・3・3・2・2AU)により朝夕2回頸部筋肉内に投与し、FSH 処理開始後48時間目に PGF_{2α} アナログ(エストラメイト：ナガセ医薬)をクロプロステノールとして 0.75mg を頸部筋肉内投与した。人工授精は発情確認後2回実施し、初回人工授精後7日目に非外科的に採胚した。採胚後ポピドン・ヨード(PVP ヨード液 L：フジタ製薬)50ml を子宮内注入し、同時に PGF_{2α} アナログをクロプロステノールとして 0.75mg を頸部筋肉内投与した。回収胚は 20%子牛非働化血清+0.4%牛血清アルブミン添加修正ダルベッコの PBS (以下 mPBS) で洗浄し移植及び凍結に用いた。

4. 胚の凍結保存方法

回収した胚は mPBS で洗浄した後 A ランク(正常な発育ステージで、輪郭が明瞭、色調も正常、ほとんど変性部位無し; Excellent)、A ランク(正常な発育ステージで、輪郭が明瞭、ほぼ正常な形態を

示すが、一部突起した細胞あるいは不均整が見られる、変性部位が10%以下有り；Good）、Bランク（正常な発育ステージで、部突起した細胞あるいは不均整がやや目立つが、変性部位が10～30%以下有り；Fair）の3ランクの胚を選別し、このうち後期桑実胚（以下CM）、初期胚盤胞（以下EB）、胚盤胞（以下BL）及び拡張胚盤胞（EXB）を以下のストロー内ワンステップ法で凍結した。

凍結方法は、mPBSを基調液とした10%グリセロール液を耐凍剤として用い、胚を3.3%、6.7%および10%グリセロール加mPBSでそれぞれ5分間浸漬した後0.25ml（IVM、CASSOU社製straw、フランス）プラスチックストローに充填した。ストローへの充填は、融解後のグリセロール除去のための0.6Mシュークロース加mPBSを先に充填し（約8.5cm）、10%グリセロール加mPBSでストローの先端部を洗浄した後に3mmの空気層を作成し10%グリセロール加mPBS内の胚とともにストローに吸引し充填した（1.5cm）。ストローの冷却は無水エタノールを入れたプログラムフリーザー（ET1：FHK社製）を用い、20から-5.5まで毎分-1で冷却、この間-3.5に達した時点で0.6Mシュークロース加mPBS部分を液体窒素で冷やしたピンセットではさんで植氷。-5.5で10分間保持後、毎分-0.3で-35まで冷却し液体窒素に投入した。

5．胚の融解方法

ストローを液体窒素ボンベから出し、空中で10秒間保持後、35の温水に11～15秒間水平に保持し融解。ストローのシール部を持ち1～2回強く振り下ろし、10%グリセロール加mPBS層と0.6Mシュークロース加mPBS層を混合させた後、ストローを35の温水中にシール部を上にし7分間立て、ストロー内でグリセロールを除去した。

6．融解胚の培養方法及び生存性の判定

凍結法で融解した胚は、凍結前のランクと融解後のランクを観察後mPBSに移し、2～3時間の短時間培養（38.5、in air、湿潤）によって胚の困卵腔の形態、胞胚腔の形成や拡張度合い等により生存性を確認し、生存と判定した胚を移植に用いた。

7．胚の移植方法

胚の移植は、受胚牛を梓場に保定し直腸内の糞を排出し、仙骨と第1尾椎間の麻酔部位を毛刈りして後軀を水洗後、アルコール綿花で消毒して3mlの2%塩酸リドカイン（2%キシロカイン注、藤沢薬品）で尾椎硬膜外麻酔を行った。尾を保定し外陰部を水洗、アルコール綿花で消毒した後、消毒した腔鏡を挿入して腔部を開口し、移植器（カスー式牛移植器、CASSOU社製、フランス）を腔壁に触れないようにして外子宮口に挿入して腔鏡を除去した。移植は頸管経由法により非外科的に黄体が確認された卵巢と同側の子宮角の基部から中央部の部位に1胚移植した。

8．調査項目

1）受胚牛の記録

年齢、産次、分娩後日数、栄養度、卵巢・子宮・副生殖器の所見、誘起黄体の有無

2）受胎率

3）血中Pおよび血中E₂濃度

9．血液の採取および処理方法

1）採血時期

試験1、2、3区全て共通の、5日目、移植前日、移植直前、移植翌日、14日目、21日目の計6回とした（発情日を0日目）。

2）採血及び処理法

受胚牛の頸静脈から、18Gの採血針を用いて真空採血管に採血し、採血後直ちにクラッシュアイスで充満したコンテナに採血管を投入し、採血作業終了後速やかに冷却遠心（3000rpm、60min、4）してヘパリン血漿を採取した。採取した血漿は測定まで-25で凍凍保存した。

10．血中Pおよび血中E₂濃度の測定

血漿中のP濃度の測定はEIA法、E₂濃度の測定はRIA法で測定した。

11．妊娠診断、卵巢所見及び誘起黄体形成の有無

妊娠診断は胚移植後35日目前後、卵巢所見は移植直前、誘起黄体形成の有無はhCG投与7日目に直腸壁から超音波診断装置（日立メディコ社製ECHOPAL；EUB405B、リニア探触子T型7.5MHz；EUP-033J）を用いて調査した。

12. 統計処理

受胎性は、² 検定および Fisher の直接確率計算法を用いて検定した。また、血中ホルモン濃度の比較は、分散分析および Fisher's の PLSD テストを用いて有意差検定を行い、危険率 5 % (P<0.05) 未満を有意差ありと判定した。

結果及び考察

各試験区 5 頭、延べ 15 頭に胚移植を行い試験を実施した。

表 2 受胎牛および胚の移植時の状況

牛体番号	試験区	薬剤投与日 (日目)	移植日 (日目)	受胎牛 品種	受胎牛 年齢	受胎牛 産歴	分娩後 日数	受胎牛 栄養度	胚 ステージ	胚 ランク	黄体 ランク	共存卵胞 の有無	子宮 収縮性	子宮 弾力性	出血 の有無
1	1	5	8	黒毛和種	3.6	2	96	5	E B	A	A'	有	+	有	無
2	1	5	8	黒毛和種	12.3	10	48	4	E B	A	A	有	±	有	無
3	1	5	8	黒毛和種	8.1	6	66	6	E B	A	B	有	±	有	無
4	1	5	8	黒毛和種	5.8	4	78	5	E B	A'	B	有	±	有	無
5	1	5	8	黒毛和種	2.7	1	207	5	E B	A'	A'	有	±	有	無
6	2	7	8	黒毛和種	3.4	2	32	5	E B	A	A	有	+	有	無
7	2	7	8	黒毛和種	3.7	2	114	5	E B	A	A	有	+	有	無
8	2	7	8	黒毛和種	2.7	1	117	5	E B	A	A'	有	±	有	無
9	2	7	8	黒毛和種	10.0	8	62	6	E B	A	A	有	±	有	無
10	2	7	8	黒毛和種	8.9	6	99	6	E B	A'	B	有	+	有	無
11	3	-	8	黒毛和種	5.6	4	81	5	E B	A	A	有	+	有	無
12	3	-	8	黒毛和種	8.0	6	165	6	C M	A	A	有	±	有	無
13	3	-	8	黒毛和種	7.0	5	54	6	E B	A'	A'	有	+	有	無
14	3	-	8	黒毛和種	2.7	1	147	5	E B	A'	A	有	+	有	無
15	3	-	8	黒毛和種	3.6	2	81	4	E B	A	A	有	±	有	無

注 1) 薬剤投薬日、移植日、発情復帰日の日数は受胎牛の発情日を 0 日とする

注 2) 栄養度；黒毛和種と交雑種は全国和牛登録協会の栄養度審査基準に準じた

注 3) 黄体ランク；Excellent=A、Good=A'、Fair=B、その他=C

注 4) 子宮の収縮性・弾力性の判定は全国農業共済協会の臨床病理検査要領に準じた

2. 受胎成績

受胎成績は、試験 1 区の受胎率は 60.0 % (3/5 頭)、試験 2 区は 80.0 % (4/5 頭)、試験 3 区は 40.0 % (2/5 頭) であり、試験 1 区、2 区は試験 3 区と比較して受胎率は高かったが、供試頭数が少ないことから有意な差は認められなかった。しかし、受精卵普及定着化事業（技術高度化）のうち本共同試験に参加して当県と同様の試験を実施している 10 県の受胎成績において、試験 1 区の受胎率は 53.5 % (53/99 頭)、試験 2 区は 55.4 % (62/112 頭)、試験 3 区は 39.8 % (43/108 頭) であり、試験 1 区、2 区は試験 3 区と比較して受胎率は有意 (P<0.05) に高く差を認め、本県の受胎成績と同様な傾向であった。

1. 移植時における受胎牛、胚の状況

(1) 受胎牛：品種、年齢、産歴、分娩後日数、栄養度ともに各区にほぼ偏りが無く配置され試験に供試した。また、黄体ランクは A ~ B ランクであり、すべての受胎牛に 10mm 以上の卵胞の共存を認めた。しかし、子宮の状況には異常は認められなかった。

(2) 胚：ステージは CM または EB、胚のランクは A ~ B ランクの胚を供試した (表 2)。

誘起黄体形成状況は、黄体初期に hCG を投与することにより排卵が誘起され、その後 1 ~ 2 個の誘起黄体を形成するとの報告¹²⁾があり、試験 1 区、2 区は hCG 投与 7 日後に、試験 3 区は発情日後 14 日目に直腸検査を実施した結果、試験 1 区は 4/5 頭；80.0 % (誘起黄体形成牛のうち 3/4 頭受胎)、試験 2 区は 5/5 頭；100 % (4/5 頭受胎) に誘起黄体の形成を認め、試験 3 区は hCG を投与していないことから、誘起黄体の形成は認められなかった (表 3)。また、誘起黄体を形成した受胎牛の受胎率は 7/9 頭 (77.8 %)、誘起黄体無形成の受胎牛は 2/6 頭 (33.3 %) であり、有意な差は認められなかったが誘起黄体を形成した受胎牛の受胎率において高い受胎性を

示した。

以上の受胎成績より、当県の受胎成績と共同試験の成績を加えて、hCG の投与が受胎牛に与える受胎率向上の効果を判定すると、hCG1,500 単位を5日目に投与した試験1区と胚移植直後に投与した2区において、hCG 投与時に存在した第1次 DF に作

用して排卵を導いたことにより黄体を形成し、併せて hCG 投与による黄体への P 値の分泌増進作用⁸⁾が促され、試験1区、2区は3区(対照区)と比較して有意に受胎率が高くなったと考えられることから、本試験では hCG の投与による受胎牛への受胎率向上の効果を認めた。

表3 受胎成績

試験区	牛体番号	妊否	誘起黄体形成有無	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)	移植胚の種類
1	1	妊娠	有	5 (99)	3 (53)	60.0 (53.5) ^a	新鮮胚3/5
	2	妊娠	有				
	3	妊娠	有				
	4	不妊	有				
	5	不妊	無				
2	6	妊娠	有	5 (112)	4 (62)	80.0 (55.4) ^a	新鮮胚4/5
	7	妊娠	有				
	8	妊娠	有				
	9	妊娠	有				
	10	不妊	有				
3	11	妊娠	無	5 (108)	2 (43)	40.0 (39.8) ^b	新鮮胚1/4 ワスステップ胚1/1
	12	妊娠	無				
	13	不妊	無				
	14	不妊	無				
	15	不妊	無				
合計				15 (319)	9 (158)	60.0 (49.5)	新鮮胚8/14 ワスステップ胚1/1

注1) () 内の数値は共同試験参加県の成績

注3) 同列異符号間に有意差有りa-b(P<0.05)

3. 血中 P 値および血中 E₂ 値濃度の測定結果

(1) 試験区別の血中 P 値の比較

試験区別血中 P 値の動態は、5日目に hCG 投与した試験1区では、試験2区、3区と比較して有意な差は認められなかったが、移植日から14日目にかけて P 値の上昇が他の区より高く推移する傾向にあった。また、移植直後に hCG 投与した試験2区では、移植翌日までの血中 P 値は3区と同様な推移を示したが、14日目において2区 8.78±1.90ng/ml、3区 6.02±0.86ng/ml であり、2区は3区と比較して有意に高い(P<0.05)血中 P 値を示し

た(表4、図1)。

これらのことから、試験2区、3区より1区の移植日以降の高い血中 P 値の推移傾向および、3区より有意に高い2区の14日目の血中 P 値の上昇は、前述での誘起黄体形成状況で試験1区、2区のうち9/10頭(90.0%)で高い誘起黄体の形成を認めたことに加えて、hCG 投与による黄体への P の分泌増進作用の総和として血中 P 値が高く推移したと思われる。

表4 試験区別血中 P 値の比較

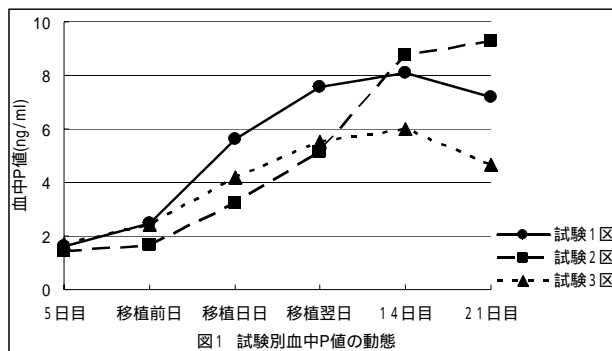
試験区	5日目	移植前日	移植日	移植翌日	14日目	21日目
1区	1.61±0.88	2.48±1.48 ^a	5.63±2.26 ^b	7.59±3.50	8.08±3.40	7.20±4.61
2区	1.42±0.81	1.66±0.95	3.22±1.13	5.12±1.19 ^c	8.78±1.90 ^{A,d}	9.29±1.16 ^C
3区	1.71±0.58	2.41±1.04	4.20±1.21	5.53±1.96	6.02±0.86 ^B	4.69±4.05 ^D

注1) 数値は平均値±標準偏差を表す

注2) P 値 ; ng/ml

注3) 同列異符号間に有意差有りA-B(P<0.05), C-D(P<0.01)

注4) 同行異符号間に有意差有りa-b(P<0.05), c-d(P<0.01)



(2) 試験区別の血中 E₂ 値の比較
 試験区別血中 E₂ 値の動態は、hCG 投与した試験1区、2区において血中 E₂ 値の下降効果は認められなかった。また、試験1区、2区共に hCG 投与

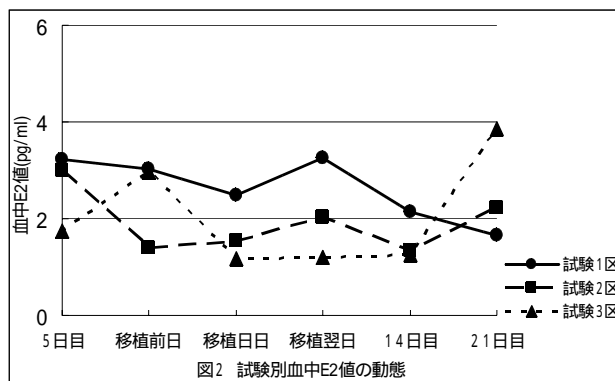
後に誘起黄体形成を認めていることから、DF の排卵が誘起されたと推察されるが、血中 E₂ 値には反映されなかったと思われる(表5、図2)。

表5 試験区別血中 E₂ 値の比較

試験区	5日目	移植前日	移植日	移植翌日	14日目	21日目
1区	3.23±0.70	3.02±3.17	2.50±2.56	3.26±2.00	2.15±1.46	1.65±2.02
2区	3.00±1.91	1.40±0.93	1.53±0.74	2.03±0.14	1.35±1.13	2.23±3.06
3区	1.74±0.91	2.96±0.71	1.17±0.85	1.20±0.20	1.26±1.81	3.87±5.15

注1) 数値は平均値 ± 標準偏差を表す

注2) E₂ 値 ; pg/ml



(3) 試験区別の血中 E₂/P 比の比較
 移植前日の血中 E₂/P 比は、全ての区において1以上を示したが、移植日の血中 E₂/P 比では全ての

区で1以下に低下した(表6)。しかし、5日目に hCG 投与した試験1区では hCG 投与による、血中 E₂/P 比の改善効果は認められなかった。

表6 試験区別血中 E₂/P 比の比較

試験区	移植前日	移植日
1区	1.81±0.70	0.65±0.80
2区	3.30±4.15 ^a	0.64±0.61 ^b
3区	1.54±0.93	0.34±0.29

注1) 数値は平均値 ± 標準偏差を表す

注2) 同行異符号間に有意差有り a-b(P<0.01)

西貝⁸⁾は、hCG を排卵後5日目に1,500単位投与し、胚移植の前日および移植日、すなわち受胎牛の発情後6、7日目では、性周期の卵胞波の第一卵胞波にあたり、第一卵胞波の卵胞にはLH受容体が存在し、hCG投与により卵胞の排卵が誘起され1～2個の誘起黄体が形成されることに加えて、hCG投与による黄体へのPの分泌増進作用により、hCG投与後7日目以降は対照区と比較して有意に高く血中P値が推移し、またhCG投与の翌日～3日目の血中E₂値の下降を認めたと報告している。

このことは、今回試験に供試したすべての受胎牛の移植日の卵巣所見に、10mm以上の共存卵胞すなわちDFを認めたことから試験1区の供胎牛は5日目、2区は移植日に黄体と共存していたDFが、hCG投与により排卵し誘起黄体を形成(1区;4/5頭、2区5/5頭)したことに加えて、hCG投与によるP分泌増進作用が、試験1区では移植日から14日目にかけての高位な血中P値の推移と、試験2区の14日目において無投与(3区)と比較して有意に高い(P<0.05)血中P値を示したと思われる。この14日目における血中P値の上昇が受胎性には重要であり、すなわち母胎が胚を認識する14日目前後に血中P値が高く推移することが、子宮内膜のE₂受容体数とオキシトシン受容体数の増加を抑制し、黄体退行の阻止と胚の発育に適する子宮環境に整えている⁸⁾ことから、試験1区、2区の14日目の血中P値の上昇効果が、本試験において受胎牛の受胎性を改善したと思われる。しかし本試験において血中E₂値の下降効果は認められず西貝の報告と異なった。

以上3年間にわたり、ホルモン製剤の投与による胚移植における受胎率向上について検討を重ねてきた。しかしGnRH投与による受胎性の改善効果は認められなかったが⁹⁾¹⁰⁾、hCG1,500単位の5日目と移植直後の投与により受胎性の改善効果が認められ、野外における受胎率を向上させる一手法として活用できると思われた。しかし、hCG投与の実施は獣医師に限られており、また、牛体でのanti-hCG生産の容易性を考えると頻繁な投与はできない。今後、容易かつ農家段階(要指示製剤等)で実施できる手法による受胎率向上の検討が更に必要と考えられ

る。

謝辞

本試験を行うにあたり、ステロイドホルモン測定および終始適切なご指導を頂いた、岩手大学 農学部 獣医学科臨床獣医学講座 獣医臨床繁殖学研究室 大澤健司先生ならびに同研究室の皆様、東北農業研究センター 畜産草地部 育種繁殖研究室 竹之内直樹室長ならびに同研究室の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1) 広瀬啓二・永山興宣・志賀一穂
九農研, 57: 123, 1995
- 2) 大竹孝一・藤田達男・志賀一穂
大分畜試報告, 28: 84-86, 1999
- 3) 梅木英伸・藤田達男・志賀一穂
大分畜試報告, 29: 99-101, 2000
- 4) 梅木英伸・藤田達男・志賀一穂
大分畜試報告, 30: 52-54, 2001
- 4) 梅木英伸・藤田達男・志賀一穂
大分畜試報告, 31: 56-63, 2002
- 5) Drost M, Tan KL, et al.
Theriogenology, 31: 186(Abst), 1989
- 6) Ellington JE, Foote RH, et al
Theriogenology, 36: 1035-1042, 1991
- 7) Salaheddine M, Spoelder KPE, et al.
Theriogenology, 45: 338(Abst), 1996
- 8) 西貝正彦
那須 ET センター研究所研究報告書,
1-120, 1998
- 9) 梅木英伸・藤田達男・志賀一穂
大分畜試報告, 31: 56-63, 2002
- 10) 梅木英伸・藤田達男・志賀一穂
大分畜試報告, 32: 77-85, 2003
- 11) Lindner GM, Wright RW Jr.
Theriogenology, 20: 407-416, 1983
- 12) 金田義宏・百目鬼郁男・加茂前秀夫ほか
家畜繁殖誌, 27: 86-91, 1981