

1. 牛の受精卵移植技術に関する研究

(1) 牛の体外受精卵移植の実用化

ア. 連続経膈採卵による優良雌牛胚の安定的生産の検討

Examination of the Production of Embryos by Repeated Transvaginal Ultrasound-Guided Follicular Oocyte Aspiration in the Japanese Black Cattle

梅木英伸・藤田達男・志賀一穂

要 旨

本試験は、超音波ガイドを使った経膈採卵法 (ovum pick up : 以下 OPU) と体外受精 (In vitro fertilization : 以下 IVF) を組み合わせた技術を用いて、優良形質を持つ雌牛から胚を安定的に生産することを目的として実施した。本年は、試験 1 区には Epidermal Growth Factor (上皮増殖因子 ; 以下 EGF) を成熟培養液と発生培養液の両方に添加(10ng/ml)、試験 2 区には EGF を成熟培養液のみに添加(10ng/ml)、試験 3 区には EGF を発生培養液のみに添加(10ng/ml)、試験 4 区には両方とも EGF を無添加とし、各試験区に 9 頭づつに区分した 15 頭 (延べ 36 頭) の黒毛和種経産牛から OPU により採取した卵母細胞 (以下卵子) を供試し、IVF 後の胚の発生状況を比較して、OPU-IVF による効率的な胚生産の方法と、作出した胚の移植による優良雌牛の産子生産の検討を行った。

1. 各試験区に用いた卵子の OPU 成績 ; 採取した卵子個数は、試験 1 区 91 個、試験 2 区 88 個、試験 3 区 113 個、試験 4 区 162 個であった。IVF に用いる卵子グレードの G1+G2 割合は、試験 1 区 16.5%、試験 2 区 30.0%、試験 3 区 33.6%、試験 4 区 15.4%であり、試験 4 区は試験 2 区、3 区と比較して有意 ($P<0.05$) に G1+G2 割合が低く、また試験 1 区は試験 2 区、3 区と比較して G1+G2 割合が低い傾向 ($P=0.08$) にあった。G3+G4 割合は、試験 1 区、4 区は 2 区、3 区と比較して有意 ($P<0.01$) に G3+G4 割合が高く、異常卵子の G5+G6 割合は各試験区において同程度であった。
2. 各試験区の IVF 成績 ; 卵割率は、試験 1 区 83.7%、試験 2 区 86.5%、試験 3 区 90.0%、試験 4 区 70.7% であり、試験 4 区は試験 1 区、2 区と比較して有意 ($P<0.05$) に卵割率が低かった。胚盤胞発生率は、試験 1 区 57.1%、試験 2 区 50.0%、試験 3 区 65.7%、試験 4 区 39.1%であり、試験 4 区は試験 1 区、3 区と比較して有意 ($P<0.05$) に胚盤胞発生率が低かった。
3. OPU-IVF から生産された新鮮胚または凍結胚を移植した結果、農家で実施した移植成績では、新鮮胚は 50.0%(4/8)、凍結胚は 28.6%(2/7)の計 40.0%(6/15)であった。場内で実施した移植成績では、新鮮胚は 54.5%(6/11)、凍結胚は 0.0%(0/1)の計 50.0%(6/12)であり、双方合わせて新鮮胚は 52.6%(10/19)、凍結胚は 25.0%(2/8)の計 44.4%(12/27)であった。

以上のことから、OPU により採取した卵子を体外培養を行う際に、EGF を成熟培養液と発生培養液への両方の添加(10ng/ml)及び発生培養液のみの添加は、当場の慣行法と比較して高い胚盤胞発生率を示した。また OPU-IVF から生産した胚を移植した結果、新鮮胚で 50%以上が受胎し、体内胚と比べて遜色がない受胎率を示したことから、優良形質を持つ雌牛の体外胚を年間を通して効率的かつ安定的に生産が行え、県下の多くの農家へ移植胚を供給できる体外培養系が確立できた。

(キーワード : 経膈採卵法、体外受精、Epidermal Growth Factor、胚盤胞発生率)

背景及び目的

牛の一般的な IVF 技術は、低コストかつ大量の胚生産技術としてすでに実用化されているが、食肉処理場由来の卵巣・卵子を用いることから、生産された胚の経済的あるいは遺伝的能力の評価及び産子の登録取得ができなく、これを解決するためには供卵牛ごとに卵子を採取し、血統の明らかな胚を生産することが必要である。

1987 年に Callsen ら¹⁾また 1988 年には Pieters ら²⁾は、超音波診断装置を用い牛生体の卵巣像を観察しながら卵子を採取した。その後、欧米を中心として OPU を応用した IVF 胚生産は、商業的に利用されるようになった^{3,4)}。一方、国内においても OPU-IVF の現場普及への努力が成されているが、卵子吸引技術の難しさ、また食肉処理場由来の卵子による IFV と比較して胚盤胞発生率が 20 ~ 30%と低い⁵⁾ことなどから、農家段階への普及へ至らないのが現状である。しかし、OPU-IVF は優良形質を持つ雌牛に対し、過剰排卵処理を用いなくても優良雌牛の胚を年間を通して効率的・安定的に生産できる可能性があり、また、過剰排卵処理による採胚成績の低下した供胚牛及び子宮環境の悪化などの原因で採胚ができなくなった供胚牛に対して胚の生産が可能となることから、当场または県下の農家で飼養されている優良遺伝子を保有する雌牛を用い胚の生産を行い、県下の多くの農家で利用することで、現在より効率的に優良牛の生産が可能であると思われる。このためには OPU-IVF における卵子採取、胚培養技術を向上させることが必要である。

これまで、連続 OPU による卵子の効率的・安定的な採取と、多数胚培養液 (Conditioned medium : 以下 CdM) の活用による、少数胚培養 (10 個未満) 時における胚盤胞発生率の向上について検討を行い、採取卵子数および胚盤胞発生率が改善することを明らかにした^{6,7,8)}。しかし、CdM の発生培養への活用には、CdM の作製・培養液の交換に手間を要することから、簡易な方法で発生率を高める手法の検討が必要と考えられた。

近年、成熟培養液や発生培養液へ EGF を添加することによって、胚盤胞発生率の向上の検討^{9,10,11,12)}

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。

そこで本試験は、OPU によって採取した卵子の胚盤胞発生率を向上させるために、胚の発育、分化を促進させる EGF を成熟培養液や発生培養液に 10ng/ml 添加^{9,12)}することにより、IVF 後の胚盤胞発生率の向上効果を調査し、OPU-IVF による優良雌牛の産子生産の検討を行ったので報告する。

試験方法

1. 供試牛

1) OPU を実施した供卵牛は、当场で飼養している黒毛和種経産牛の 15 頭 (延べ 36 頭) を用いた。

2) 胚移植を実施した受胚牛は、当场及び県下の農家で飼養している黒毛和種経産牛の計 27 頭 (農家牛 15 頭、場内牛 12 頭) を用いた。

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 Wright¹³⁾ の分類により、Excellent、Good あるいは Fair と判定した牛を受胚牛とした。

2. 試験区分

試験区は 1 区、2 区、3 区、4 区とし、OPU を実施した供卵牛を無作為に各区 9 頭づつに区分し、計 15 頭 (延べ 36 頭) から採取した卵子を試験に供試し、下記の方法により培養液に EGF を添加し胚盤胞発生率の改善効果について検討した。

表 1 で示すように試験 1 区は、成熟培養液と発生培養液それぞれに EGF を添加 (10ng/ml) した。試験 2 区は、成熟培養液のみに EGF を添加 (10ng/ml) した。試験 3 区は、発生培養液のみに EGF を添加 (10ng/ml) した。試験 4 区は当场の慣行法どおりの無添加区とした。

表 1 試験区分

試験区	供試頭数	処理方法
1区	9	成熟・発生培養液それぞれにEGFを添加(10ng/ml)
2区	9	成熟培養液にEGFを添加(10ng/ml)
3区	9	発生培養液にEGFを添加(10ng/ml)
4区	9	無添加(当场慣行法)
合計	36	

3. OPU 方法

供試牛を保定、糞を排出し、2%塩酸リドカイン

(2%キシロカイン、藤沢)で尾椎硬膜外麻酔後、外陰部を洗浄消毒して腔内にコンベックス型 7.5MHz の超音波プローブ (EPU-F531、日立メディコ) を挿入。直腸より手を入れ卵巣をプローブ先端に誘導し、超音波診断装置 (EUB-405B、日立メディコ) のモニターに卵巣像を映し、プローブに装着した採卵針 (cova needle、ミサワ医科) を、プローブ先端から腔壁を通して卵巣に刺し、卵巣像を確認しながら直径 3mm 以上の卵胞から卵胞液とともに卵子を吸引採取した。吸引にはフットスイッチ式吸引ポンプ (FV4、FHK) を用い、吸引圧は 100mmHg とした。採卵針が詰まった場合には 600mmHg 程度まで上げ栓塞物の除去を行った。吸引ポンプと採卵針の間に卵胞液回収用 50ml 遠心管を接続し、これを 38℃ で保温した。凝固血液による栓塞防止のため、吸引前及び吸引中も適宜採卵針を抜いて、灌流液 (4%非働化子牛血清(GIBCO)+ 10IU / ml ヘパリン(Hoechst)添加修正ダルベッコの PBS(GIBCO)) で採卵針内、接続チューブ内及び卵胞液回収用遠心管内を灌流した。採卵針、接続チューブ及び卵胞液回収用遠心管は供試牛毎に使用した。

4. 採取卵子の処理

卵胞回収液は供試牛ごとにフィルター (セルコレクター、ニプロ医工) で血液を除去し 4%非働化子牛血清 + 10IU / ml ヘパリン添加修正ダルベッコの PBS で洗浄後、フィルターのシャーレ部を鏡検し、全ての卵子を 20%非働化子牛血清 + 0.4%血清アルブミン(SIGMA)添加修正ダルベッコの PBS (以下 m-PBS) に回収した。卵子は卵丘細胞の付着状態等によって以下の 6 段階⁵⁾の卵子グレードに分類した。

- G 1 : 透明帯の周囲を卵丘細胞が 4 層以上取り囲んでいる
- G 2 : 透明帯の周囲に卵丘細胞が 1 ~ 3 層 (放線冠細胞も含む) 付着している
- G 3 : 卵丘細胞が透明帯の周りに部分的 (1/3 以下) に付着している
- G 4 : 完全に裸化されている
- G 5 : 卵丘細胞が膨化している
- G 6 : 卵丘細胞の付着状態に拘わらず卵細胞質が

変性している

以上の卵子グレードの分類より、G 1 ~ G 4 の採取卵子を正常卵子とした。

5. 卵子の成熟

卵子の成熟は 0.02AU/mlFSH(アントリン、デンカ) と 1 µg / mlEstradiol-17β(SIGMA)および 0.2mM ビルビン酸(SIGMA)を加えた 5%非働化牛胎児血清 (GIBCO)添加 TCM-199(GIBCO)で 3 回洗浄し、ミネラルオイルでカバーした同培養液 100µl ドロップに 15 ~ 20 個の卵子を移し、CO₂インキュベーター (38.9℃、5%CO₂、in air、湿潤) で 20 ~ 22 時間培養して卵子の成熟を促した。また、試験 1 区と試験 2 区の培養液には 10ng/ml EGF(SIGMA)を添加し培養を行った。

6. 媒精

37℃ 温湯で凍結融解した黒毛和種精液を IVF100 (機能性ペプチド研) で 2 回遠心洗浄後 (2,000rpm、6 min、38℃) 精子濃度 1×10^7 / ml に調整した。50µl の精子浮遊液ドロップを作り、ミネラルオイルでカバーし、CO₂インキュベーター内でガス平衡した。一方、成熟を促した卵子を IVF100 で洗浄後、先に準備した精子浮遊液ドロップに入れ最終精子濃度 5×10^6 / ml とし、CO₂インキュベーター内で 6 時間媒精した。

7. 胚の培養

媒精終了後、5%非働化牛胎児血清添加 mSOF¹⁴⁾ (以下 mSOF) に移し、ピペettingにより卵丘細胞の除去を行い、3 回洗浄後、1 胚当たり 5 µl の mSOF のドロップに移し、マルチインキュベーターで培養を行った (38.9℃、90%N₂、5%CO₂、5%O₂、湿潤)。また、試験 1 区と試験 3 区の培養液には 10ng/ml EGF を添加し培養を行った。

8. 胚の凍結保存方法

胚発生した胚は 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、このうち胚盤胞（以下 BL）または拡張胚盤胞（EXB）を以下のダイレクト法で凍結した。

凍結方法は、mPBS を基調液とした 1.8M エチレングリコール+0.1M トレハロース液を耐凍剤として用い、胚を 1.8M エチレングリコール+0.1M トレハロース加 mPBS に浸漬した後、0.25ml プラスチックストロー（IVM、CASSOU 社製 straw、フランス）に充填した。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、-7 10 分間保持（-7 浸漬 1 分後に液体窒素で冷やしたピンセットではさんで植氷）後、毎分 - 0.3 で - 30 まで冷却し液体窒素に投じた。

9 . 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、30 の温水に 12 秒間浸漬し融解した。

10 . 胚の移植方法

胚の移植は、受胎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た後軀を水洗後、アルコール綿花で消毒して 3 ml 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巣と同側の子宮角の基部から中央部の部位に新鮮胚または凍結胚を 1 胚移植した。

11 . 妊娠診断

妊娠診断は胚移植後 35 ~ 60 日前後に、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）を用いた方法または、胎膜スリップ法による直腸検査にて調査した。

12 . 調査項目

1) 採取卵子数、卵子グレード

2) 媒精日を 0 日として 2 日目に卵割率、7 ~ 9 日目に胚盤胞率を調べた。

3) 受胎性

13 . 統計処理

本試験の成績は、分散分析および Fisher's の PLSD テストにより有意差の評価を行い、危険率 5 % ($P < 0.05$) 未満を有意差有りと判定した。

結果及び考察

各試験区 9 頭、延べ 36 頭の供胚牛に OPU を施し採取した卵子を用いて試験を実施した。

1 . 各試験区に割り当てた OPU 卵子の状況

4 処理区に割り当てた OPU 卵子のグレードを表 2 に示した。

各試験区の OPU により採取した卵子個数は、試験 1 区 91 個（正常卵子数 66 個、正常卵子割合、72.5%）、試験 2 区 88 個（58 個、65.9%）、試験 3 区 113 個（78 個、69.0%）、試験 4 区 162 個（113 個、69.8%）であり、試験 4 区が最も多く、3 区、1 区、2 区の順であったが、正常卵子数は 4 区以外の各試験区は同程度で、また正常卵子割合は各区 70% 前後であった。

各試験区の採取した卵子グレードは、卵子への卵丘細胞付着状態が多く、体外受精後の胚盤胞発生率成績が良好⁵⁾¹⁵⁾と考えられる G1+G2 割合は、試験 1 区 16.5%、試験 2 区 30.0%、試験 3 区 33.6%、試験 4 区 15.4% であり、試験 4 区は試験 2 区、3 区と比較して有意 ($P < 0.05$) に G1+G2 割合が低く、また試験 1 区は試験 2 区、3 区と比較して G1+G2 割合が低い傾向 ($P = 0.08$) であった。このことに反映して G3+G4 割合は、試験 1 区、4 区は 2 区、3 区と比較して有意 ($P < 0.01$) に G3+G4 割合が高かった。異常卵子の G5+G6 割合は各試験区において同程度であった。

以上の OPU 成績より、試験 4 区は採取卵子数、正常卵子数ともに他の試験区より多かったが、G1+G2 の卵子数は 25 個で、試験 2 区、3 区より少ない個数であった。また試験 1 区は、G1+G2 の卵子数が 15 個であり最も少なく、正常卵子数も 66 個で多くないことから、体外受精後の胚盤発生率成績に対して、他の試験区と比べて条件的に良好な卵子個数、卵子グレードではないと思われた。

表 2 各試験区に割り当てたOPU卵子の状況

試験区分	供試頭数	採取卵子グレード						計	正常卵子 数	正常卵子 割合%	G1+G2 割合% (個数)	G3+G4 割合% (個数)	G5+G6 割合% (個数)
		G1	G2	G3	G4	G5	G6						
1区	9	9	6	43	8	11	14	91	66	72.5	16.5 (15)	56.0 ^A (51)	27.5 (25)
2区	9	9	20	26	3	15	15	88	58	65.9	33.0 ^a (29)	33.0 ^B (29)	34.0 (30)
3区	9	21	17	30	10	13	22	113	78	69.0	33.6 ^a (38)	35.4 ^B (40)	31.0 (35)
4区	9	10	15	70	18	36	13	162	113	69.8	15.4 ^b (25)	54.3 ^A (88)	30.3 (49)
合計	36	49	58	169	39	75	64	454	315	69.4	23.6	45.8	30.6

注) 同列異符号間に有意差有り, A-B(P<0.01)、a-b(P<0.05)

2. IVF 成績

供卵牛に OPU を実施し、採取した卵子を成熟培養、媒精、発生培養を行う際に、各試験区毎に成熟、発生培養液に EGF の添加(10ng/ml)を行い、胚盤胞発生率の改善効果の検討を行った(表 3)。

各試験区の卵割率は、試験 1 区 83.7%、試験 2 区 86.5%、試験 3 区 90.0%、試験 4 区 70.7%であり、試験 4 区は試験 1 区、2 区と比較して有意(P<0.05)に卵割率が低かった。

各試験区の胚盤胞発生率は、試験 1 区 57.1%、試験 2 区 50.0%、試験 3 区 65.7%、試験 4 区 39.1%であり、試験 4 区は試験 1 区、3 区と比較して有意(P<0.05)に胚盤胞発生率が低かった。

以上の IVF 成績より、当場で慣行に実施している成熟、発生培養法である試験 4 区が卵割率、胚盤胞発生率ともに他の区より低い結果となった。しか

し、試験 4 区は OPU 成績において、卵子の G1+G2 割合が低かったことが卵割率、胚盤胞発生率の成績を他の区と比べて低くしたと思われるが、試験 4 区の卵割率と胚盤胞発生率は、通常の OPU-IVF 成績⁵⁾と比較して決して低い成績ではない。同様に OPU 成績において、体外受精後の胚盤胞発生率成績に対して、卵子個数、卵子グレードで条件が最も悪かった試験 1 区では、卵割率 83.7%、胚盤胞発生率 57.1%と良好な成績を示したことから、体外培養の際に EGF を成熟と発生培養液への添加は、胚盤胞発生率を改善する効果はあると考えられた。また、EGF を発生培養の一方のみに添加した試験 3 区で、胚盤胞発生率 65.7%と非常に良好な成績であったことから、発生培養液のみの EGF の添加も胚盤胞発生率を改善する効果があると思われた。

表 3 IVF成績

試験区分	EGF添加の有無			供試 卵数	2cell 以上	Mono	Deg	卵割率 (%)	胚盤胞 発生数	胚盤胞 発生率 (%)
	成熟培養	発生培養	発生培養 血清添加 有無							
1区	有	有	有	66	41	8	17	83.7% ^a	28	57.1% ^a
2区	有	無	有	58	45	7	6	86.5% ^a	26	50.0%
3区	無	有	有	78	63	7	8	90.0%	46	65.7% ^a
4区	無	無	有	113	65	27	21	70.7% ^b	36	39.1% ^b
合計	-	-	-	315	214	49	52	81.4%	136	51.7%

注) 同列異符号間に有意差有りa-b(P<0.05)

3. 移植成績

供卵牛より採取した卵子から生産された IVF 胚を、県下の農家及び当場で飼養している黒毛和種経産牛 27 頭（農家牛 15 頭、場内牛 12 頭）に、1 胚を新鮮胚または凍結胚を移植した（表 4）。

農家で実施した移植成績は、新鮮胚では 50.0% (4/8)、凍結胚では 28.6%(2/7)の計 40.0%(6/15)であった。場内で実施した移植成績は、新鮮胚では 54.5% (6/11)、凍結胚では 0.0%(0/1)の計 50.0%(6/12)であった。また、農家・場内実施を併せた移植成績は、

新鮮胚では 52.6%(10/19)、凍結胚では 25.0%(2/8)の計 44.4%(12/27)であった。

以上の移植成績より、新鮮胚を用いた移植では農家と場内の移植成績ともに、50%以上の受胎率を示し、体内胚と比べて受胎率は遜色はなく良好な受胎率が得られた。しかし、凍結胚の移植では、農家移植 25.0%(2/7)、場内移植 0.0%(0/1)で受胎率は低く、優良雌牛から生産した OPU-IVF 胚を野外で活用するには、凍結胚移植の受胎率を向上させるために IVF 胚の凍結方法の改善が必要と思われた。

表 4 移植成績

移植先	移植胚の 処理方法	移植 頭数	受胎 頭数	受胎率 (%)
農家移植	新鮮胚	8	4	50.0
	凍結胚	7	2	28.6
	計	15	6	40.0
場内移植	新鮮胚	11	6	54.5
	凍結胚	1	0	0.0
	計	12	6	50.0
合計	新鮮胚	19	10	52.6
	凍結胚	8	2	25.0
	計	27	12	44.4

以上の結果から、EGF を体外培養液に添加することにより卵割率、胚盤胞発生率を向上させる効果並びに、試験で発生した IVF 胚の移植により新鮮胚移植では体内胚と遜色のない受胎率が得られることが解った。

Park ら⁹⁾は、EGF の成熟培養液への添加は卵子の成熟化を促して、その後の胚発育に影響を与えると報告している。また、Lonergan ら¹²⁾は、EGF の成熟培養液及び発生培養液への添加は、卵子の成熟や胚発生の決定に生理的な役割を行っているとして報告している。しかし、本試験では Park が言う成熟培養よりむしろ、試験 3 区の成績から発生培養での添加効果が大きいように思われた。

以上 4 年間にわたり、OPU-IVF により優良形質を持つ雌牛の胚を年間を通して安定的、効率的に生産することを目的として検討⁶⁾⁷⁾⁸⁾を重ねてきた。

これにより、連続 OPU による卵子の安定的な採取と、CdM の活用や EGF の培養液への添加によって胚盤胞発生率の改善効果を認め、優良形質を持つ雌牛の胚生産を向上させる手法として有効であると

思われた。しかし、生産した凍結胚を移植した場合、受胎率が低いことから、受胎率を向上させる為に凍結方法や培養方法等の検討が更に必要である。

引用文献

- 1) Callesen, H., et al.
Theriogenology, 27: 217(Abst), 1987
- 2) Pieterse, M. C., et al.
Theriogenology, 30: 751-762, 1988
- 3) Meintjes, M., et al.
Theriogenology, 39: 226(Abst), 1993
- 4) Looney, C. R., et al.
Theriogenology, 41: 67-72, 1995
- 5) 坂口真一・井口光国・小林直彦ほか
日本胚移植学雑誌, 17: 94-100, 1995
- 6) 梅木英伸・藤田達男・志賀一穂
大分畜試報告, 31: 46-50, 2002
- 7) 梅木英伸・藤田達男・志賀一穂
大分畜試報告, 32: 63-71, 2003
- 8) 梅木英伸・藤田達男・志賀一穂

大分畜試報告，33：77-83，2004

- 9) Park . Y . S , Lin . Y . C .
Theriogenology , 39 : 475-484 , 1993
- 10) Sirisathien . S . , et al .
Anim Reprod Sci , 77 : 21-32 , 2003
- 11) Sirisathien . S . , et al .
Mol Reprod Dev , 65 : 51-56 , 2003
- 12) Lonergan . P . , et al .
Bio Reprod , 54 : 1420-1429 , 1996
- 13) Lindner GM , Wright RW Jr .
Theriogenology , 20 : 407-416 , 1983
- 14) Takahashi , S . , et al .
Theriogenology , 37 : 963-978 , 1992
- 15) 加藤博己 , 細井美彦 , 内海恭三 , 入谷明 .
家畜繁殖技術研究会誌 , 14 : 20-28 , 1992