

## 大型卵胞除去がウシの過剰排卵処理に与える影響 (第3報)

岡崎尚之 高仁敏光 長谷川清寿 白石忠昭

**要約** 本試験は、発情後 14 から 16 日目にウシ卵巣に観察される優勢卵胞と思われる大型卵胞を無作為に吸引除去することが、その後の胚採取成績に及ぼす影響について調査した。

供試牛は、場内に繋養する黒毛和種経産牛 20 頭で、過剰排卵処理は発情後 16 から 18 日目から開始した。試験区は過剰排卵処理 1 日目に 8mm 以上の大型卵胞を吸引除去する 1 区、過剰排卵処理 48 時間前に大型卵胞を吸引除去する 2 区、吸引処置を行わない 3 区とし、従来の処置法を対照区とした。1、2 および 3 区は、処理開始から 56 時間目まで CIDR を挿入した。卵巣の観察は、過剰排卵処理 48 時間前、処理開始時および胚採取時に超音波診断装置を用いて、左右卵巣の各サイズの卵胞数を計測した。

各区の過剰排卵処理前におけるサイズ別卵胞数の動態は、過剰排卵処理 48 時間前と処理開始時の各区の卵巣を観察した結果、大型卵胞を吸引した 2 区の大型卵胞数(n=9)は  $2.7 \pm 0.5$  個 (mean  $\pm$  S.E) から  $0.8 \pm 0.2$  個へ減少した ( $p < 0.01$ )。発情後 14 ~ 16 日目の卵巣動態を観察した 1 および 3 区の中卵胞数(n=21)は  $5.1 \pm 0.8$  個から  $6.8 \pm 0.8$  個に増加した ( $p < 0.05$ )。各区の採取胚数、正常胚数および正常胚率は、1 区(n=9)が  $19.8 \pm 7.1$  個、 $8.8 \pm 2.8$  個および  $57.7 \pm 15.0$  %、2 区(n=9)が  $8.6 \pm 2.5$  個、 $5.3 \pm 2.4$  個および  $61.3 \pm 15.9$  %、3 区(n=10)が  $17.4 \pm 4.8$  個、 $11.1 \pm 4.0$  個および  $65.1 \pm 13.6$  %、対照区(n=9)は  $11.4 \pm 2.6$  個、 $9.4 \pm 2.8$  個および  $74.9 \pm 9.9$  %であった。

各区の採取成績と過剰排卵処理前の各サイズの卵胞数について重回帰分析を行った結果、3 区の推定黄体数および採取胚数、4 区の推定黄体数と過剰排卵処理前の各サイズの卵胞数との間に相関が認められた ( $p < 0.05$ )。

以上のことから、CIDR を供用することにより、発情後 16 から 18 日目からの過剰排卵処理が可能であったが、発情後 14 から 16 日目にウシ卵巣に観察される大型卵胞の吸引除去は、その後の過剰排卵処理による胚採取成績に影響を及ぼさないことが示唆された。

島根県立畜産試験場研究報告第 34 号 : 1-5,2001

ウシの発情周期を超音波診断装置を用い経時的に観察すると、1 周期中に 2 から 3 回の卵胞集団の発育(卵胞波)がみられ、この集団に存在する直径 10mm 前後の大型卵胞(優勢卵胞)が、他の卵胞の発育に影響を及ぼすこと<sup>1,2,4,10)</sup>、さらに、過剰排卵処理時における直径 10mm 以上の卵胞の存在は過剰排卵の反応と採取成績を低下させ<sup>3,5,7)</sup>、卵巣中の卵胞の大きさを定期的に観察し、確認された主席卵胞を過剰排卵処理 48 時間前に吸引除去することにより胚採取成績が向上する<sup>3)</sup>ことが報告されている。しかし、超音波画像診断装置を用いた経時的な卵巣観察は、困難な場合が多い。

そこで、過剰排卵処理を開始する時に観察される大型卵胞の無作為な吸引除去と過剰排卵処理後の胚採取成績との関係について調査した。まず、発情後 9 から 14 日目から過剰排卵処理を行う際、処理 48 時間前の卵巣に観察される大型卵胞を吸引除去した結果、その後の胚採取成績において、胚採取数の向上が認めら

れた<sup>12)</sup>。次に、主席卵胞が出現していると言われている発情後 5 日目に卵巣に存在する大型卵胞を吸引除去し、過剰排卵処理を行ったところ、胚採取成績は、吸引後 24 時間目から処理開始した場合の正常胚率が向上した<sup>13)</sup>。

本試験における吸引する大型卵胞の対照は、発情排卵後 16 から 18 日目の最終卵胞波で発育した大型卵胞とし、この吸引除去処理が、過剰排卵処理後の胚採取成績に及ぼす影響を調査した。

### 材料および方法

供試牛は、場内に繋養する黒毛和種経産牛 20 頭で、卵巣の観察は、過剰排卵処理開始 48 時間前、処理開始時および胚採取時に牛経膈探卵用 7.5MHz コンベックス型探触子(Aloka, UST-9106P-7.5)を装着した超音波診断装置(Aloka, SSD-1200)を用いて行い、前報<sup>12,13)</sup>の区分に従い、左右の卵巣に見られる 2-4mm(小卵胞、

表 1 各区の過剰排卵処理前の卵巣動態

区 分	供試頭数	卵 胞 サイズ	処理48時間前	処理開始時	胚採取時 推定黄体数
1 区	10	大	2.0 ± 0.3	2.2 ± 0.4	19.9 ± 6.4
		中	5.0 ± 1.3	6.0 ± 1.2	
		小	39.0 ± 7.3	43.2 ± 6.4	
2 区	9	大	2.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	11.0 ± 2.5
		中	3.8 ± 0.8	5.3 ± 1.1	
		小	31.9 ± 4.9	33.3 ± 4.0	
3 区	11	大	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.4	17.1 ± 4.3
		中	5.1 ± 1.0 <sup>c</sup>	7.5 ± 1.0 <sup>d</sup>	
		小	36.6 ± 3.8	40.0 ± 4.0	
対照区	10	大	1.3 ± 0.2	1.8 ± 0.4	13.8 ± 2.5
		中	5.1 ± 1.5	6.0 ± 1.5	
		小	36.1 ± 4.5	38.2 ± 5.1	

値は平均値 ± 標準誤差  
 卵胞サイズは、大直径 8mm 以上、中:直径 5 ~ 7mm、小:直径 2 ~ 4mm  
 異符号間に有意差有り a,b;p<0.01、c,d;p<0.05

5-7mm(中卵胞および 8mm(大型卵胞)の、それぞれの卵胞数を計測した。大型卵胞の吸引は、超音波診断装置に牛経膈穿刺用 7.5MHz コンベックス型探触子に吸引針ガイドセットを装着し、卵胞内卵子採取針(富士平工業、18G、60cm)を用いて行った。

試験区は発情排卵後 16 から 18 日目に大型卵胞の吸引除去と膈内留置型プロジェステロン投与器具 (Inter-Ag, EAZI-BREED CIDR; CIDR)を挿入し、過剰排卵処理を開始する区を 1 区、14 から 16 日目に大型卵胞を吸引除去し、48 時間後に CIDR を挿入し、処理を開始する区を 2 区、16 から 18 日目に CIDR を挿入し、処理を開始する区を 3 区とし、発情後 9 から 13 日目に過剰排卵処理を開始する区を対照区とした。

過剰排卵処理は卵胞刺激ホルモン(デンカ製薬、アトリン R20; FSH)20AU を 3 日間漸減投与し、処理開始後 56 時間目に、プロスタグランジン F2 類縁体 (第一製薬、Iストラムト;PG)を 800 μg 投与することにより、発情誘起した。1、2 および 3 区は、PG 投与時に CIDR を除去した。発情確認後は、人工授精を 2 回行い、発情後 7 日目に非外科的に胚を回収した。

卵胞数の動態および胚採取成績は、一元配置分散分析あるいは student's-t 検定、各サイズの卵胞数と胚採取成績の関係は、重回帰分析により統計処理を行った。

表 2 各区の過剰排卵処理前における中卵胞数の推移

区 分	供試頭数	処理48時間前	処理開始時
1および3区	21	5.1 ± 0.8 <sup>a</sup>	6.8 ± 0.8 <sup>b</sup>
2 区	9	3.8 ± 0.8	5.3 ± 1.1
対 照 区	10	5.1 ± 1.5	6.0 ± 1.5

値は平均値 ± 標準誤差  
 中卵胞のサイズは、直径 5 ~ 7mm  
 異符号間に有意差有り a,b;p<0.05

結 果

各区の過剰排卵処理前におけるサイズ別卵胞数の動態は表 1 に示した。過剰排卵処理 48 時間前と処理開始時の各区の卵巣を観察した結果、大型卵胞を吸引した 2 区の大型卵胞数(n=9)は 2.7 ± 0.5 個(mean ± S.E)から 0.8 ± 0.2 個へ減少した(p<0.01)が、66.6%(6/9)頭の供試牛において新しい大型卵胞を観察した。1 および 3 区の 2-4mm の小卵胞数および 8mm 以上の大型卵胞はほぼ横這いに推移したが、3 区の中卵胞数(n=11)は 5.1 ± 1.0 個から 7.5 ± 1.0 個へと有意に増加した(p<0.05)。さらに、発情後 14 から 16 日目の卵巣動態を観察した 1 および 3 区と 7 から 12 日目の対照区の中卵胞数を比較してみると表 2)、対照区はほぼ横這いであったが、1 および 3 区の中卵胞数(n=20)は 5.1 ± 0.8 個から 6.8 ± 0.8 個に増加した(p<0.05)。

表 3 各区の胚採取成績

区分	供試頭数	採取胚数	正常胚数	正常胚率(%) <sup>1)</sup>	Aランク数	Aランク率(%) <sup>2)</sup>
1区	9	19.8±7.1	8.8±2.8	57.7±15.0	4.6±1.4	41.2±14.0
2区	9	8.6±2.5	5.3±2.4	61.3±15.9	4.0±2.0	37.2±12.2
3区	10	17.4±4.8	11.1±4.0	65.1±13.6	9.1±3.3	46.4±11.6
対照区	9	11.4±2.6	9.4±2.8	74.9±9.9	6.4±2.3	46.2±10.9

値は平均値±標準誤差

1) 正常胚率 = 正常胚数 / 採取胚数 × 100

2) Aランク率 = Aランク数 / 採取胚数 × 100

各区の胚採取成績を表 3 に示した。各区の成績 (mean ± S.E) は、胚回収に成功した供試牛について集計した。各区の採取胚数、正常胚数および正常胚率は、1区(n=9)が 19.8 ± 7.1 個、8.8 ± 2.8 個および 57.7 ± 15.0%、2区(n=9)が 8.6 ± 2.5 個、5.3 ± 2.4 個および 61.3 ± 15.9%、3区(n=10)が 17.4 ± 4.8 個、11.1 ± 4.0 個および 65.1 ± 13.6%、対照区(n=9)は 11.4 ± 2.6

個、9.4 ± 2.8 個および 74.9 ± 9.9 % であり、2区の採取胚数および正常胚数が他の区に比較して少ない傾向であった。A ランク数および A ランク率は、1区が 4.6 ± 1.4 個および 41.2 ± 14.0%、2区が 4.0 ± 2.0 個および 37.2 ± 12.2%、3区が 9.1 ± 3.3 個および 46.4 ± 11.6%、対照区は 6.4 ± 2.3 個および 46.2 ± 10.9% であり、3区の採取された A ランク数が多い傾向

表 4 各区の過剰排卵処理前 2 回の観察における中卵胞数の増減別卵巣動態

区分 <sup>1)</sup>	供試頭数	卵胞サイズ	処理開始	処理開始時	胚採取時
			48時間前		推定黄体数
1区減	4	大	2.0 ± 0.4	2.8 ± 0.9	21.0 ± 10.0
		中	7.5 ± 2.7 <sup>c</sup>	3.8 ± 2.1 <sup>d</sup>	
		小	36.8 ± 13.4	37.8 ± 12.4	
		大	2.0 ± 0.4	1.8 ± 0.3	19.2 ± 9.1
1区増	6	中	3.3 ± 1.0 <sup>c</sup>	7.5 ± 1.2 <sup>d</sup>	
		小	40.5 ± 9.4	46.8 ± 7.4	
2区減	5	大	2.6 ± 0.9	1.2 ± 0.2	11.2 ± 4.6
		中	4.4 ± 0.9 <sup>c</sup>	3.0 ± 0.9 <sup>d</sup>	
		小	36.0 ± 7.5	35.8 ± 6.1	
		大	2.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	10.8 ± 1.9
2区増	4	中	3.0 ± 1.4 <sup>c</sup>	8.3 ± 0.5 <sup>d</sup>	
		小	26.8 ± 6.1	30.3 ± 5.2	
3区減	4	大	2.0 ± 0.0	2.3 ± 0.5	21.8 ± 10.9
		中	7.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	6.5 ± 1.0 <sup>b</sup>	
		小	43.5 ± 8.2	43.5 ± 8.3	
		大	2.3 ± 0.4	2.3 ± 0.5	14.4 ± 3.3
3区増	7	中	3.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	7.6 ± 1.3 <sup>b</sup>	
		小	35.1 ± 3.7 <sup>c</sup>	38.8 ± 3.9 <sup>d</sup>	
対照区減	5	大	1.0 ± 0.0	1.4 ± 0.2	13.4 ± 4.1
		中	4.6 ± 2.4	3.8 ± 1.8	
		小	36.4 ± 6.3	34.8 ± 5.4	
		大	1.6 ± 0.2	2.2 ± 0.8	14.2 ± 3.2
対照区増	5	中	5.6 ± 2.1 <sup>c</sup>	8.2 ± 2.0 <sup>d</sup>	
		小	35.8 ± 7.3	41.6 ± 9.2	

値は平均値±標準誤差

卵胞サイズは、大:直径 8mm 以上、中:直径 5 ~ 7mm、小:直径 2 ~ 4mm

1) 中卵胞の増減は、減処理開始時卵胞数 - 処理開始 48 時間前中卵胞数 = n - 0

増処理開始時卵胞数 - 処理開始 48 時間前中卵胞数 = n > 0

異符号間に有意差有り a,b,p<0.01、c,d,p<0.05

表 5 各区の過剰排卵処理前 2 回の観察における中卵胞数の増減別胚採取成績

区 分 <sup>1)</sup>	供試頭数	採取胚数	正常胚数	正常胚率(%) <sup>2)</sup>	Aランク数	Aランク率(%) <sup>3)</sup>
1 区減	4	18.5 ± 10.8	8.3 ± 4.9	32.8 ± 22.1	3.5 ± 2.1	16.3 ± 12.7
	増	5	20.8 ± 10.5	9.2 ± 3.7	77.5 ± 17.1	5.4 ± 2.0
2 区減	5	10.2 ± 4.4	6.0 ± 4.1	70.3 ± 19.1	4.6 ± 3.4	37.0 ± 15.6
	増	4	6.5 ± 1.7	4.5 ± 2.7	50.0 ± 28.9	3.3 ± 1.9
3 区減	3	28.0 ± 12.7	14.0 ± 11.1	37.0 ± 30.4	12.7 ± 9.8	33.4 ± 26.8
	増	7	12.9 ± 3.9	9.9 ± 4.0	77.2 ± 13.6	7.6 ± 3.0
対照区減	5	13.4 ± 4.1	12.4 ± 4.7	75.0 ± 15.8	9.2 ± 3.5	55.0 ± 14.9
増	4	9.0 ± 3.2	5.8 ± 1.8	74.7 ± 13.2	3.0 ± 1.8	35.1 ± 16.3

値は平均値 ± 標準誤差

1)中卵胞の増減は、減処理開始時卵胞数 - 処理開始 48 時間前中卵胞数 = n < 0  
増処理開始時卵胞数 - 処理開始 48 時間前中卵胞数 = n > 0

2)正常胚率 = 正常胚数 / 採取胚数 × 100

3)Aランク率 = Aランク数 / 採取胚数 × 100

$$Y3cl = -4.94369 - 3.25081x1 - 0.77298x2 + 0.87224x3^{**}(R=0.81538^{*})$$

$$Y3em = -7.41983 - 1.46309x2 - 1.54724x2 + 1.00520x3^{***}(R=0.93025^{**})$$

$$Y4cl = 1.80155 - 3.10049x1^{*} + 0.03998x2 + 0.45391x3^{**}(R=0.91404^{**})$$

図 1 重回帰分析において相間が認められた胚採取成績と過剰排卵処理前のサイズ別卵胞数間の重回帰式

Y3cl:3 区推定黄体数、Y3em :3 区採取胚数、Y4cl:対照区推定黄体数、x1:大卵胞数(直径 8mm 以上)、x2:中卵胞数(直径 5-8mm)、x3:小卵胞数(直径 2-4mm)、R:重相関係数を示す。  
\*:p<0.05、\*\* : p<0.01、\*\*\* : p<0.001。

であった。

過剰排卵処理 48 時間前と処理開始時における各区の中卵胞数増減別の卵巣動態と胚採取成績を表 4 および 5 に示した。対照区の中卵胞減少群(n=5)を除いて中卵胞数が有意に増減しており、また、2 区の中卵胞増加群における大卵胞数の減少(p<0.01)、3 区の中卵胞増加群における小卵胞数の増加(p<0.05)がみられた。しかし、中卵胞数の増減はその後の胚採取成績へ影響を及ぼさなかった。

各区の採取成績と過剰排卵処理前の各サイズの卵胞数について重回帰分析を行った結果、3 区の推定黄体数および採取胚数、対照区の推定黄体数と過剰排卵処理前の各サイズの卵胞数との間に相関が認められ(p<0.05)、その回帰式は図 1 に示すとおりである。

### 考 察

ウシの発情周期を超音波診断装置を用い経時的に観察すると、1 周期中に 2 から 3 回の卵胞集団の発育ウェーブ(卵胞波)がみられ<sup>1,2,4,10)</sup>、2 ウェーブ群で発情周期の-0.2 日と 9.6 日、3 ウェーブ群で-0.5 日、9.0 日

および 16.0 日である<sup>4)</sup>ことが報告されている。過剰排卵処理 48 時間前と処理当日の 2 回卵巣観察を行い、卵巣内における各サイズの卵胞数の動態を観察した結果、1 区および 3 区の卵巣観察から、過剰排卵処理 48 時間前の発情後 14 から 16 日目には、8mm 以上の大型卵胞を観察した供試牛全頭が 1 から 3 個有しており 処理開始日(発情後 16 から 18 日目)においても同様であった。さら

に処理 48 時間前と処理開始日における 5-7mm サイズの卵胞数は、有意に増加したが、中卵胞数が減少する個体も認められた。観察した供試牛の卵胞波を観察していないため、発育ウェーブが 2 あるいは 3 ウェーブかどうか不明ではあるが、中卵胞数の減少した供試牛は最終卵胞波の主席卵胞の選択後と考えられ、増加した供試牛は選択期であると推察される。

超音波診断装置で観察される大型卵胞が他の卵胞発育を抑制する主席卵胞が閉鎖退行に向かっていている大型卵胞であるかを判断することは、卵巣の経時的観察が必要であり、Huhtinen et al.<sup>7)</sup> は、8mm を越えて、発育が止まった後も 3 日間優勢であるような優性期には入った卵胞あるいは 9mm を越え、4 日間優性期には入った卵胞が主席卵胞のひとつの基準となることを報告している。さらに、Sunderland et al.<sup>11)</sup> は、超音波診断装置による観察は卵胞成長の正確な測定法であるが、卵胞の大きさは優勢を論ずるに十分な指標とはならず、超音波診断と卵胞内エストロゲン/プロゲステロン(E/P)比が正確な卵胞の選抜、優勢、閉鎖を観察するのに必要であるとしている。処理開始 48 時間前の 8mm 以上の大

卵胞吸引(2区)は、処理開始時の大型卵胞数を有意に減少させるが、新たに大型卵胞を有している供試牛が観察される。また、中卵胞数が増加した牛群は減少した牛群に比べ、大卵胞数が有意に減少していることから、吸引した大型卵胞は主席卵胞であったと推察できるが、発情後 14 から 16 日目に観察される大型卵胞が主席卵胞かどうかは超音波診断装置による 1 回の観察で判断することは困難であり、血中ホルモン濃度等の他の指標との併用による推測方法を開発する必要があると思われる。

発情後 16 から 18 日目からの過剰排卵処理後の胚採取成績は、2 区の採取胚数、正常胚数が低い傾向であったが、各区の採取胚数、正常胚数、正常胚率、A ランク胚数および A ランク胚率に差は認められなかった。このことから、処理前の大型卵胞吸引およびその吸引時期は、その後の胚採取成績に影響を及ぼさないことが示唆された。また、発情後 16 から 18 日目に CIDR を挿入し、過剰排卵処理を行った 3 区の胚採取成績は、対照区と比較して同程度の成績であったことは、発情周期の後期においても、処理開始当日に CIDR 挿入を行うことにより、過剰排卵処理による胚採取が可能であると思われる。

ウシ卵胞発育ウェーブにおける主席卵胞の発育と末梢血中の FSH 濃度の動態は、ウシ卵胞発育ウェーブにおける卵胞の発育に FSH サージの先行が必要であり<sup>1,8,9)</sup>、FSH サージは卵胞の直径が 4-5mm 以上に達する 2 から 4 日前から始まり 1 から 2 日前にピークに達し、主席卵胞の選別時期には減少している<sup>1)</sup>ことが明らかにされている。さらに、主席卵胞の選別後はこの卵胞の顆粒膜細胞からインヒビリンが分泌され、他の卵胞を退行させる<sup>8,9)</sup>。過剰排卵処理時に存在するこの主席卵胞は、他の卵胞の発育を抑制し、この抑制が過剰排卵反応に影響するといわれている<sup>3,5,7,10)</sup>。我々も、Bungartz et al.<sup>3)</sup>の方法に準じて、発情後 7 から 12 日目に観察される大型卵胞を吸引除去し、その 48 時間後から過剰排卵処理をおこなった結果、採取胚数の向上は認められたが、正常胚数の増加はみられず、処理開始時に新たな大型卵胞が出現する個体が観察された<sup>12)</sup>。これは経時的な卵巣観察を行っていないため、吸引した大型卵胞が優性期か退行期の主席卵胞なのか判断せずに行ったことが原因と思われる。本試験の 2 区においても同

様で、発情後 14 から 16 日目に観察された 8mm 以上の卵胞を吸引除去したが、除去 48 時間後には新たに大型卵胞が出現しており、その卵胞からのインヒビリン分泌が過剰排卵処理後の胚採取成績に影響を及ぼしていると考えられる。また、Henderson et al.<sup>6)</sup>は、直径 5mm 程度の卵胞であれば主席卵胞と同様に、すでにインヒビリン分泌を獲得していることを報告していることから、8mm 以上の卵胞を主席卵胞と考えて吸引除去することについては、再度検討する必要がある。

各区の処理開始時の各サイズ別の卵胞数と胚採取成績について、重回帰分析を行った結果、小林ら<sup>10)</sup>の報告と同様に、過剰排卵処理による卵巣反応および採取胚数に対して、8mm 以上の卵胞の存在は負に、2-4mm の卵胞数は正に影響を及ぼしていることが示唆され、過剰排卵処理前における各サイズの卵胞数を計測することにより、その後の卵巣反応および採取胚数を推測することが可能であると思われる。

以上のことから、発情排卵後 14 から 18 日目に卵巣内に存在する大型卵胞は、大きさだけで主席卵胞であるかどうかを判断することは出来ず、そのため、吸引除去することによる胚採取成績の向上は認められなかった。しかし、発情排卵後 16 から 18 日目においても、CIDR 処理を併用することにより過剰排卵処理による胚採取が可能であることがわかった。

#### 引用文献

- 1) Adams GP. et al., J.Reprod.Fert., 94: 177-188. 1992.
- 2) Adams GP., Theriogenology, 41: 19-24. 1994.
- 3) Bungartz L. et al., J.Reprod.Fert., 101: 583-591. 1994.
- 4) Ginther OJ. et al., J.Reprod.Fert., 87: 223-230. 1989.
- 5) Guilbault L. et al., J.Reprod.Fert., 91: 81-89. 1991.
- 6) Henderson KM. et al., J.Reprod.Fert., 72: 1-8. 1984.
- 7) Huhtinen M. et al., Theriogenology, 37: 457-463. 1992.
- 8) Kaneko H. et al., J.Reprod.Dev., 41: 311-320. 1995.
- 9) 金子浩之, J.Reprod.Dev., 41: j113-j120. 1995.
- 10) 小林修一ら, 日畜会報, 68(1): 45-53. 1997.
- 11) Sunderland et al., J.Reprod.Fert., 101: 547-555. 1994.
- 12) 高仁敏光ら, 島根畜試研報, 33: 10-12. 2000.
- 13) 高仁敏光ら, 島根畜試研報, 33: 13-16. 2000.