

牛胚（受精卵）移植における受胎率向上に関する要因解析

小林大誠・久保田尚*1・千葉耕司*2・山下秀幸

Factor Analysis for Improvement of Conception Rate in Cow Embryo Transfer

Hiroshige KOBAYASHI, Takashi KUBOTA, Kouji TIBA and Hideyuki YAMASHITA

要 約

牛の胚移植における受胎率を向上させるため、乳用種体内受精胚移植成績（乳用種延べ1,665頭）を使用して、胚、受胎牛および移植技術の各要因と受胎率との関係について解析した。特に受胎率の低い凍結胚について受胎率に影響する要因についてとりまとめた。

1. 移植日における発情後日数別受胎率を移植凍結胚のステージで分類すると、有意差は認められないが、発育ステージが早い胚は移植日の発情後日数が早いと受胎率が高く、発育ステージが進むと移植日の発情後日数が遅いほど受胎率が高い傾向がみられた。
2. 受胎牛の産歴別受胎率は未経産で40.8%、1産で37.4%、2産で40.0%、3産で42.9%、4産以上で23.9%であり、未経産および3産と比較し4産以上で有意に受胎率が低かった ($P<0.05$)。
3. 発情後5日目の黄体がCランクの場合、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）の投与有無の比較では、投与有で受胎率が高くなる傾向が認められた。
4. 移植時の黄体はAランクと比較してA-1およびCランクで受胎率は有意に低かった ($P<0.01$ 、 $P<0.05$)。また、A-1ランクを除き、ランクが下がるにつれて受胎率が下がる傾向であった。
5. 移植時の子宮の収縮性は-と比較し、±および+で受胎率が有意に低かった ($P<0.01$)。
6. 移植時の出血の有無では、出血有で有意に受胎率が低かった ($P<0.05$)。
7. 移植部位による受胎率の差は認められなかった。

緒 言

胚移植は現在人工授精と並び乳牛や肉牛の改良に必須の技術である。しかし、その受胎率（体内受精胚）は新鮮胚で約51%、凍結胚で約45%と低く推移している¹⁾の現状である。

そこで本研究では受胎率の向上を図ることを目的として、当所で実施している乳用牛受精卵供給事業において移植時の受胎牛等の状況を記録した移植記録表のデータを基に、受胎率と各種要因（胚、受胎牛、移植技術）の関係について解析を行った。

材料および方法

1. 調査データ
1997年4月～2011年10月に移植を実施した胚の移植記録表に基づくデータ:1,665件
2. 移植胚
当所繁養の供胚牛に過剰排卵処理を行い、発情後7日目に子宮灌流法で回収した胚を使用した。胚は顕微鏡下で発育ステージを観察し、さらに変性細胞の割合により10%以下をA、10～30%をB、30～50%をC、50%以上をDとするランク付け²⁾を行った。このうち、新鮮胚移植にはA、B、Cランクの胚を用いた。また、胚の凍結はA及びBランク胚を用い、ダイレクト・トランスファー法³⁾により実施した。耐凍剤は1.8Mエチレングリコールを使用した。性別処理はLAMP法⁴⁾により行った。
3. 受胎牛
乳用牛受精卵供給事業の対象者となる県内農家及び

平成25年 8月31日受付

*1 千葉県南部家畜保健衛生所

*2 千葉県東部家畜保健衛生所

県機関繋養の乳用牛延べ1,665頭を対象とした。自然発情あるいは同期化処置による発情後5～8日目に黄体検査を実施し、図1に示す千葉県畜産総合研究センターの基準により評価し、移植を実施した。移植は頸管経由法により千葉県農業共済組合連合会、安房農業協同組合および当研究所が実施した。また、移植者の判断により、発情後5日目にhCG 1,500～3,000単位を投与した。



ランク	形状	基準
A		黄体形状は丸く大きく、黄体実質も充実したもの。
A-1		黄体形状、黄体実質とも中等のもの。
B		黄体突起部から実質にかけ水腫が認められるが、黄体実質は中等以上に充実しているもの。
B-1		黄体実質に多量の水腫が認められ、実質の脆弱なもの。
C		黄体形状は、やや小さく、黄体実質はやや硬いもの。
D		黄体形状は小さく実質は硬いもの。
E		黄体はほとんど存在しないもの。

図1 発情後7日目の黄体の形状と基準

4. 調査項目

以下の項目について、受胎率との関係を解析した。

(1) 胚の要因

凍結の有無、胚の発育ステージ（桑実胚、後期桑実胚、初期胚盤胞、胚盤胞、拡張胚盤胞）、胚のランク及び性別別処理の有無で分類し、それぞれの受胎率を比較した。

(2) 受胎牛の要因

移植が実施された季節、特に夏季の高温による受胎率への影響を確認するため、7～9月を夏季とし、その他の季節との受胎率を比較した。また、受胎牛の産歴、分娩後月数、移植日の発情後日数、発情後5日目および移植時の黄体検査による黄体ランク、共存卵胞の有無、子宮の収縮性、hCG投与の有無について分類し、受胎率を比較した。

(3) 移植技術の要因

凍結胚の融解から移植までの移植作業時間（5分以内、5分以上）、移植部位（子宮角深部、浅部）、移植時の子宮内出血の有無について分類して受胎率を比較した。

5. 解析方法

カイ二乗検定または例数が5以下のものについてはフィッシャーの正確確率検定⁵⁾を用いた。

結果および考察

1. 胚の要因

(1) 凍結の有無

凍結の有無別受胎率（表1）は、新鮮胚が51.0%、凍結胚は38.0%となり、凍結胚の受胎率は有意に低かった ($P<0.01$)。

表1 凍結の有無別受胎率

	移植頭数	受胎頭数	受胎率%
新鮮胚	247	126	51.0 ^A
凍結胚	1418	539	38.0 ^B

異符号間に有意差あり 大文字: $P<0.01$

(2) 胚の発育ステージ

発育ステージ別受胎率（表2）は凍結胚において、桑実胚20.0%、後期桑実胚40.4%、初期胚盤胞39.8%、胚盤胞32.8%、拡張胚盤胞21.2%となり、後期桑実胚、初期胚盤胞に対して、胚盤胞は低い傾向が認められ、拡張胚盤胞は有意に低かった ($P<0.05$)。一方新鮮胚においては、発育ステージ間での受胎率に差は認められず、村田ら⁶⁾、坂本ら⁷⁾の報告と同様であった。

今後、胚盤胞、拡張胚盤胞においても良好な受胎率を得るために、耐凍剤の改良や凍結方法の変更等の検討が必要であると考えられた。

表2 凍結胚及び新鮮胚における胚の発育ステージ別受胎率

	発育ステージ	移植頭数	受胎頭数	受胎率%
凍結胚	桑実胚	10	2	20.0
	後期桑実胚	431	174	40.4 ^a
	初期胚盤胞	679	270	39.8 ^a
	胚盤胞	195	64	32.8
	拡張胚盤胞	33	7	21.2 ^b
新鮮胚	桑実胚	10	3	30.0
	後期桑実胚	146	76	52.1
	初期胚盤胞	65	31	47.7
	胚盤胞	18	9	50.0
	拡張胚盤胞	8	6	75.0

異符号間に有意差あり 小文字: $P<0.05$

(3) 胚のランク

胚のランク別受胎率（表3）は、凍結胚ではAランク38.5%、Bランク35.5%であり差は認められなかった。新鮮胚においては、Aランク48.7%、Bランク52.6%、Cランク45.7%となり、受胎率に差は認められなかった。

(4) 凍結胚における性別別処理の有無

性別別処理胚の受胎率（表4）は32.1%、無処理胚は38.4%となり、受胎率に差は認められなかった。

表3 凍結胚および新鮮胚における胚のランク別受胎率

	ランク	移植頭数	受胎頭数	受胎率%
凍結胚	A	1198	461	38.5
	B	220	78	35.5
	C	—	—	—
新鮮胚	A	39	19	48.7
	B	173	91	52.6
	C	35	16	45.7

表4 凍結胚における性判別処理の有無別受胎率

性判別の有無	移植頭数	受胎頭数	受胎率%
有	84	27	32.1
無	1334	512	38.4

2. 凍結胚における受胎率の要因

(1) 移植日の季節

移植日の季節別受胎率(表5)は夏季(7月~9月)で37.1%、夏季以外で38.8%となり、移植日の季節別受胎率に差は認められなかった。

表5 凍結胚における移植日の季節別受胎率別受胎率

季節	移植頭数	受胎頭数	受胎率%
夏季(7月~9月)	356	132	37.1
夏季以外	1044	405	38.8

夏季において、人工授精では暑熱の影響による受胎率の低下が問題となっているが、発生初期の胚も熱感作を受けやすく、発生阻害が起こりやすい一方、発生の進んだ胚では発生初期の胚よりも熱感作に対する耐性が強いとの報告^{8,9)}があり、移植胚は発育ステージが進んでいることから、夏季における胚移植の受胎率の低下が起こらなかったものと考えられる。ただし、坂本ら⁷⁾は夏季において胚移植の受胎率は低下すると報告しており、また、暑熱ストレスは子宮環境の悪化、ホルモンレベルの低下を招き、受胎率が低下するとの報告¹⁰⁾もあることから、暑熱ストレスによる母体への影響には注意を払う必要がある。

(2) 産歴

産歴別受胎率(表6)は、未経産40.8%、1産37.4%、2産40.0%、3産42.9%、4産以上では23.9%となり、4産以上では未経産および3産に対して有意に低く($P<0.05$)、1産、2産に対しても低い傾向が認められた。

未経産牛の受胎率が高いとする報告^{7,11)}は多く、これは人工授精や分娩を重ねることで子宮内の汚染が進

表6 凍結胚における産歴別受胎率別受胎率

産歴	移植頭数	受胎頭数	受胎率%
未経産	211	86	40.8 ^a
1産	278	104	37.4
2産	130	52	40.0
3産	70	30	42.9 ^a
4産以上	46	11	23.9 ^b

異符号間に有意差あり 小文字: $P<0.05$

み、繁殖障害の牛の割合が多くなることなどから、産歴の多い牛の受胎率は低下するものと考えられる。今回の結果では、未経産と比較して3産までの受胎率に差は認められなかったため、3産以内であれば受胎率への影響は少ないと考えられる。

(3) 分娩後月数

分娩後月数別受胎率(表7)は分娩後2ヵ月未満で40.5%、2~3ヵ月で42.3%、3~6ヵ月未満で36.7%、6ヵ月以上で37.3%となり、受胎率に差は認められなかった。

表7 凍結胚における分娩後月数別受胎率

分娩後月数	移植頭数	受胎頭数	受胎率%
2ヵ月未満	37	15	40.5
2~3ヵ月未満	97	41	42.3
3~6ヵ月未満	221	81	36.7
6ヵ月以上	185	69	37.3

(4) 胚の発育ステージおよび移植日の発情後日数

胚の発育ステージ及び移植日の発情後日数別受胎率(表8)において有意差は認められないものの、後期桑実胚では発情後6日目、7日目と比較し8日目の受胎牛で受胎率が低下した。それに対し、初期胚盤胞、胚盤胞、拡張胚盤胞と、発育ステージが進むにつれて発情後6日目の受胎牛の受胎率は低くなり、発情後8日目の受胎牛の受胎率が高くなる傾向であった。

移植日については、胚の発育ステージと受胎牛の発情周期が同調可能な7日 \pm 1日に移植を行う¹²⁾とされているが、胚の発育ステージと移植日の発情後日数との同調性を考慮する必要があると考えられた。

(5) 発情後5日目の黄体ランク及びhCG投与の有無

5日目の黄体ランク及びhCG投与の有無別受胎率(表9)においては、Cランク以外の黄体について5日目のhCG投与による効果を確認することはできなかった。しかし、Cランクの黄体ではhCG未投与の場合、受胎率はA、B-1に対してCランクで低い傾向が認められ

表8 凍結胚における胚の発育ステージ及び移植日の発情後日数別受胎率(%)

発育ステージ	6日目移植	7日目移植	8日目移植
後期桑実胚	43.8 (7/16)	40.4 (107/265)	26.9 (7/26)
初期胚盤胞	25.0 (8/24)	41.0 (154/376)	34.3 (24/70)
胚盤胞	14.3 (1/7)	34.6 (36/104)	31.0 (9/29)
拡張胚盤胞	0.0 (0/1)	25.0 (4/16)	40.0 (2/5)

()は受胎数/移植数

たのに対し、投与した場合は他のランクとの差は認められなかった。このことからCランクの黄体に対してはhCG投与の効果があると考えられた。

表9 凍結胚における発情後5日目の黄体ランク及びhCG投与の有無別受胎率

5日目黄体ランク	hCG投与	移植数	受胎数	受胎率%
A	有	36	14	38.9
	無	55	25	45.5
A-1	有	181	68	37.6
	無	131	45	34.4
B	有	100	39	39.0
	無	38	14	36.8
B-1	有	69	23	33.3
	無	18	9	50.0
C	有	58	22	37.9
	無	16	3	18.8

(6) 移植時の黄体ランク

移植時黄体ランク別受胎率(表10)は、Aランク46.1%、A-1ランク34.1%、Bランク38.6%、B-1ランク37.5%、Cランク22.6%となり、Aランクと比較してA-1及びCランクで受胎率は有意に低下した($P<0.01$ 、 $P<0.05$)。

表10 凍結胚における移植時の黄体ランク別受胎率

黄体ランク	移植頭数	受胎頭数	受胎率%
A	388	179	46.1 ^{A a}
A-1	422	144	34.1 ^B
B	57	22	38.6
B-1	16	6	37.5
C	31	7	22.6 ^b

異符号間に有意差あり 大文字: $P<0.01$ 、小文字: $P<0.05$

黄体ランクと受胎率の関係については、「発情観察が行われ明瞭な黄体が形成されていれば大きさ、形状によるランク分けは重要でない」^{12,13}、「黄体内部の液体貯留が認められても血中プロゲステロン値に影響はないため、移植の対象となる」¹⁴との報告がある一方、「黄体突起が明瞭なもので良好な受胎率が得られた」

^{11,15}、「大きさ、突起の形状、弾力性の所見を併せて評価する」¹⁶との報告があり、黄体のランク分けに対する評価は様々である。今回の結果では形状と実質の充実度を併せた黄体の評価は受胎率を高めるための有効な手段と考えられた。内山ら¹⁷は、今回の調査におけるCランクと同様と考えられる「小型で硬い黄体」の場合の受胎率は低くなると報告していることから、黄体が小さく硬い場合には移植は避けるべきと考えられた。

(7) 発情後5日目及び移植時の黄体ランク別受胎率

発情後5日目及び移植時の黄体ランク別受胎率(表11)は、有意な差は認められなかったが、5日目と比較して移植日に黄体のランクが上がっている場合には、ランクが変わらないあるいは下がっている場合と比較して、受胎率が高くなる傾向が見られた。

この時期の黄体は急速に成長するため、1日の違いでも黄体の大きさが異なるとされており¹⁸、また、後藤¹⁹は発情後5~6日目の検査で黄体が小さく移植不可と判断した場合でも、1日~2日後に再度黄体検査を行い移植の可否を判断すべきと報告している。今回の結果からも5日目の黄体検査で移植の可否は決定せず、1日~2日後に再度黄体検査を行い、移植の可否を最終決定する必要があり、5日目の黄体と比較することで、移植決定の正確な判断ができるものと考えられた。

(8) 移植時の共存卵胞の有無

移植時の共存卵胞の有無別受胎率(表12)は、有37.8%、無38.5%であり差は認められなかった。これは坂本ら¹⁵、前原ら¹¹の報告と同様であり、黄体期の卵巣には常に卵胞が存在し、触診可能な卵胞が存在しても正常な状態であることから、移植に当たって共存卵胞の有無を考慮する必要はないと考えられた。

表12 凍結胚における移植時の共存卵胞の有無別受胎率

共存卵胞の有無	移植頭数	受胎頭数	受胎率%
有	246	93	37.8
無	810	312	38.5

表11 凍結胚における発情後5日目及び移植時の黄体ランク別受胎率 (%)

5日目の黄体 ランク	移植時の黄体ランク				
	A	A-1	B	B-1	C
A	44.7 (38/85)	25.0 (2/8)	-	-	-
A-1	44.7 (55/123)	32.7 (48/147)	25.0 (2/8)	0 (0/1)	0 (0/1)
B	40.0 (16/40)	36.0 (18/50)	40.0 (4/10)	100 (2/2)	0 (0/2)
B-1	38.9 (7/18)	46.2 (12/26)	53.8 (7/13)	20.0 (1/5)	50.0 (2/4)
C	50.0 (11/22)	36.4 (8/22)	50 (1/2)	0 (0/1)	14.3 (2/14)
D	50.0 (1/2)	33.3 (1/3)	-	-	-

(9) 移植時の共存卵胞の有無と子宮の収縮性

移植時の共存卵胞存在下の受胎率(表13)は、子宮の収縮性-で47.6%、±で36.0%、+で28.8%、共存卵胞非存在下での受胎率は、収縮性-で47.2%、±で34.0%、+で38.8%となり、子宮に収縮が認められた場合には共存卵胞の有無に関わらず受胎率は低かった。

表13 凍結胚における移植時の共存卵胞の有無別及び子宮の収縮性別受胎率

卵胞有無	収縮性	移植頭数	受胎頭数	受胎率%
有	-	42	20	47.6 ^a
	±	111	40	36.0
	+	73	21	28.8 ^b
無	-	159	75	47.2 ^A
	±	288	98	34.0 ^B
	+	258	100	38.8

異符号間に有意差あり 大文字: $P<0.01$ 、小文字: $P<0.05$

坂本ら¹⁵⁾は、収縮が認められた場合には受胎率に負の作用があり、認められない場合は正の作用があることを報告し、佐伯ら²⁰⁾も収縮がほとんどないので良好な受胎率を得ていると報告している。今回の結果でも、子宮の収縮が認められた場合、受胎率が低下したことから、受胎牛の選定には子宮の収縮性を考慮する必要性が考えられた。

また、坂本ら¹⁵⁾、前原ら¹¹⁾は、一部の共存卵胞は機能性卵胞として発情様反応を起こし、受胎率に悪影響を及ぼす可能性を報告している。今回は機能性卵胞の確認を行っていないが、収縮が強い場合、共存卵胞存在下で受胎率がより低かったことから、機能性卵胞として受胎率に悪影響を与えている可能性が示唆された。

今回の結果から、黄体のランクおよび子宮の収縮性が受胎率に影響を及ぼしていることが考えられた。特に、堂地¹³⁾は触診による黄体検査の誤診率の高さを指摘していることから、直腸検査による黄体の評価のみで移植の可否を判断することは避け、機能性卵胞の存在、子宮の収縮等を併せて、総合的な判断を行うことでより精度の高い受胎牛の選定が可能になると考えられた。

3. 凍結胚における移植技術の要因

(1) 移植時出血の有無

出血の有無別受胎率(表14)は、有19.4%、無37.8%であり、移植時に出血が認められた場合、受胎率は有意に低くなり($P<0.05$)、前原ら¹¹⁾と同様の結果となった。

表14 凍結胚における移植時出血の有無別受胎率

出血の有無	移植頭数	受胎頭数	受胎率%
有	31	6	19.4 ^b
無	725	274	37.8 ^a

異符号間に有意差あり 小文字: $P<0.05$

血液中の補体は胚に有害とされており²¹⁾、また子宮内膜の損傷によりPGF2 α が分泌され黄体の退行がおこることが考えられるため、極力出血を伴わないように移植を行うべきと考えられた。

(2) 移植作業時間

移植作業時間別受胎率(表15)は、5分未満39.9%、5分以上32.0%となり5分以上になると受胎率は有意に低くなり($P<0.05$)、佐伯ら²⁰⁾と同様であった。

表15 凍結胚における移植作業時間別受胎率

時間	移植頭数	受胎頭数	受胎率%
5分未満	727	290	39.9 ^a
5分以上	331	106	32.0 ^b

異符号間に有意差あり 小文字: $P<0.05$

ダイレクト法による凍結の場合、耐凍剤の長時間の感作は胚の生存性に悪影響を及ぼす²²⁾とされていることから、融解後なるべく早く移植することが必要であり、また長時間の移植作業により、子宮が刺激され出血時同様受胎率が低下することも考えられるため、移植作業はなるべく速やかに行う必要があると考えられた。

(3) 移植部位

移植部位を子宮角浅部、深部に分類した場合の受胎率(表16)は、子宮角浅部39.1%、深部37.8%であり、差は認められなかった。

表16 凍結胚における移植部位別受胎率

部位	移植頭数	受胎頭数	受胎率%
浅部	64	25	39.1
深部	666	252	37.8

前原ら¹¹⁾は深部移植で受胎率は高くなると報告しているが、一方で内山ら¹⁷⁾は深部よりも浅部で良好な受胎率を得られていると報告しており、移植部位に関する評価はさまざまである。ただし、「無理な子宮角深部への移植を行うよりも子宮内膜への刺激を避けるべき」とする報告^{10,16,23)}もあり、無理な子宮角深部への移植は、出血の誘発や移植時間の長期化などを招く恐れがあるため、子宮内膜に刺激を与えず、速やかに移植を終えることに重点をおくべきであると考えられた。

これらの結果より、受胎率を向上させるためには受胎牛は3産以下のものを選び、発情後5日目の黄体検査で黄体がCランクであった場合、hCGを投与する。また、移植日は発情後日数と胚の発育ステージを同調させることが望ましく、移植時の直腸検査で、黄体が大きく実質が充実し、かつ、子宮の収縮性がないものを実施する。最後に、移植時は移植部位よりも出血させず速やかに移植作業を終えることに重点を置くべきである。

引用文献

- 1) 社団法人日本家畜人工授精師協会 (2010)、家畜人工授精講習会テキスト (家畜体内受精卵・家畜体外受精卵移植編):6-7
- 2) 社団法人日本家畜人工授精師協会 (2001)、家畜人工授精講習会テキスト (家畜受精卵移植編):172-173
- 3) 社団法人日本家畜人工授精師協会 (2010)、家畜人工授精講習会テキスト (家畜体内受精卵・家畜体外受精卵移植編):157-163
- 4) 高野 弘・納富継宣 (2001)、簡易・迅速な遺伝子増幅法:LAMP法の概要、月刊HACCP 7 (9) :62-68
- 5) 北川敏男・稲葉三男 (1980)、統計学通論、共立出版株式会社:159-160
- 6) 村田宏之・井上 貢・田島敏夫 (2008)、牛胚移植における回収正常胚数及び発育段階の受胎率への影響、千葉畜セ研報 8:9-10
- 7) 坂本秀樹・本多 巖・菅野美樹夫・篠木 忠 (2004)、牛胚移植の受胎率に影響を及ぼす要因の解析、福島畜産試験場研究報告12:3-7
- 8) 上野 修・町田和明・五十嵐康德・荒井 徹・関沢文夫・久利生正邦・飛田府宣 (1995)、夏季における胚移植の受胎成績、東日本家畜受精卵移植技術研究会大会研究会報9:61-62
- 9) 高橋昌志・山中賢一・阪谷美樹 (2009)、牛繁殖性に及ぼす暑熱ストレス、日本胚移植学雑誌31-1:9-17
- 10) Rensis F.D and Scaramuzzi R.J (2003) ,Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow,Theriogenology 60: 1139-1151
- 11) 前原 智・岡崎尚之・高仁敏光・白石忠昭 (2000)、ウシの胚移植における受胎率に及ぼす要因の検討、島根県立畜産試験場研究報告33:1-4
- 12) 遠藤健治・小林一彦・西片芳恵・水野仁二、商業的胚移植における受胎率、東日本家畜受精卵移植技術研究会大会研究会報11:13-20
- 13) 堂地 修 (2001)、胚移植の受胎率を考える、LIAJ News69:1-8
- 14) 社団法人家畜改良事業団 (2009)、受精卵移植技術実践マニュアルQ&A集:9
- 15) 坂本秀樹・本多 巖 (2004)、牛胚移植における最適受胎牛選定技術の野外応用、福島県畜産試験場研究報告12:8-12
- 16) 佐伯拓三・熊谷光洋・伊藤博康・関沢文夫・大町雅則・明田川寛道・松野 弘・岩尾 健・岡崎尚之・笠正二郎・箴 雅生・藤山雅照 (1999)、牛胚移植時の直腸検査成績と受胎牛選定率および移植後の受胎率との関係、畜産の研究53-6:673-676
- 17) 内山保彦・佐藤太郎・藤原信子・佐藤義政・梅田雅夫 (2007)、牛凍結胚ダイレクト移植における受胎率向上対策について、新潟県農業総合研究所畜産研究センター研究報告16:12-16
- 18) 社団法人日本家畜人工授精師協会 (2010)、家畜人工授精講習会テキスト (家畜体内受精卵・家畜体外受精卵移植編):110-120
- 19) 後藤太一 (2011)、家畜人工授精266:1-7
- 20) 佐伯拓三・檜垣一成 (1997)、受胎牛の選定及び受胎率に及ぼす各種要因の調査、愛媛県畜産試験場研究報告14:9-14
- 21) 社団法人日本家畜人工授精師協会 (2010)、家畜人工授精講習会テキスト (家畜体内受精卵・家畜体外受精卵移植編):119
- 22) 社団法人日本家畜人工授精師協会 (2010)、家畜人工授精講習会テキスト (家畜体内受精卵・家畜体外受精卵移植編):170-171
- 23) 社団法人家畜改良事業団 (2009)、受精卵移植技術実践マニュアルQ&A集:24