

受精卵移植技術高度化に関する試験 (1) 牛の受精卵移植におけるhCG投与が受胎率に与える影響

坂上信忠・秋山清・田中嘉州・橋村慎二・仲澤慶紀・岸井誠男

Effects of human Chorionic Gonadotropin (hCG) Administration on the Pregnancy Rates in bovine Embryo Transfer Recipient.

Nobutada SAKAGAMI, Kiyoshi AKIYAMA, Yoshikuni TANAKA, Shinji HASHIMURA, Yoshinori NAKAZAWA and Yoshio KISHII

牛受精卵移植は、家畜の改良速度を速める有効な技術の1つである。受精卵移植の普及促進のためには、一層の受胎率向上が望まれる。そこで、受胎率を向上させる方法として、受卵牛への胎盤性性腺刺激ホルモン (hCG) の投与について検討した。発情日をday0として受精卵移植前々日 (day5) にhCG1,500単位を筋肉内投与した区をDAY5区、移植前日 (day6) に投与した区をDAY6区、移植日に投与した区をDAY7区、発情後14日目に投与した区をDAY14区、hCGを投与しない無投与区を対照区とした。移植後の受胎率は、DAY5区で60.0%、DAY6区で54.5%、DAY7区で70.0%、DAY14区で38.1%、対照区で41.9%であった。また、血中プロゲステロン濃度は、DAY6区で発情後14日目において対照区に比べて有意に高くなった。このことから、hCGは移植前に投与することで血中プロゲステロン濃度を高め、受胎率を向上させる可能性があることが示唆された。

キーワード：牛・受精卵移植・受胎率・hCG・プロゲステロン

畜産業における育種改良を進める手法の1つとして受精卵移植技術が普及してきている。日本における受精卵移植の実施頭数は、昭和45年度に実施状況調査が行われて以来、年々増加してきた。しかし、近年では受精卵の受胎率もここ数年40~50%程度で停滞しており、移植の実施頭数も全国的に伸び悩んでいる。これは本県においても同様であり、堂地¹⁾の示した経営的に必要な受胎率50~60%及び鈴木²⁾の示した大幅な普及と定着化が期待できるとする60~70%の受胎率には達していない。この受胎率の低迷が県内における受精卵移植が農家段階で普及しない最大の原因と考えられ、より一層の受胎率の向上が望まれる。

血中プロゲステロン濃度と受胎に関しては、乳牛³⁾や黒毛和種牛^{4) 5)}においていくつか報告されており、Nishigai et al.^{4) 5)}は凍結受精卵の移植前日や移植日の血中プロゲステロン濃度が高く、エストロゲン濃度が低い受卵牛において、受胎率が高いと報告している。これは、血中プロ

ゲステロン濃度が低い牛は、負のフィードバック作用が不十分でLHパルスが抑制されず、黄体と共存する卵胞が発育してエストロゲンが活発に分泌されていることにより受胎率が低いのではないかと考えられている⁶⁾。このようなことから、人工授精や受精卵移植において、受胎率を向上させるためにプロゲステロン^{7) 8)}、胎盤性性腺刺激ホルモン (hCG)^{9) 10)}、GnRH類縁物質^{11) 12) 13) 14)}を移植前後に投与することが検討されている。なかでもhCGは黄体ランクの低い牛でも黄体機能を向上させ、受胎の可能性を高めることから受卵牛頭数の増加が図られ、今後の受精卵移植技術の普及に貢献する可能性がある。しかし、その投与時期は移植前々日¹⁵⁾ (発情日をday0として、day5)、移植前日¹⁶⁾、移植時¹⁷⁾、day15¹⁸⁾と様々な報告があるが、もっとも効果的な投与時期を明確に示している報告は少ない。そこで本試験では、胎盤性性腺刺激ホルモン (以下hCG) の投与時期と受胎率との関係について検討を行った。

なお、本試験は農林水産省の国庫補助である受精卵普及定着化事業（技術高度化）による10県（青森、秋田、宮城、神奈川、静岡、奈良、宮崎、高知、山口、大分）の共同試験で実施した当所の3カ年にわたる成績である。

材料及び方法

1. 受卵牛

所内で飼養している黒毛和種経産牛13頭、未經産牛3頭、ホルスタイン種経産牛15頭、未經産牛2頭と所外で飼養されているホルスタイン経産牛60頭、未經産牛2頭の合計93頭を受卵牛とした。産歴は、0～7産で、平均年齢4.2歳、平均産次は1.9産であった。受卵牛は品種、年齢、産歴、分娩後日数ともに各区にほぼ偏りがないように配置した。

受卵牛の発情確認は、所内飼養の牛ではスタンディング発情等発情兆候で、所外のものは発情兆候や排尿を示した牛を技術者が直腸検査により排卵確認して供試した。

2. 受精卵の採取方法

移植した受精卵は、全て所内で採取したもので、その方法としてまず黄体ホルモン製剤(CIDR)挿入後10日目にFSH製剤（アントリン：川崎三鷹製薬）により過剰排卵を行い（総量20AUを3日間漸減投与；5/5,3/3,2/2）、FSH投与開始後48時間目にPGF_{2α}アナログとしてクロプロステノール（エストラメイト「TSA」：武田シェリングプラウアニマルヘルス㈱）750μgを頸部筋肉内に投与した。その後14日目夕方及び15日目朝に人工授精した後、21日目に非外科的に採取した後期桑実胚から拡張胚盤胞の受精卵を移植、凍結に用いた。

3. 供試した受精卵

受精卵の品種別では、黒毛和種が89個、ホルスタイン種が4個であった。新鮮卵及び凍結卵別では、新鮮卵10個、凍結卵83個であり、凍結卵は、ダイレクトトランスファー法で凍結したものが59個、ガラス化保存法によるものが24個であった。品質ランクは、家畜人工授精テキスト、家畜受精卵移植編¹⁾⁹⁾を参考として判定したAランクが7個、A'ランクが13個、Bランクが68個、B'ランクが5個であった。発育ステージは、後期桑実胚が4個、初期胚盤胞が18個、胚盤胞が69個、拡張胚盤胞が2個であった。

4. 移植技術者

移植技術者は7名で、所内の技術者が4名、所外

の技術者が3名であった。

5. 試験方法

図1に試験区分を示した。受精卵移植は、発情日をday0としてday7又はday8に行い、DAY5区では、hCG（動物専用ペペローゲン1,500単位：三共エール薬品㈱）を移植前々日(day5)に、DAY6区では移植前日(day6)に、DAY7区は移植日(day7or day8)に、DAY14区はday14に頸部筋肉内に投与した。対照区は、hCGを含む一切のホルモン製剤を投与しない無投与とした。なお、試験は3カ年にわたり、平成13、14年度にDAY6区、DAY14区、対照区、平成15年度にDAY5区、DAY7区、対照区を行った。

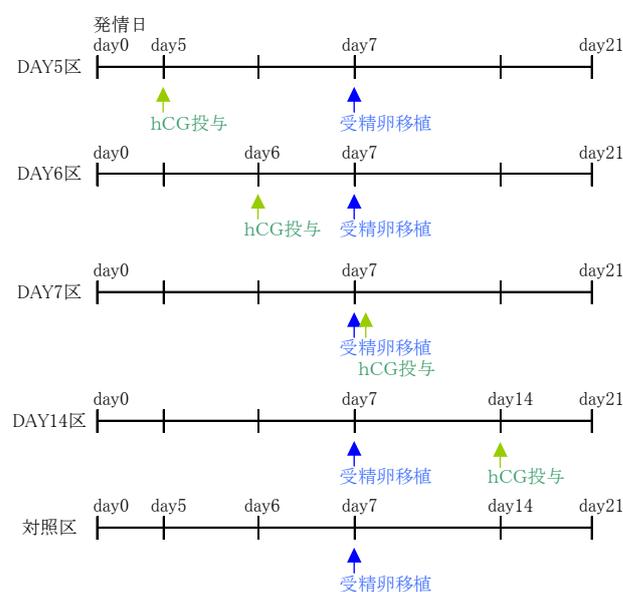


図1 試験区分

6. 調査項目及び方法

発情時及び移植時の調査を「家畜共済における臨床病理検査要領」²⁾⁰⁾を参考に調査し、表1に示した。経産牛のみ最終分娩日から移植までの日数を調査し、各受卵牛とも、発情所見、その時の排卵所見を記録し、移植時の卵巣所見として、黄体の大きさは、移植日に長径が20mm以上を1（大）、10mm以上20mm未満を2（中）、10mm未満を3（小）とし、弾力性についてはA（弾力有）、B（若干硬）、C（硬い）の3段階とした。さらに移植時における共存卵胞の有無、子宮の状態、形状、収縮弾力、肥厚と、その他所見として、移植の難易度、移植時の出血の有無等を調査した。

表1 調査項目と基準

最終分娩日から移植までの日数	経産牛のみ
発情所見	スタンディングの有無、その他所見
排卵所見	排卵日、排卵確認日及びその所見
移植日	発情から移植までの日数、試験区では投薬日
黄体所見	大きさについて 1 (長径20mm以上、大)、2 (長径10mm以上20mm未満、中) 3 (10mm未満、小) の3段階 弾力性について A (弾力有)、B (若干硬)、C (硬い) の3段階 その他所見について 突起が明瞭等
共存卵胞	有無、大きさ、位置等
子宮所見	太さについて 移植者の指単位 (0.5指単位) 形状について 円・半円・楕円・扁平で記録 収縮性・弾力性について ー、±、+、++、+++の5段階 肥厚について ー、±、+、++、+++の5段階
移植時所見	難易度を、難・易で記録 出血を、有・無で記録

7. 副黄体の形成状況

平成15年度に行ったDAY5区、DAY7区の所内の供試牛9頭については、移植後14日目までの間に、副黄体の形成状況を調査した。

8. 妊娠診断

妊娠鑑定は、発情後約60日目に、フィールドでは胎膜触診法で、当所では超音波診断装置 (日立メディコ社製 ECHOPAL II ;EUB-405B,リニア探触子 I 型7.5MHz;EUP-033J)により行った。

9. 血液の採取及び処理方法

hCG投与による受卵牛の血中プロジェステロン (P4)濃度及び血中エストラジオール17β (E2)濃度の変化を調べるため、経時的に採血を行った。

血液は、頸静脈からヘパリン入り真空採血管にて採血した。採血した静脈血は、直ちに破碎氷中のクーラーボックスに保冷し、速やかに0℃、3,000回転、60分の条件で冷却遠心し、血漿を-40℃で凍結保存した。凍結保存した血漿は、P4については二抗体法酵素免疫測定法²¹⁾によりE2濃度についてはRIA法²²⁾により測定を行った。

10. 統計処理

統計処理は、コンピューターソフトSPSS²³⁾を用い、受胎性については、Pearsonのカイ二乗検定もしくはFisherの直接確率計算法を、また血中ステロイドホルモン濃度の比較は、一元配置の分散分析後にTukey法により多重検定を行い、危険率5%(P<0.05)未満を有意差ありと判定した。

結 果

1. 受胎成績と受卵牛の状況

表2、図2に移植後の受胎成績を示した。それぞれの受胎率は、DAY5区が60.0%、DAY6区が54.5%、DAY7区が70.0%、DAY14区が38.1%、対照区が41.9%となっており、各区に有意差はないが、DAY5区、DAY6区、DAY7区がDAY14区や対照区と比較して受胎率は高い数値であった。

試験区	hCG投与	受胎状況(%)
DAY5区	移植前々日	6 / 10 ^注 (60.0)
DAY6区	移植前日	12 / 22 (54.5)
DAY7区	移植日	7 / 10 (70.0)
DAY14区	発情日から14日目	8 / 21 (38.1)
対照区	無投与	13 / 31 (41.9)

注1:受胎頭数 / 移植頭数(受胎率:%)

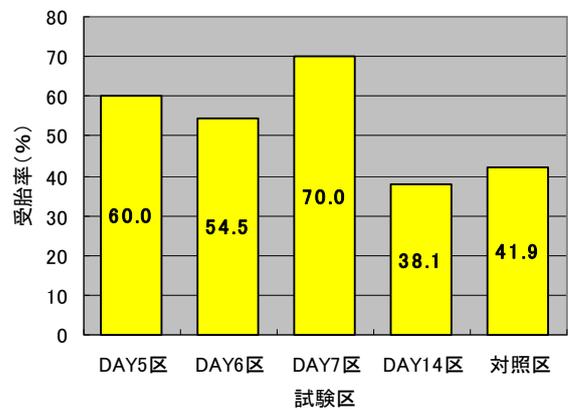


図2 試験区別受胎率

表3に受卵牛移植前の黄体の弾力性及び大きさ別の受胎状況を示した。特に黄体の弾力性や大きさによる受胎率の差は見られなかった。

表3 黄体の弾力性及び大きさ別受胎数

試験区	A	B	C	1	2	3
DAY5区	3/5	7/15	2/2	5/9	6/12	1/1
DAY6区	2/4	6/15	0/1	3/7	5/11	0/3
DAY7区	0/0	5/9	0/0	3/4	1/3	1/2
DAY14区	1/1	5/8	1/1	1/2	4/6	2/2
対照区	4/5	7/21	2/5	5/14	7/15	1/2

注1: 受胎頭数/該当頭数

注2: A(弾力有)、B(やや硬)、C(硬い)

注3: 1(大)、2(中)、3(小)

表4に平成15年度に行ったDAY5区及びDAY7区の所内で移植した9頭の投与時における1cm以上の卵胞の有無と発情後14日までの副黄体の形成別の受胎状況を示した。9頭中4頭に副黄体の形成が見られ、1cm以下の卵胞もhCG投与後に排卵し、副黄体が形成されていたが、副黄体の有無による受胎率の差は見られなかった。

表4 hCG投与区における1cm以上の卵胞と副黄体の形成別受胎状況

共存1cm以上の卵胞の有無	副黄体形成		計
	有	無	
有	1/2 (50.0)	1/2 (50.0)	2/4 (50.0)
無	2/2 (100.0)	2/3 (66.7)	4/5 (80.0)
全体	3/4 (75.0)	3/5 (60.0)	6/9 (66.7)

注1: 受胎頭数/移植頭数 (受胎率: %)

2. 血中P4濃度の測定結果

表5、図3に受卵牛の、血中P4濃度の推移を示した。DAY6区で、14日目の血中P4濃度が対照区と比べて有意に上昇した。表6、図4に受卵牛の、血中E2濃度の推移を示した。各試験区間における有意差は認められなかったが、DAY5区で14日目に対照区と比較して低い傾向が認められた(p=0.053)。

表5 hCG投与による血中P4濃度の推移 (H14~15)

試験区	例数	day5	day6	day7	day8	day14	day15	day21
DAY5区	3	2.07 ± 1.16	2.82 ± 1.25	4.11 ± 1.8	5.26 ± 2.15	7.45 ± 2.17 ^{ab}		7.83 ± 2.21
DAY6区	2		3.30 ± 0.83	6.11 ± 3.64		10.53 ± 0.87 ^b		6.79 ± 9.31
DAY7区	2	1.09 ± 0.02	1.68 ± 0.16	2.38 ± 0.95	2.71 ± 0.72	6.42 ± 3.53 ^{ab}		6.90 ± 1.49
DAY14区	4		2.93 ± 0.65	4.82 ± 1.48		5.02 ± 1.42 ^a	6.32 ± 1.32	1.68 ± 2.78
対照区	3~6	1.55 ± 0.27	2.78 ± 1.08	3.37 ± 1.08	3.00 ± 0.65	4.85 ± 0.72 ^a	6.34 ± 0.90	3.97 ± 3.03

注1: 平均値±標準偏差(単位:ng/ml)

注2: 同列異符号間に有意差有り a-b(p<0.05)

注3: 対照区の例数は、n=3がday5, day8, day15で、n=6がday6, day7, day14, day21である。

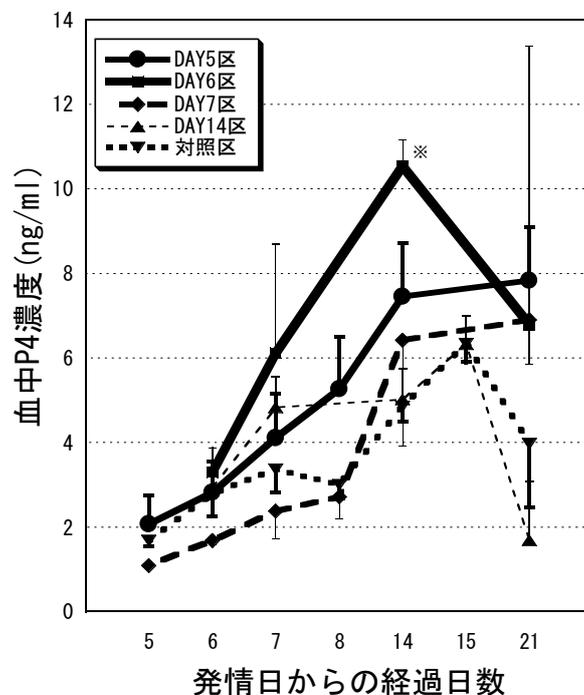


図3 hCG投与による血中P4濃度の推移

※は、対照区、DAY14区と比較して有意差あり(p<0.05)

表6 hCG投与による血中E2濃度の推移(H14～15)

試験区	例数	day5	day6	day7	day8	day14	day15	day21
DAY5区	3	3.04 ± 1.28	2.37 ± 2.59	1.89 ± 1.49	1.05 ± 0.24	0.42 ± 0.20 ^a		0.77 ± 0.41
DAY6区	5		2.01 ± 0.71	1.18 ± 0.91		0.96 ± 0.17	1.07 ± 0.24	4.54 ± 5.68
DAY7区	2	4.73 ± 3.96	2.47 ± 1.56	1.41 ± 1.79	2.02 ± 1.90	0.60 ± 0.35		0.98 ± 1.23
DAY14区	6		1.19 ± 0.46	1.71 ± 0.77		1.21 ± 0.50	1.51 ± 0.76	4.49 ± 4.39
対照区	3~6 ^{注3}	3.79 ± 2.41	1.60 ± 0.56	1.33 ± 0.72	0.56 ± 0.29	1.59 ± 0.72 ^b	1.29 ± 0.12	5.58 ± 5.23

注1: 平均値±標準偏差(単位:pg/ml)

注2: 同列異符号間の危険率は5.3%(a-b:p=0.053)

注3: 対照区の例数は、n=3がday5, day8, day14, day15で、n=6がday6, day7, day21である。

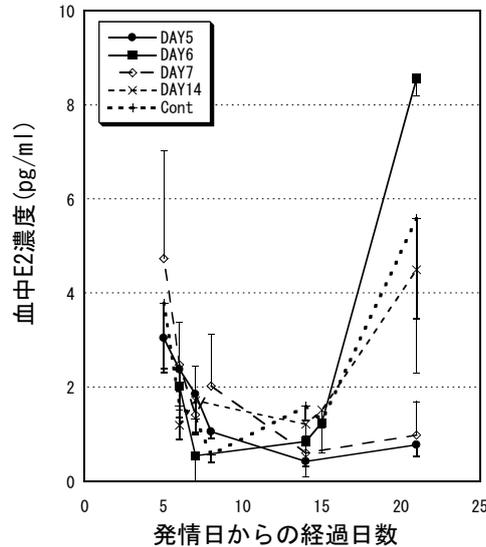


図4 hCG投与による血中E2濃度の推移

考 察

本試験では、hCGを移植前々日(DAY5区)、前日(DAY6区)、移植日(DAY7区)に投与したところ、有意の差は認められていないが、それぞれの受胎率は、60.0%、54.5%、70.0%と対照区(41.9%)より高い受胎率を得られた。齊藤ら⁹⁾は発情後5日目で59.3%、Nishigai et al.¹⁶⁾は6日目投与で67.5%といずれも対照区より高い受胎率であったと報告しており、本研究はこれらの既報と同様の結果であった。梅木ら²⁴⁾は、hCGを5日目投与した区及び移植時に投与した区は、有意に対照区と比較して受胎率が向上しており(対照区39.8% : n=108に対して、それぞれ53.5%, 55.4% : n= 99, 112)、これらのことから5~7日目のhCG投与は受胎率向上効果があると示唆された。Price and Webb²⁵⁾は発情日から4~7日目及び14~18日目にhCGを投与することで黄体の反応がよく効果的であると報告しているが、本試験では、DAY14区の受胎率は対照区と同程度の受胎率であった。

14日目の投与については、Macmillan et al.¹²⁾がGnRH類縁物質を投与することで共存している卵胞の排卵を促し、10~13%受胎率が向上したとしている。しかし逆に、Rajamahendran and Sianangama²⁶⁾は人工授精において、0、7、14日

目にhCGを投与したところ、それぞれの受胎率は50%、78%、44%で14日目投与の効果は見られず、7日目投与で副黄体が形成されることで早期胚死滅の発生を抑えると報告している。14日目の投与効果としては、その時期に存在する直径8mm以上の卵胞の排卵を促し、E2濃度を低下させることで受胎率を向上させると考えられる。本試験では、DAY14区の投与時に卵胞を確認していないので推論であるが、投与翌日のE2の低下が見られなかったことから、14日目にhCGに反応する卵胞がない牛が多かったのではないかと考えられた。

もう1つの本試験の目的として、受卵牛頭数の増加をねらう効果として、黄体所見でランクの低い牛でもhCG投与効果が認められるか検討したが、黄体所見別の受胎率では、各試験区間で差は見られなかった。平泉ら²⁷⁾は、移植時に黄体の小さい牛でもhCGの投与で受胎率が有意に上昇したと報告しているが、本試験では同様の結果は得られなかった。

副黄体の形成による影響については、平成15年度に試験を行った当所内の9頭でのみ、その形成状況を調査したが、特に副黄体の有無による受胎率の差は見られなかった。Price and Webb²⁵⁾によると、hCGは発情4~7日の卵胞顆粒細胞にある

LHレセプターに作用し、排卵を誘発して、新たな黄体（副黄体）を形成するとしている。Santos-Valadez et al.¹⁸⁾は、外科的に移植した未経産牛にhCG5,000単位を投与した区で、副黄体と血中P4濃度を調べているが、対照区と比較して投与区では、血中P4濃度の上昇は認められるが、投与区内では副黄体があってもなくても血中P4濃度に差はないと報告している。しかし、Nishigai et al.¹⁵⁾は、hCG投与後に、既存黄体が発育し、副黄体が形成され、その両方の効果で血中P4濃度が上昇したと報告しており、血中P4濃度が上昇するのは、副黄体が形成されることによるのか、既存黄体へのLH様の作用によるのかは、明確ではない。本試験では、採血頭数が少ないため副黄体の有無別に血中P4濃度を調査できなかった。今後さらに検討が必要と考えられる。

hCG投与後の血中P4濃度をみると、DAY5、6、7区において、14日目の血中P4濃度の値が対照区と比較して高い数字を示した。Nishigai et al.¹⁵⁾も発情後5日目にhCG1,500単位を投与することにより、黄体機能の増強と血中P4濃度の上昇及びE2濃度の低下を認め、受胎率向上に対する効果を報告している。また、田中ら¹⁰⁾も人工授精において受胎率向上のために人工授精後5日の卵巣所見で黄体形成不全の症例に対し、hCG 1,500～3,000単位の筋肉内投与を施し、12日目の血中P4濃度の明らかな上昇と受胎率の改善を認めている。これらのことからhCGを黄体初期（day5～7）に投与することで、既存黄体の機能を増強し、共存している卵胞が排卵して副黄体を形成し、これが5日程たって機能し始め、双方の効果で血中P4濃度が上昇し、受胎率が向上したのではないかと考えられた。

さらに、血中P4だけでなくE2濃度も受胎に対する影響はあるとMann et al.¹³⁾は報告しており、人工授精後12日目のGnRH投与により、受胎牛においてE2の有意な低下があり、受胎率向上に影響を与えたとしている。本試験においても、14日目のE2濃度は、hCGを投与した全ての区において、対照区より低い数値となっていたが、有意差は認められず、E2濃度と受胎との関連については不明であった。Nishigai et al.^{4) 5)}もhCG投与翌日から3日目までの血中E2濃度の下降を認めているが、本試験では、全ての試験区において投与後の血中E2の下降効果は認められず、これらの報告とは異なる結果であった。

受精卵の致死率は、発情日から8～16日目の間で30%に及ぶと言われ^{2 8)}この前にhCGを投与し、黄体機能を増強させることが受胎率の向上に

つながると考えられる。本試験では、DAY5、6、7区で血中P4濃度の14日目の上昇が認められ、hCGを移植0～2日前に投与することで、副黄体の形成、もしくは既存黄体へのLH様の効果により14日目のP4濃度の上昇がおり、受胎と関係したことが示唆された。これは、母胎が胚を認識する14日目前後に血中P4濃度が高く推移することで子宮環境が整えられたためと考えられる。

以上のことから受卵牛に対する発情後5、6、7日目のhCGの投与は、発情後14日目の血中P4濃度を上昇させ、受胎率を向上させる可能性があることが示唆された。特に移植時における投与でも移植前々日及び前日と同程度の効果が期待されることから、普及性が高い手法であると考えられた。しかし、hCGは分子量が大きいいため、抗ホルモン抗体の産生により、効果が減ずることがあるとされており、同一牛への反復投与には注意が必要と思われる。

謝 辞

本試験において、フィールド試験にご協力頂いた有限会社川口動物病院の川口晃弘先生及び、プロゲステロンの測定に際し、ご協力をいただいた、独立行政法人家畜改良センター技術第一課の米内美晴課長ならびに同課の皆様、独立行政法人農業技術研究機構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、エストロゲン濃度の測定に際し、ご協力いただ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に対して深く感謝の意を表します。また、供試牛の適切な管理をして頂いた神奈川県畜産研究所畜産工学部大家畜グループの技能技師及び技能員の方々にも重ねて感謝の意を表します。

引用文献

- 1) 堂地 修. 胚移植の受胎率を考える. L I A J NEWS, 69 : 1-8. 2001.
- 2) 鈴木 修. 和子牛生産におけるET技術の利用と今後の方向. 臨床獣医, 14 : 13-18. 1996.
- 3) Bulman DC, Lamming GE. Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. J. Reprod. Fertil, 54:447-458. 1978.
- 4) Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y. Pregnancy rate and blood progesterone concentration on the previous day and the day of frozen embryo transfer in parous recipient cows of Japanese Black. J. Reprod. Dev, 44:413-419.1998.

- 5) Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y. The relationship of blood progesterone and estrogen concentrations on the day before and the day of frozen-thawed embryo transfer to pregnancy rate in Japanese black beef cattle. *J. Reprod. Dev.*, 46:235-243.2000.
- 6) 金田義宏. 牛の発情周期における卵胞波. 家畜診療, 46 : 67-75. 1999.
- 7) Robinson NA, Leslie KE, Walton JS. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. *J. Dairy. Sci.*, 72:202-207.1989.
- 8) Tribulo R, Nigro M, Burry E, Caccia M, Tribuli H, Bo GA. Pregnancy rates in recipients receiving CIDR-B devices immediately following embryo transfer. *Theriogenology*, 47:372. 1997. (Abstract)
- 9) 斉藤康倫・長谷川 隆・清野 宏・星 欽彌. 乳牛の人工授精後5日目の黄体形成とhCG剤治療について. 家畜診療, 342 : 33-38. 1991.
- 10) 田中秀和・近藤寧子・矢光 潤・吉浦尚子・斉藤康倫・見学一宏. 乳牛の黄体形成不全に対する人工授精後のhCG剤投与量の検討. 家畜診療, 408 : 39-42. 1977.
- 11) Wiltbank JN, Rothlisberger JA, Zimmerman DR. Effect of human chorionic gonadotropin on maintenance of the corpus luteum and embryonic survival in the cow. *J. Anim. Sci.*, 20:827-829.1961.
- 12) Macmillan KL, Taufa VK, Day AM. Effects of an agonist of gonadotrophin releasing hormone(buserelin) in cattle.III.pregnancy rates after a post-insemination injection during metoestrus or estrus. *Anim. Reprod. Sci.*, 11:1-10.1986.
- 13) Mann GE, Lamming GE, Fray MD. Plasma oestradiol and progesterone during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin. *Anim. Reprod. Sci.*, 37: 121-131. 1995.
- 14) Peters AR, Martinez TA, Cook AJC. A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11-14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 54:1317-1326. 2000.
- 15) Nishigai M, Takamura A, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y. The effect of human chorionic gonadotropin on the development and function of bovine corpus luteum. *J. Reprod. Dev.*, 47:283-294. 2001.
- 16) Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y. Improvement of pregnancy rate in Japanese black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. *Theriogenology*, 58:1597-1606. 2002.
- 17) Loony CR, Oden AJ, Massey JM, Johnson CA, Godke RA. Pregnancy rates following hCG administration at the time of transfer in embryo-recipient cattle. *Theriogenology*, 21:246. 1982. (Abstract)
- 18) Santos-Valadez S, Seidel GE Jr, Elsdon RP. Effect of hCG on the pregnancy rates in bovine embryo transfer recipient. *Theriogenology*, 17:85. 1982. (Abst)
- 19) 社団法人日本家畜人工授精師協会編. 家畜人工授精講習会テキスト(家畜受精卵移植編). 183. 社団法人日本家畜人工授精師協会. 東京. 1985.
- 20) 農林水産省経済局編. 家畜共済における臨床病理検査要領. 平成9年改定. 328-341. 全国農業共済協会. 東京. 1997.
- 21) 竹之内直樹・居在家義昭・大島一修・島田和宏・高橋政義. 牛血漿中プロジェステロンの酵素免疫測定法. *中国農試研報*, 12:125-132 1993
- 22) 田谷一善・渡辺 元・笹本修司. ¹²⁵I 標識ホルモンを用いたプロジェステロン、テストステロンおよびエストラジオール17βのラジオイムノアッセイについて. 家畜繁殖誌, 31:186-197. 1985.
- 23) SPSS Software Package. SPSS 11.5J Brief Guide. 11.5J. 14-15. SPSS Inc. Tokyo. 2002.
- 24) 梅木英伸・志村英明・藤田達男・久々宮公二・志賀一穂. 受胎率向上のための前後処置法の検討. 平成15年度大分県試験成績報告書, 33:5-11.2004
- 25) Price CA, Webb R. Ovarian response to hCG treatment during the oestrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 86:303-308. 1989.
- 26) Rajamahendran R, Sianangama PC. Effect of human chorionic gonadotrophin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. *J. Reprod. Fertil.* 95:577-84.1992.
- 27) 平泉慎吾・千田惣浩・高田直和・坂上信忠・三宅晃次・億正樹・田頭明子・山崎慎一郎・梅木英伸・谷口 岳・的場理子・竹之内直樹・大澤健司. ウシ胚移植における移植前後のhCGおよびGnRH投与の効果. 日本畜産学会第103回大会講演要旨, : 127. 2004.
- 28) Diskin MG, Sreenan JM. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J. Reprod. Fertil.* 59: 463-468.1980.

