

## 家兔卵자의 體外受精과 體外培養

朴欽大 · 李景廣 · 鄭吉生

建國大學校 畜產大學

In vitro Fertilization and Culture of Rabbit Egg

Hum D. Park, Kyong K. Lee, & Kil S. Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

### Summary

This experiment was carried out to improve a simple and effective procedure of egg transfer which is considered to be the most useful technique for the improvement and proliferation of domestic animals.

Several experiment procedures such as superovulation, surgical recovery of ovulated egg, in vitro capacitation of ejaculated spermatozoa, in vitro fertilization and culture of embryo were conducted.

The results obtained in this experiment were summarized as follows:

1. In rabbits treated with PMS in combination with estradiol and HCG, 10 to 43 eggs were obtained in one rabbit and the average ovulation number of 20 rabbits was 21 eggs.
2. Six to 24 eggs (average 13 eggs) were recovered from the removed oviducts by the methods of flushing technique and the average recovery rate of 20 rabbits was 61.9 percent.
3. Most rabbit spermatozoa ejaculated by artificial vagina were capacitated in vitro by the culture of the spermatozoa with PBI medium at 37°C for 4 hours after removal of seminal plasma.
4. Normal fertilization following in vitro fertilization was observed in 88 (42.7%) of 206 eggs.
5. The number of eggs developed to 2-, 4-, and 8-cell stage following in vitro culture with PBI medium at 37°C was 26 (70.3%), 20 (54.1%) and 17 (45.9%) of 37 eggs used for in vitro culture.

### I. 序 論

오늘날 牝畜의 측면에서 家畜의 改良과 増殖을 促進시켜 그 生産性을 極大化 시키는 目的을 둔 卵子 移植에 관한 研究는 最近로 多排卵透起에 관한 것(Baker & Coggins, 1968; Chang, 1969; Bein & Aowey, 1975; 角田等, 1978; 杉江, 1978), 排卵된 卵子の 回收方法에 관한 것(Chang, 1951; 角田等, 1978), 卵子の 體外受精(Chang, 1959; Bedford & Chang, 1962; Brackett 等, 1968, 1969, 1970, 1972, 1975; Dandeker & Fraser, 1976)과 體外培養에 관한 것(Mauer等, 19

68; Brackett等, 1971) 및 受精卵의 移植에 관한 것(Chang, 1948, 1955; Mills等, 1973; 田等, 1974; Seider 等, 1976; 角田等, 1978)等으로 大별된다. 이러한 研究는 상당한 成功을 거두고 있으나 하나의 安定된 養畜技術로서 일반 養畜家에게 普及되기 위해서는 解決하지 않으면 안 될 많은 問題를 가지고 있으며 이중 가장 深刻하게 대두되는 것은 過排卵處理 結果가 動物種과 個體에 따라 크게 다르다는 점, 排卵된 卵子를 非外科的으로 回收할 수 있는 確실한 方法이 없다는 점, 體外에서 精子の 受精能을 獲得시키는 方法이 不安定하다는 점, 卵子를 體外에서 長期間 保存할 수 있는 方法이 確立되어 있지 않다는 점, 그리고 處理가 끝난卵

자를 非外科的으로 受容畜에게 移植할 수 있는 確實한 方法이 없다는 點을 指摘할 수 있으며 이런 問題點을 解決하기 위한 研究가 現在 世界 各處에서 進行되고 있는 반면 우리 나라에서는 이런 分野에 關한 研究는 아직 未盡한 상태에 있는 實情이다.

이와같은 現實을 勘案하여 본 研究室에서 受精卵移植에 關한 基礎理論의 習得과 技術의 體得 및 새로운 技術을 開發하기 위하여 家兔를 使用하여 過排卵處理, 卵子回收, 體外受精 및 體外培養과 같은 일련의 實驗을 實施하여 다소의 成績을 얻었으므로 그 結果를 報告한다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 期間 및 場所

본 實驗은 1979年 1월부터 同年 9월까지 建國大學校 畜產大學 家畜繁殖學 研究室에서 實施하였다.

### 2. 供試材料

#### 1) 實驗動物

生後 5~8개월령, 體重 1.5~2.0kg의 New zealand white種 14首와 生後 7~12개월령, 體重 2.5~3.0kg의 首를 供試動物로 使用하였다.

#### 2) Hormo California white種 6首와 ne劑

過排卵處理를 위하여 PMS, HCG 및 estradiol을 使用하였다.

#### 3) 使用器具

- (1) 小動物 手術用 器具 - 一切
- (2) 實體顯微鏡.
- (3) 位相差顯微鏡.
- (4) 加溫板.
- (5) 恒溫培養器 等이 있다.

### 3. 實驗方法

#### 1) 供試精液

人工腔을 使用, 常法에 準하여 採取한 精液을 供試하였다.

#### 2) 過排卵處理와 回收

非妊娠 家兔에 대하여 首當 50IU의 PMS를 1日 1回씩 5日間 皮下에 注射한 다음, 24시간 間격으로 0.1mg의 estradiol과 100IU의 HCG를 각각 皮下와 靜脈에 1회씩 注射하여 過排卵을 透起하였다. HCG注射 後 16시간만에 ether로 麻醉, 下腹部를 切開하여 卵巢와 卵管을 摘出した 다음, 좌우 卵巢의 배란點을 조사하여 排卵數를 確認하였다. 이어 卵管子宮接續部로부터 卵管采를 향하여 2ml의 灌流液을 2회 灌流시켜 watch glass에 받아 實體顯微鏡下에서 卵子를 回收하고 回收된 卵子的 使用可能性 與否는 位相差顯微鏡을 使用하여 檢

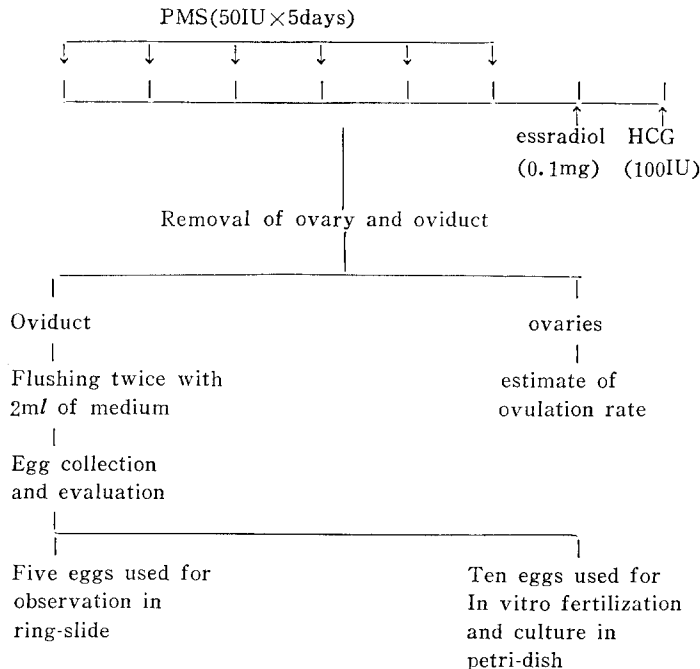


Fig. 1. Procedures of superovulation and egg recovery

查하였다. 正常으로 判明된 卵자의 일부는 ring-slide 로, 나머지는 petri-dish로 옮겨 體外受精에 供試하였다((Fig. 1 참조)

### 3) 體外受精과 體外培養

人工腔로 採取한 精液에 3~5ml의 PBI (Phosphate Buffer Saline)培養液을 添加하여 精液을 稀釋한 다음 460r.p.m으로 5分間 遠心分離한 精子만을 回收하였다

洗滌이 끝난 精子에 다시 3~5ml의 PBI培養液을 添加하여 37°C에서 4時間 培養함으로써 受精能을 獲得시켰다. 이렇게 體外에서 受精能이 獲得된 精子 浮遊液 1~2방울(정자 500~1,000萬)을 이미 준비된 ring-slide와 petri-dish속의 卵자에 添加하여 37°C의 加溫板과 培養器에서 培養하면서 受精狀態와 受精卵의 發達狀態를 經時的으로 檢査하였다(Fig.2. 참조).

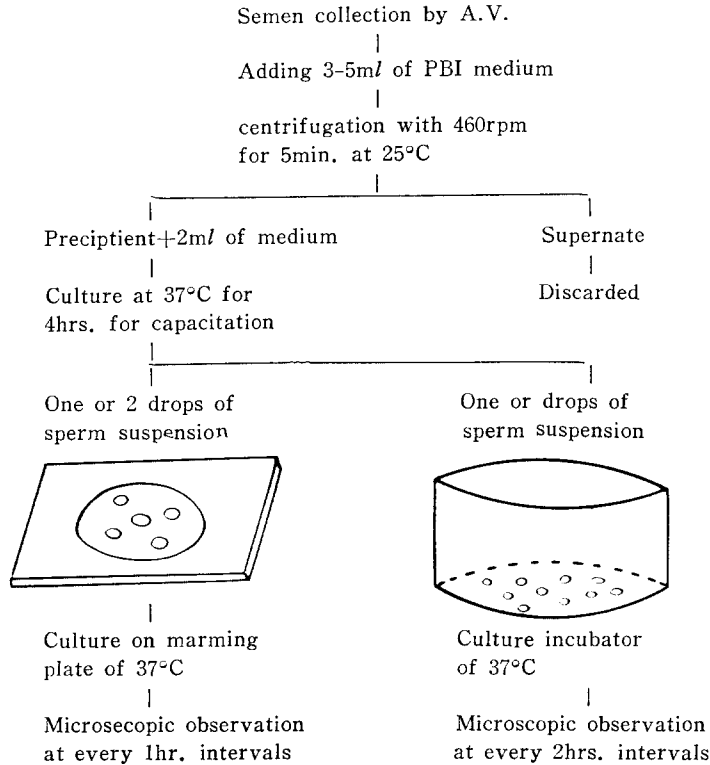


Fig. 2. Procedures of in vitro fertilization and culture

### 4) 培養液

PBI medium을 제조 후 0.1N NaOH로 pH. 7.8~8.0으로 調節하였다. 그리고 10% rabbit serum을 添加(rabbit blood를 4°C에서 10時間 放置한 후 3,000 r.p.m으로 20分間 遠心分離하여 55°C에서 약 30分間 處理한 후 使用)하여 培養液으로 使用하였다.

## III. 結 果

本 實驗에서 얻어진 結果를 要約하면 다음과 같다.

### 1. 過挑卵 및 挑卵된 卵자의 回收

過排卵을 目的으로 hormone處理를 실시한 家兔의 個體別 排卵數와 排卵된 卵자중 시험관內에 回收된 卵

子數 및 이들 未受精卵의 狀態는 table 1 및 Fig. 3에서 보는 바와 같다. Fig. 3은 採卵直後의 未受精卵을 150배 擴大한 사진으로 卵자는 丘細胞群과 透明帶 및 卵黃膜으로 구성된 典型的인 未受精卵이며 이미 第一極體가 放出된 卵자도 있었다. 한편 hormone處理를 받은 家兔의 卵巢에서 確認된 배란점을 기준으로 하여 계산한 排卵數는 table 1에 의하여 알 수 있는 바와 같이 首當 10개부터 43개에 이르기까지 個體에 따라 상당한 差異가 있었으며 總 排卵數는 424개로서 首當 平均 21개였다.

한편, 卵管灌流에 의하여 실제로 試驗管內에서 回收된 卵子數도 首當 6개로부터 24개에 이르기까지 상당한 差異가 있었다. 供試한 20首에서 回收된 總 卵子數는 262개로서 이것은 首當 平均 13개에 해당한다. 排

**Table 1.** Results of superovulation and egg recovery

Animal No.	No. of ovulation	No. of egg recovered	Recovery rate(%)
1	22	10	45.5
2	21	13	61.9
3	21	9	40.9
4	19	11	57.9
5	27	17	63.0
6	43	24	55.8
7	13	6	46.2
8	24	19	79.2
9	23	14	60.9
10	31	20	64.5
11	10	8	80.0
12	24	12	50.0
13	17	9	53.0
14	10	6	60.0
15	22	13	59.1
16	21	16	76.2
17	18	10	76.2
18	19	14	78.9
19	20	16	76.2
20	19	15	78.9
Total	424	262	
Mean	21	13	61.9

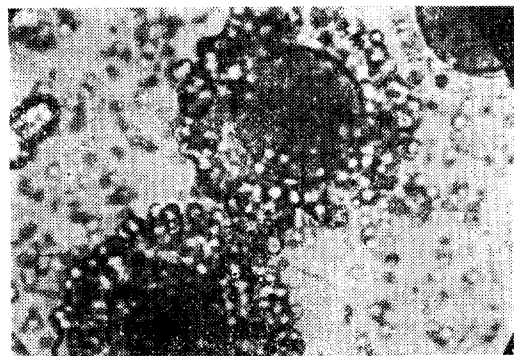
卵된 卵子の 回收率도 40%로부터 80%에 이르기까지 個體差가 심했으나 平均 回收率은 61.9%였다.

## 2. 體外受精

Fig. 4는 精子가 卵子內에 侵入하여 第2極體를 放出하고 雄性前核과 雌性前核이 形成되고 있는 狀態를 나타내고 있다. 이 兩前核이 合體가 되면 受精은 完了된다. 精子를 卵子에 用作시킨 후 兩前核이 形成되기까지는 4~8時間이 걸렸으며 合體는 그 후 2~4時間이 걸렸다. 한편 回收된 卵子中 體外중 in vitro에서 精子와 結合하여 體外受精이 이루어진 成績은 table 2에서 보는 바와 같다. 受精에 使用된 卵子 總 206개중 第2極體의 放出과 前核形成 및 卵割등과 같은 受精過程이 確認된 受精卵數는 88개로서 低調한 成績이었으며 7號와 같은 개체는 단 하나의 卵子도 受精이 되지 않았다. 한편 受精率은 0%로부터 66%에 이르기까지 個體別 差異가 매우 심했으나 20只의 平均受精率은 42.7%였다.

**Table 2.** Results of in vitro fertilization

Animal No.	No. of eggs used for fertilization	No. of eggs fertilized	Fertilization rate(%)
1	7	2	28.2
2	10	3	30.0
3	7	3	42.9
4	8	3	37.5
5	15	5	33.3
6	18	8	44.4
7	4	0	00.0
8	18	9	50.0
9	13	5	38.5
10	15	6	40.0
11	6	2	33.3
12	11	4	33.4
13	7	1	14.3
14	3	2	66.7
15	11	5	45.4
16	12	7	58.3
17	9	5	55.6
18	7	4	57.1
19	12	6	50.0
20	13	8	61.5
Total	206	88	
Mean			42.7



**Fig. 3.** Unfertilized egg

## 3. 體外培養成績

試驗管內에서 受精이 完成된 卵子를 培養器內에서 培養할 때의 卵子の 發達狀態와 그 成績은 Fig. 5-a, b, c 및 table 3과 같다.

Fig. 5-a, b, c는 試驗管內에서 發達中에 있는 細胞期

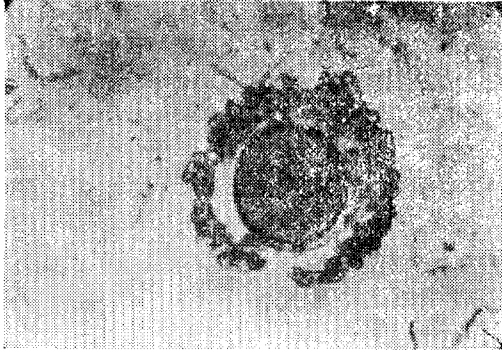


Fig. 4. Formation of pronuclei



Fig. 5-b. Four-cell embryo

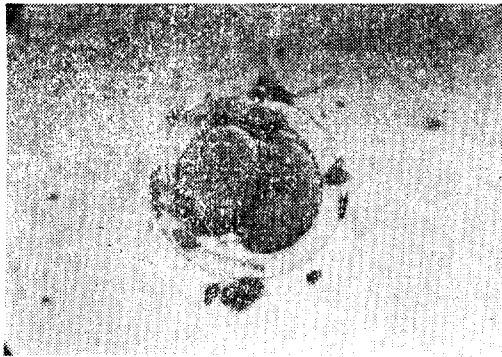


Fig. 5-a. Two-cell embryo

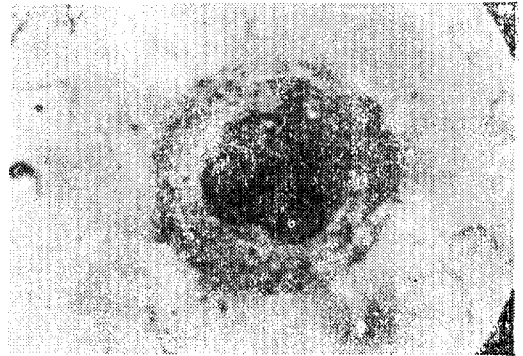


Fig. 5-c. Eight-cell embryo

와 4細胞期 및 8細胞期の 受精卵을 나타내고 있다. 精子와 卵子를 作用시킨후 2細胞期가 되기까지는 11~14時間, 2細胞期부터 4細胞期까지는 14~20時間, 4細胞期부터 8細胞期까지는 20~28時間이 所要되었다.

한편 table에 의하여 알 수 있는 바와 같이 培養에 供試된 總 37개의 受精卵中 2細胞期까지 發達한 것은 26개로서 70%가 發達하였고, 4細胞期까지 發達한 것은 20개였으며, 8細胞期까지 發達한 卵子는 17개로서

Table 3. Results of in vitro culture of eggs after fertilization

Animal No.	No. of eggs cultured	2-celled eggs (11-14hrs)		4-celled eggs (14-20hrs)		8-celled eggs (20-28hrs)	
		No.	Rate(%)	No.	Rate(%)	No.	Rate(%)
3	3	2	66.7	2	66.7	1	33.3
4	2	2	100.0	1	50.0	1	50.0
5	4	3	75.0	3	75.0	3	75.0
9	5	3	60.0	3	60.0	3	60.0
10	5	4	80.0	2	40.0	2	40.0
11	2	2	100.0	2	100.0	1	50.0
12	4	3	75.0	2	50.0	1	25.0
17	3	1	33.3	1	33.3	1	33.3
18	4	3	75.0	2	50.0	2	50.0
19	5	3	60.0	2	40.0	2	40.0
Total Mean	37	26	70.3	20	54.1	17	45.9

培養에 供試된 37개 중 45.9%가 8細胞期까지 發達한 셈이다.

#### IV. 考 察

多排卵處理로부터 卵자의 回收 및 體外受精과 體外培養에 이르기까지의 一連의 作業은 極히 複雜하고 艱難케이트하기 때문에 이들 作業을 어떻게 實施할 것인가에 대한 方法論은 물론, 그 結果에 대한 評價도 研究者에 따라 상당히 差異가 있다.

家兔에서 多數의 排卵을 誘起하기 위하여 실시하는 hormone處理法도 여러가지가 있다(角田等, 1978). 그 중에서도 排卵成績이 가장 좋은 方法은 FSH와 FSH를 投與한 다음 自然交尾를 시키는 方法으로 알려져 있다(角田等, 1978). 그러나 本 研究에서는 PMS를 購得하기 어렵다는 現實의 與件을 考慮하여 HCG代身을 使用하였고 自然交尾를 省略하는 代身 비교적 多量의 HCG投與만으로 排卵刺戟을 부여하였다. 本 研究에 의하여 얻어진 排卵數는 table 1에 의하여 알 수 있는 바와 같이 首當 10개로부터 43개에 이르렀으며 平均 21개였는데 이러한 成績은 Chang等(1969)의 成績보다는 약간 良好한 것이었다. 다만 本 實驗의 경우 排卵數의 個體別差異가 현저하였는데, 그것은 供試動物의 品種, 年齡 등이 다른 媒다가 系統이 일정하지 않고 一般養家들로부터 구입한 것들이기 때문에 hormone에 대한 反應에 있어서 個體別 差異가 表現된 結果로 생각된다. 따라서 이러한 문제점만 解決된다면 本 研究에서 採擇한 hormone處理法으로도 多排卵의 目的을 충분히 달성할 수 있을 것으로 생각한다.

本 實驗에 있어서 排卵된 卵자의 回收率은 table 1에서 보는 바와 같이 40.9~80%, 平均 61.9%로서 이러한 成績은 角田等(1978)의 73.6%~80.7%, Chang(1967)의 32~73%와 큰 차이가 없었다. 卵管灌流에 의한 卵자回收는 그 回收效率이 가장 높은 것으로 알려져 있으나 回收操作을 실시하는 過程에서 상당 수의 卵자를 喪失하기 때문에 回收率이 낮아지는 것으로 생각된다.

未受精卵자를 體外에서 受精시킬 때 가장 중요한 것은 精子의 受精能獲得과 卵자의 培養液의 組成이다(Harper, 1969). 精子의 受精能을 獲得시키는 가장 확실한 方法은 精子를 子宮이나 卵管內에서 一定期間 培養하는 方法이지만(Chang, 1951; Brackett等, 1970; Dandekar & Fraser, 1976), 家兔의 生殖器를 利用하지 않고 試驗管內에서도 受精能을 獲得시킬 수 있다.(Brackett & Oliphant, 1970, 1972, 1975). 本 實驗

에서도 PBI液으로 精子를 1회 洗滌하여 精漿을 완전히 分離한 精子를 재차 同培養液에 浮遊시켜 37°C에서 4時間 培養함으로써 精子의 受精能獲得에 성공하였다. 受精能獲得은 이 精子를 이용한 體外受精試驗에 의하여 確認되었다.

受精能을 획득한 精子를 家兔의 未受精卵자에 作用시켜 體外에서 受精을 完成시켰다는 보고는 많다(Morricard, 1954; Chang, 1959; Bedford & Chang, 1962; Brackett, 1868, 1969, 1972; Dandekar & Fraser, 1976). 그런데 이러한 報告들은 대개의 경우 5%의 CO<sub>2</sub>存在下에서 精子와 卵자를 作用시킨다는 점에 있어서 本 研究과 구별된다. 즉, 本 研究은 CO<sub>2</sub>培養器를 사용하지 않고 단순한 培養器內에서 溫度만을 調節했다는 점에서 가장 簡便한 方法이라고 할 수 있다.

本 研究에서 얻어진 體外受精의 成績은 table 2에서 알 수 있는 바와 같이 個體別로 볼때 전혀 受精이 되지 않은 것도 있으나 대체로 14.3~66.7%로 平均은 42.7%였다. 이러한 成績은 體外受精에 관한 初期의 研究인 Chang(1959)의 10~42%나 Brackett & Williams(1968)의 20%보다는 훨씬 좋은 成績이었으며, 子宮과 卵管內에서 受精能을 완전히 獲得한 精子를 使用한 Dandekar & Fraser(1976)의 81~100%나 角田等(1978)의 54.5~91.9%보다는 훨씬 떨어지는 成績이었다. 그러나 本 實驗과 同一한 培養液을 使用한 Brackett等(1972)의 43.7%와는 유사한 成績이었다.

本 實驗의 成績이 다소 低調한 것은 Dandekar & Fraser(1976)의 報告에 의하여 알 수 있는 바와 같이 精子의 體外受精이 완벽하지 못했다는 점과 CO<sub>2</sub>培養器를 사용하지 않은 데에 그 原因이 있다고 생각된다. 따라서 今後 體外受精의 成績을 向上시키기 위해서는 精子의 受精能을 보다 완벽하게 獲得시킬 수 있는 方法과 培養條件을 改善할 수 있는 方法이 講究되어야 한다고 생각된다.

table 3에 의하여 알 수 있는 바와 같이 體外受精에 供試된 37개의 卵子 중 2細胞期, 4細胞期 및 8細胞期까지 發達한 卵子는 각각 26개(70.3%), 20개(54.1%) 및 17개(45.9%)였는데 이러한 成績은 供試卵子の 11~82%가 正常的인 發達을 하였다는 Mauer等(1968)의 成績보다는 훨씬 낮으나, 2細胞期, 4細胞期 및 8細胞期까지 각각 50%, 38.9% 및 11.1%가 發達했다는 Brackett等(1971)의 成績보다는 良好한 것이었다. 이러한 差異도 前述한 바와 같이 精子의 受精能獲得程度는 培養液의 等成 및 培養條件 등의 差異에 基因하 것이겠으나 CO<sub>2</sub>의 存在下가 아니라도 어느 程度(8細胞期까지는 培養이 可能하다. 事實이 本 實驗에 의하여 立證되

었다고 생각된다.

이상에서 本實驗의 結果를 比較考察하였는데 今後약간의 檢討만 加하면 지금까지 報告된 어떤 方法보다 쉽고 간단한 方法으로 家兔卵자의 多排卵, 體外受精 및 體外培養 등의 成績을 向上시킬 수 있는 可能性이 本 研究에 의하여 立證되었다고 생각된다.

## V. 摘 要

家畜의 改良과 増殖을 위하여 그 將來가 크게 기대되는 受精卵移植에 관한 基礎技術을 體得하고 나아가서는 보다 간단하고 成績이 좋은 새로운 方法을 모색하기 위하여 本實驗을 實施하였다. 23首의 家兔가 供試되었으며 多排卵處理, 排卵된 卵자의 回收, 未受精卵의 體外受精 및 培養 등과 같은 일련의 實驗을 통하여 얻어진 成績을 要約하면 다음과 같았다.

1. PMS, Estradiol과 HCG 등과 같은 호르몬 處理에 의하여 首當 10~43개(平均 21개)의 卵자가 排卵되었다.

2. 卵管灌流法에 의하여 回收된 卵자數는 首當 6~24개(平均 13개)로 平均 回收率은 61.9%였다.

3. PBI培養液으로 洗滌한 精子를 37°C에서 同培養液으로 4時間 培養한 결과 대부분의 精子는 受精能을 獲得하였다.

4. 體外受精에 供試된 206개의 卵子中 受精이 完成된 卵子는 88개 平均 體外受精率은 42.7%였다.

5. 受精卵을 37°C의 培養條件下에서 Brackett 培養液으로 培養하였던 바, 供試卵子 37개中 26개(70.3%), 20개(54.1%) 및 17개(45.9%)가 각각 2細胞期 4細胞期 및 8細胞期까지 發達하였다.

## References

1. Allen, W.R. and L.H.A. Rowson. 1975. Surgical and non-surgical egg transfer in horses. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 23 : 525-530.
2. Bein, A.M. and W.P. Howey. 1975. Ovulation and transuterine migration of the concepts in thoroughbred mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 23 : 541-544.
3. Baker, R.D. and E.G. Coggins. 1968. Control of ovulation rate and fertilization in prepuberal gilts. *J. Anim. Sci.*, 27 : 1607-1610.
4. Bedford, J.M. and M.C. Chang. 1962. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*. 193 : 898-

- 899.
5. Betteridge, K.J. 1977. Embryo transfer in farm animals. Canada Department of Agriculture Monograph., 16 : 1-80.
6. Brackett, B.G. and W.L. Williams. 1968. Fertilization of rabbit ova in a defined medium. *Fertil. Steril.*, 19(1) : 144-155.
7. Brackett, B.G., 1969. Effect of washing the gametes on fertilization in vitro. *Fertil. Steril.*, 20(1) : 127-141.
8. Brackett, B.G. and J.B. Server. 1970. Capacitation of rabbit spermatozoa in the uterus. *Fertil. Steril.*, 21(9) : 68-695.
9. Brackett, B.G., D.E. Killen and M.D. Peace. 1971. Cleavage of rabbit ova inseminated in vitro after removal of follicular cells and zona pellucida. *Fertil. Steril.*, 22(12) : 816-828.
10. Brackett, B.G. et al. 1972. In vitro fertilization of rabbit ova recovered from ovarian follicle. *Fertil. Steril.*, 23(12) : 898-809.
11. Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 12 : 260-274.
12. Bowen, R.A., R.P. Elsdon and G.E. Seidel. 1978. Embryo transfer for cows with reproductive problems. *Ame. Vet. Med. Asso.*, 172 : 1303-1306.
13. Chang, M.C. 1948. Probability of normal development after transplantation of fertilized rabbit ova stored at different temperature. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 48 : 680-683.
14. Chang, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. 168 : 697-698.
15. Chang, M.C. 1955. Fertilization and normal development of follicular oocytes in the rabbit. *Science*. 121 : 867-860.
16. Chang, M.C. 1959. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*. 184 : 466-467.
17. Chang, M.C. 1967. Effects of progesterone and related compounds on fertilization, transplantation, and development of rabbit egg. *Endocrinology*. 81 : 1251-1260.
18. Dandekar, P. and L. Fraser. 1976. A comparison of in vitro fertilization of rabbit ova

- using spermatozoa recovered from the uterus or vagina. *J. Reprod. Fertil.*, 46 : 77-81.
19. Heape, M.J.K. 1969. Factors influencing sperm penetration of rabbit eggs in vitro. *Anat. Rec.*, 163 : 195-196.
20. Heape, W. 1980. Preliminary notes on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. *Proc R. Soc., Lond.* 48 : 457-453.
21. Mauer, R.E., E.S.E. Hafez, M.H. Ehlers and J.R. King. 1968. Culture of two cell rabbit eggs in chemical defined medium. *Exp. Cell. Res.*, 52 : 293-300.
22. Mills, J.H. et al. 1973. Embryo transfer following in vitro and in vivo fertilization of rabbit ova. *Fertil. Steril.*, 24(8) : 602-608.
23. Moricard, J. 1954. Observation of in vitro fertilization in the rabbit. *Nature*. 173 : 1140-1141.
24. Seidel, J., R.A. Bowen and M.T. Kane. 1976. In vitro fertilization, culture and transfer of rabbit ova. *Fertil. Steril.*, 27(7) : 861-870.
25. Tsunoda, Y., A. Iritani and Y. Nishikawa. 1978. Studies on superovulation in the rabbit with special reference to repeated superovulation. *Jap. Zootech. Sci.*, 49(2) : 89-95.