

# بررسی کشتارگاهی فراوانی وقوع سندرم کبد چرب در گاوهای نژاد شیری در گاودارپهای اطراف تهران

● افشین رئوفی، متخصص بیماریهای درونی دامهای بزرگ  
● تقی تقی پوربازرگانی، عضو هیات علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران  
● عبدالمحمد حسینی طباطبایی، عضو هیات علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۳۴، بهار ۱۳۷۶

## مقدمه

سندرم کبد چرب یا سندرم گاو چاق یک بیماری متابولیک است که در گاوان شیری به علت تعادل منفی انرژی در دو هفته اول شیردهی بسیار متداول می‌باشد. این سندرم ناشی از مشکل تغذیه‌ای گاوان در اواخر شیردهی و دوره خشکی است و میزان وقوع آن در گله تا حد زیادی به چاقی دامها (انرژی اضافی) قبل از زایمان و شدت کمبود انرژی بعد از زایمان بستگی دارد (۱۹). سندرم کبد چرب با تحرک بافت چربی (در قالب اسیدهای چرب)، کاهش سریع وزن و تجمع چربی داخل سلولی عمدتاً در کبد و به طور نسبی در سایر اندامها همراه می‌باشد. در این بیماری افزایش وقوع اختلالات متابولیک، عفونی و تولید مثل (۴) مانند کتوز، تب شیر، ورم پستان و جفت‌ماندگی جلب توجه می‌کند (۱۹). این سندرم همه گاوهای نژاد شیری را در تمام سنین مبتلا می‌سازد (۱۳ و ۱۹) و از بسیاری کشورها منجمله انگلستان، ایالات متحده آمریکا، فرانسه، مجارستان، شوروی سابق (۶ و ۱۹)، استرالیا (۱۹) و بلغارستان (۱۷) گزارش شده است. میزان ابتلاء در گاوان تازه‌زا ممکن است به ۹۰٪ (۱۳ و ۱۹) و میزان مرگ و میر در گله به ۲۵٪ (۱۳، ۱۴، ۱۹) برسد. تشخیص سندرم کبد چرب با توجه به تاریخچه یافته‌های آزمایشگاهی و نتایج بیوپسی کبد امکان‌پذیر بوده (۱۹) و روش درمانی قابل اعتمادی برای آن وجود ندارد (۶). برای کاهش میزان وقوع سندرم کبد چرب مهمترین مسئله جلوگیری از چاق شدن بیش از حد گاوان قبل از زایش و به حداکثر رساندن دریافت غذا پس از زایش می‌باشد (۱۶) که این موضوع مستلزم برنامه‌ریزی به منظور تنظیم دقیق انرژی جیره با سطح تولید شیر در اواخر دوره شیردهی (۱۵) و همچنین در دوره خشکی می‌باشد.

## مواد و روشها

این بررسی از ۲۳/۱/۷۳ شروع و تا ۱۳/۴/۷۴ ادامه یافت. در طی این تحقیق با مراجعه به کشتارگاه قائم واقع در شهریار گاوهای ماده اصیل یا دورگ با

می‌گردید و بدین ترتیب وزن چربی کبد به طور دقیق اندازه‌گیری می‌شد. در مواردی که ظاهر کبد از نظر رنگ و آزمایش شناوری، چربی بیشتری را نسبت به نمونه‌های طبیعی نشان می‌داد، قسمتی از بافت کبد در فرمالین ۱۰ درصد تامپونه قرار می‌گرفت و برای بررسی هیستوپاتولوژی به آزمایشگاه مربوطه ارسال می‌گردید. بدین منظور از نمونه کبد ثابت شده مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و تمامی آنها با روش معمولی هماتوکسیلین و اتوزین رنگ‌آمیزی می‌شد. سپس جهت تأیید حضور ضایعه تغییر چربی در سلولهای کبد، بعضی از نمونه‌ها که به وضوح دارای سیتوپلاسم و اکوتله بودند انتخاب می‌شدند و پس از تهیه مقاطعی به طریق برش انجمادی<sup>۱</sup> با روش ORO (Oilred O) رنگ‌آمیزی می‌شدند تا از نظر وجود چربی در داخل سیتوپلاسم سلولها مورد بررسی کاملتر قرار گیرند. روش آماری که برای مقایسه میانگین چربی کبد در گروههای مختلف بکار رفته است آزمون اختلاف میانگین در جامعه با واریانس نامعلوم (۱) یا آزمون T ستیودنت<sup>۲</sup> می‌باشد. همچنین از مربع کای<sup>۳</sup> (۱۸) (برحسب مورد با ۱ یا ۲ درجه آزادی) و آزمون دقیق فیشر<sup>۴</sup> (۱) برای تجزیه و تحلیل نتایج استفاده شده‌است.

## نتایج

در این بررسی جمعاً ۱۴۰ رأس گاو ماده مورد بررسی قرار گرفتند و در ۱۲۱ مورد میزان چربی کبد با روش استخراج (سوکسله) اندازه‌گیری شد و یافته‌های بدست آمده از ۱۰۶ رأس گاو مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. از بین گاوهای تحت بررسی (۱۰۶ رأس) در ۲۹ مورد (۲۷/۳۶٪) میزان چربی کبد ۴/۱۶٪ و در ۲ مورد (۱/۸۹٪) از گروه ۱ این میزان ۱/۷۷٪ بود. در جدول ۲ میانگین و انحراف معیار چربی کبد در گروههای مختلف آمده‌است اختلاف میانگین چربی کبد بین گروههای ۱ و

خلوص ژنتیکی بالا، قبل و بعد از کشتار مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از ثبت مشخصاتی چون امتیاز وضعیت بدنی (بر مبنای ۱ تا ۵)، سن، وضعیت شیرواری، چربی زیرپوست، چربی محیط اندامها و وضعیت آبستنی، از کلیه دامهای تحت مطالعه نمونه کبد برداشت گردید. میزان چربی کبد در تمام موارد با روش شناوری تخمین زده شد و در اکثر موارد با روش سوکسله به طور دقیق اندازه‌گیری گردید. در صورت امکان دسترسی به صاحب دام و یا دیگر افراد مطلع اطلاعات لازم در مورد دام و یا گله مربوطه، شامل تعداد زایش، تاریخ آخرین زایش و علت کشتار اخذ می‌شد. لازم به ذکر است که در این کشتارگاه گاوهای ماده عمدتاً به دلیل مثبت بودن تست سل و بروسوز و ندرتاً به دلایل دیگر کشتار می‌گردند. بعد از ذیج و تخلیه امعاء و احشاء، وضعیت رحم بررسی می‌شد. وجود ترشحات خونی رنگ، اندازه پلاستوم و جنین، حجم و قوام رحم و همچنین اخذ سابقه به عنوان معیارهای برای تخمین وضعیت تولید مثل دام مد نظر قرار می‌گرفت. گاوها از نظر وضعیت آبستنی، سن آبستنی و مدت زمانیکه از زایش آنها گذاشته بود به چهار گروه تقسیم می‌شدند: گروه ۱- گاوهای تازه‌زا تا یکماه پس از زایش. گروه ۲- گاوهایی که حداقل یکماه از زایش آنها گذاشته بود. گروه ۳- گاوهای آبستن کمتر از ۸ ماه. گروه ۴- گاوهای آبستن بالای ۸ ماه.

کبد ابتدا از نظر رنگ، خونریزی، آبسه، کانونهای زرد و غیره بررسی می‌شد. سپس از قسمت بالایی سطح جدار (نیمه خلفی) نمونه‌ای در حدود ۱۰ گرم برداشت می‌گردید و در صورت وجود جراحت در ناحیه مذکور از نزدیکترین محلی که بافت کبد ظاهراً سالم بود نمونه برداری می‌شد. نمونه‌ها جهت انجام آزمایشهای بعدی در کنار یخ به آزمایشگاه حمل می‌گردید. در آزمایشگاه ابتدا بوسیله آزمایش شناوری (۸) و (۱۶) میزان چربی کبد تخمین زده می‌شود، سپس با جدا کردن ۵ گرم از بافت کبد از زیر کیسول میزان چربی آن با روش سوکسله و با استفاده از دی‌اتی‌تلر استخراج

## چکیده

برای بررسی کشتارگاهی فراوانی وقوع سندرم کبد چرب در گاوهای نژاد شیری از گاوهای اطراف تهران نمونه برداری از تاریخ ۷۳/۱۱/۲۳ تا ۷۴/۴/۱۳ انجام گرفت و جمعاً تعداد ۱۴۰ رأس گاو ماده مورد بررسی قرار گرفتند و از کلیه دامهای تحت مطالعه نمونه کبد برداشت گردید. در تمام موارد میزان چربی کبد با روش شنواری تخمین زده شد و در ۱۲۱ مورد چربی کبد با روش استخراج (سوکسله) به طور دقیق اندازه گیری شد. یافته‌ها از ۱۰۶ رأس گاو مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و از بین

این تعداد در ۲۹ مورد (۲۷/۳۶٪) میزان چربی کبد بر اساس وزن مرطوب  $0.4/16 >$  بود که کبد چرب به حساب آمد. موارد کبد چرب در دامهای تازه‌زا تا یک ماه پس از زایش ۶۴/۷۱٪، در دامهای غیر آبستن که حداقل یک ماه از زایش آنها گذشته ۲۱/۲۸٪، در دامهای آبستن کمتر از ۸ ماه ۱۸/۱۸٪، در دامهای آبستن بالای ۸ ماه ۲۲/۲۲٪ و میانگین چربی کبد در گروههای مذکور به ترتیب  $0.7/79 \pm 8/24$ ،  $0.3/58 \pm 1/09$ ،  $0.3/45 \pm 0/76$ ،  $0.3/50 \pm 1/04$ ، به دست آمد. مقایسه میانگین چربی کبد در گروههای مختلف با استفاده از روش آزمون T ستیودنت نشان

داد که میانگین چربی کبد در گروه دامهای تازه‌زا تا یک ماه پس از زایش تفاوت معنی داری با گروه دامهای آبستن بالای ۸ ماه ندارد ولی نسبت به دو گروه دیگر این تفاوت معنی دار است. نتایج روش شنواری نشان داد که در ۱۳۵ (۹۶/۴٪) رأس از گاوها میزان چربی کبد کمتر از ۱۳٪ و در ۴ (۲/۸۵٪) رأس از آنها این میزان ۲۵-۱۳٪ و بالاخره در یک (۰/۷۱٪) رأس گاوها مقدار آن ۳۵-۲۵٪ بود. علاوه بر این بررسی ۳۴ (۲۴/۲۹٪) رأس از گاوها، نواحی (به اندازه‌های متفاوت) زرد رنگ ناشی از لیپیدوزیس فشاری کبد داشتند.

و همچنین ۱ و ۳ معنی دار است (جدول شماره ۳). مطالعات انجام شده به طور اولیه بیانگر تغییر چربی بود که رنگ آمیزی اختصاصی ORO حضور چربی را تأیید نمود. اندازه بعضی از این واکنشها در حدی بود که هسته سلول را به گوشه‌های رانده بود و همچنین در بعضی موارد کیست چربی تشکیل شده بود. در این بررسی هنگام مشاهده کبدها، در ۳۴ مورد (۲۴/۲۹٪) به کبدهائی با کانونهای زرد (با اندازه‌های مختلف و پراکنده) برخورد گردید که در مطالعه هیستوپاتولوژیک لیپیدوزیس ناشی از فشار تشخیص داده شد. آزمایش شنواری در ۱۴۰ نمونه کبد انجام شد و میزان چربی در ۱۳۵ مورد ۱۳٪، در ۴ مورد از ۱۳٪ تا ۲۵٪ و در یک مورد از ۲۵٪ تا ۳۵٪ به دست آمد. نتایج آزمایش شنواری با مورد مشابه از روش سوکسله در ۵/۸۷٪ موارد همخوانی داشت ولی تنوع میزان چربی کبد در حدی نبود که بتوان این دو روش را با کمک آزمون مک نمار ۵ با هم مقایسه نمود.

## بحث

در بررسی کشتارگاهی که Bogin و همکاران انجام دادند میزان چربی تام کبد بر اساس وزن مرطوب (با روش استخراج) در دامهای با کبد طبیعی  $0.26 \pm 0.29/26$  و در دامهای با کبد چرب متوسط و شدید به ترتیب  $0.25 \pm 0.4/41$  و  $0.13/59 \pm 2/18$  تعیین گردید (۲). بر همین اساس در این بررسی  $0.27/36$  از گاوهای دارای کبد چرب (جدول شماره ۴) و  $0.1/89$  از آنها که از گروه ۱ بودند کبد شدیداً چربی داشتند.

در تحقیق Schafer و همکاران ۳۵۳ نمونه بیوپسی کبد از ۹۹ رأس گاو در ۹ گله بین هفته‌های ۱ تا ۸ بعد از زایش جمع‌آوری شد که ۲۶ رأس از آنها سابقه سندرم کبد چرب داشتند و فقط در ۳۵٪ موارد میزان چربی کبد بیش از ۵٪ بود که بیشتر آنها در هفته اول بعد از زایش بودند (۲). در حالیکه در این بررسی  $0.58/82$  از گاوهایی که در ماه اول بعد از زایش بودند میزان چربی

کبدشان بیشتر از ۵٪ بود. با توجه به اینکه فراوانی موارد کبد چرب تا یک ماه اول بعد از زایش می‌تواند قابل توجه باشد، از این مقایسه چنین استنباط می‌شود که وضعیت فراوانی این سندرم در شرایط گاوهای اطراف تهران بیشتر و لاجرم ضررهای اقتصادی آن نیز می‌تواند اهمیت بیشتری داشته باشد.

در تحقیقی که توسط Johanssen و همکاران انجام شد، در ۷۱ رأس گاو شیری بیوپسی کبد انجام گرفت و میزان چربی این نمونه‌ها با روش بیوشیمیایی تعیین گردید و در نتیجه مشخص شد که میزان چربی در کبد گاوها قبل از زایش کمتر از ۵٪ بود (۹). در بررسی حاضر میزان چربی کبد گاوها در ماه آخر آبستنی (گروه ۴) در یک مورد (۱/۱۱٪) بیشتر از ۵٪ بود. با توجه به مقایسه فوق بار دیگر می‌توان نتیجه گرفت که وضعیت وقوع سندرم کبد چرب در شرایط این بررسی از فراوانی بیشتر برخوردار است.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان چربی کبد در حوالی زایش نشان می‌دهد که میانگین چربی کبد در گروه ۴،  $0.3/58 \pm 1/09$  و در گروه ۱،  $0.7/79 \pm 8/24$  می‌باشد (جدول ۲). علت اینکه در گروه ۱ انحراف معیار بیشتر از میانگین چربی کبد می‌باشد به علت محدوده وسیعی است که چربی کبد در ماه اول پس از زایش می‌تواند داشته باشد (۱۶). در یک بررسی که روی ۴۵ رأس گاو انجام شد میزان چربی تام کبد را قبل از زایش در حدود ۴٪ و ۲ هفته پس از زایش ۱۱٪ تعیین کردند. در این بررسی گاوها در کل چاق نبودند (۳). با توجه به آنکه در بررسی حاضر  $0.58/56$  از گاوان گروه ۴ امتیاز وضعیت بدنی شان کمتر از ۴ بود (جدول ۱) لذا شرایط دامهای تحت بررسی با آنچه که در مطالعه فوق آمد همخوانی داشته و مقادیر چربی تام کبد نیز از همسویی قابل توجهی برخوردار می‌باشد.

جدول شماره ۳ و ۵ نشان می‌دهند که میانگین چربی کبد و موارد وقوع کبد چرب در گروه ۱ به طور معنی داری از سایر گروهها منهای گروه ۴ بیشتر است. این یافته کاملاً مطابق با یافته‌های دیگران در این مورد می‌باشد (۳، ۷، ۸، ۹، ۱۶، ۲۲). در توضیح این رویداد

می‌توان گفت که تغذیه نامناسب در دوره افت شیر در اواخر دوره شیردهی به علاوه استرسهای مختلف اواخر آبستنی و اوایل زایش و احتمالاً فیبر جیره در اوایل بعد از زایش که عدم کفایت دستگاه گوارش در تامین انرژی مورد نیاز دام را اجتناب ناپذیر می‌سازد و همچنین اختلافات شناخته شده (کمبود آپولیپوپروتئین، فسفولیپید، کارنیتین و منجمله بیمارهای بعد از زایمان و توکسمی) و نا شناخته دیگر سبب تجمع چربی در کبد می‌گردند (۲، ۵، ۷، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۹، ۲۰، ۲۳ و ۲۴).

از مجموعه موارد غیر طبیعی که در کبد گاوهای تحت مطالعه پس از کشتار مورد بررسی قرار گرفت تنها تغییر رنگ بافت کبد به طرف زردی با موارد کبد چرب ارتباط معنی دار داشت (۸ و ۱۶). در حالیکه حضور لیپیدوزیس کبد ناشی از فشار با موارد کبد چرب ارتباط معنی داری را نشان نداد. علت این نوع لیپیدوزیس کبدی که به صورت کانونی و معمولاً در مجاورت محل اتصال مزانتز وقوع می‌یابد، فشار ناشی از این اتصالات بر کپسول کبد است که مانع از خونرسانی به قسمتهای زیرین پارانشیم کبد و هیپوکسی می‌گردد (۱۲).

## پاورقی‌ها

1- Cryostat 2- Student's T-test 3- Chi-Square test 4- Fisher exact test 5- Mc Nemar

## منابع مورد استفاده

۱- محمد، کاظم - ملک‌افضلی، حسین و نهایتیان، وارثگس ۱۳۶۶. کتاب روشهای آماری و شاخصهای بهداشتی، جلد اول، چاپ سوم، ناشر مؤلفین، صفحات: ۱۱۸-۱۱۶ و ۲۰۰-۱۹۷.

2- Bogin, E.; Avidar, y.; Merom, M.; Soback, S and Brenner, G. 1988. Biochemical changes associated with the fatty liver syndrome in cows. Journal of comparative pathology, 98: 337-347.

Hepatic lipidosis. In "Large animal internal medicine" edited by B.P. Smith. C.V. Mosby Company, Philadelphia. PP. 860-866.

16- Radostits, O.M. Blood, D.C. and Gay, C.C. 1994. Veterinary medicine. Eight edition. Bailliere Tindall, London, PP. 1354-1358.

17- Reid, I.M. 1980. Incidence and severity of fatty liver in dairy cows. Veterinary Record, 107: 281-284.

18- Remington, R.D. Andschark, M.A. 1970 Statistics with Applications to the biological and health sciences. Prentice-Hall, Inc. Englewoodcliffs, New Jersey. PP: 229-249.

19- Roberts, C.J. and Reid, I.M. 1993. Fat cow syndrome and subclinical fatty liver. In "Current veterinary therapy 3 food animal practice" edited by J.L. Howard. W.B. Saunders company, Philadelphia. PP. 315-317.

20- Roberts, C.J.; Turfrey, B.A. and Bland, A.P. 1993. Lipid deposition in different fiber types of skeletal muscle of preparturient dairy cows. Veterinary pathology, 20: 23-31.

21- Schafer, M.; Furl, M.; Johannsen, U.; Ehrentraut, W.; Deckert, W. and Geinitz, D. 1991. Variations in the blood chemistry of lactating cows in relation to the fat content of the liver. Monatshefte fur Veterinarmedizin, 46: 666, 668-669. CAB abstracts publication data.

22- Staufenbiel, R.; lugner, D; Lugner, E.; Dargel, D. and Rossow, N. 1991. Assessment of liver fat levels in dairy cows. Monatshefte fur Veterinarmedizin, 46, 798-805. Abst.

23- Woitow, G.; Staufenhiel, R. and Langhans, J. 1991. Comparison of histological determination of liver fat. Monatshefte fur Veterinarmedizin, 49: 576-582. CAB abstracts publication data.

24- Yoshino, K.; Katoh, N.; Takahashi, K. and Yuasa, A. 1992. Purification of a protein from serum of cattle with hepatic lipidosis, and identification of the protein as haptoglobin. American Journal of veterinary Research, 53:951-956.

1992. Induction of fatty liver in cows by ethionine administration and concomitant decreases of serum apolipoproteins B-100 and A-I concentrations. American Journal of Veterinary Research, 53: 2035-2042. CAB abstracts publication data.

6- Eddy, R.G. 1992. Fatty liver syndrom. In "Bovine Medicine" edited by A.H. Andrews, R.W. Blowey, H.Boyd and R.G. Eddy. Blackwell Sci. Publ. London. PP. 598-600.

7- Grummer, R.R. 1993, Etiology of lipid related metabolic disorders in periparturient dairy cows. Journal of Dairy Science, 76: 3882-3896.

8- Herdt, T.H. 1988. Fatty liver in dairy cows. Veterinary clinics of north America: Food Animal practice, 4: 269 287.

9- Johannsen, U.; Furl, M.; Schafer, M; Ehrentraut, W.; Deckert, W. and Geinitz, D. 1991. Studies of the lipid content and function of the liver in cows in relation to stage of lactation. Monatshefte fur Veterinarmedizin, 46: 670-674. CAB abstracts publication data.

10- Mazur, A.; Marcos, E. and Rayssiguier, Y. 1988. Plasma lipoproteins in dairy cows with naturally occurring sever fatty liver: evidence of alteration in the distribution of Aop A-I-con taining lipoproteins. Lipids, 24: 805-811.(CAB abstracts publication data.

11- MC Cormac, J. 1978, Fat-cow syndrome and its complications. Veterinary medicine and small animal clinician 73: 1057-1060.

12- McLachlan, N. J. and Cullen, J.M. 1988. Liver, biliary system, and exocrine pancreas. In "edited by R.G. Thomson. B.C. Decker inc, Toronto. PP. 229-267.

13- Morrow, D.A. 1974. Fat cow syndrome. Journal of Dairy Science, 59: 1625-1629.

14- Morrow, D.A.; Hillman, D.; Dade, A.W. Andkitchen, H. 1979. Clinical investigation of a dairy herd with the fat cow syndrome. Journal of the American Veterinary Medical Association, 174: 161-167.

15- Pearson, E.G. and Maas, J. 1990.

3- Bruss, M.L. 1993. Metabolic fatty liver of ruminants. In "Advances in veterinary science and comparative medicine, animal models in liver research" edited by

جدول شماره ۱- تعداد گاوها در هر گروه بر حسب امتیاز وضعیت بدن

امتیاز وضعیت بدن					گروه
۵	۴	۳	۲	۱	
۰	۳	۷	۵	۲	۱
۱	۳	۱۳	۲۵	۵	۲
۱	۱۱	۱۴	۶	۱	۳
۲	۲	۴	۱	۰	۴

جدول شماره ۲- میانگین وانحراف معیار چربی کبد در گروههای مختلف

گروه	میانگین وانحراف معیار	
	تعداد میانگین چربی کبد	انحراف معیار چربی کبد
۱	۱۷	۷/۷۹
۲	۴۷	۳/۴۵
۳	۳۳	۳/۵۸
۴	۹	۳/۵۰

جدول شماره ۳- مقایسه میانگین چربی کبد در گروههای مختلف

گروهها	گروه ۲	گروه ۳	گروه ۴
گروه ۱	SD(P<۰/۰۱)	SD(P<۰/۰۱)	NSD
گروه ۲	NSD	NSD	NSD
گروه ۳			NSD

SD= Significant difference

NSD= Nonsignificant difference

جدول شماره ۴- تعداد و درصد موارد کبد چرب در گروههای مختلف

گروه	تعداد و درصد	
	تعداد موارد کبد چرب	درصد موارد کبد چرب
۱	۱۱	۶۴/۷۱
۲	۱۰	۲۱/۲۸
۳	۶	۱۸/۸
۴	۲	۲۲/۲۲
جمع	۲۹	۲۷/۳۶

جدول شماره ۵- مقایسه گروههای مختلف از نظر موارد کبد چرب

گروهها	گروه ۲	گروه ۳	گروه ۴
گروه ۱	SD(P<۰/۰۰۵)	SD(P<۰/۰۰۵)	SD(P<۰/۰۰۱)
گروه ۲	NSD	NSD	NSD
گروه ۳			NSD
گروه ۴			NSD

SD= Significant difference

NSD= Nonsignificant difference

C.E. Cornelive. 37: 417-449.

4- Collins, R. a: Reid, I.M; Williams, L.A. and Dennis, P.F. 1985. Histological measurement of fat content of liver of dairy cows. Journal of comparative pathology, 95: 437-441.

5- Echida, E; Katon, n. and takahashi, k.