卵巢静止牛に対する低単位 HCG の排卵誘起効果

中原 達夫・百目鬼郁男・山内 亮

(農林省家畜衛生試験場 中国支場)

近年、各種の gonadotrophin 製剤が牛の卵巢疾患の治療に用いられて著しい治療効果を挙げている。HCG による牛の卵巢發育障害の治療については MERZDORF (1937, 1939)¹⁾, KOCH (1938)²⁾ が油性 HCG を用いて治療効果のあることを報告して以来、HCG は本症の治療剤として使用されるようになっていく。わが国では山内ら (1948³⁾, 1951⁴⁾, 星ら (1952)⁵⁾ により油性 HCG 2,000 MU が有効であることが報告され、その後、多くの臨床試験⁶⁻¹¹⁾によりその治療効果が実証されている。しかし、本剤の治療用量については発表者によりかなり幅広い差違がみられる。また、水溶性 HCG は油性 HCG に比べて効果が劣ると考えられているが、両者の効果の量的差違については充分検討されていないようである。また、実験小動物においては、gonadotrophin に対する卵巢の反応は静脈内投与では筋肉内投与の場合に比べて、数倍敏感であることが認められている¹²⁻¹⁷⁾、牛ではこの点についても未だ明確にされていない。

本試験においては、油性および水溶性 HCG を卵巢静止牛に筋肉内あるいは静脈内に注射した場合の排卵誘起効果が剤型、注射方法の違いにより、どの程度異なるかを比較検討した。

実験材料ならびに方法

供試牛は黒毛和種の経産牛で、1963 年から 1969 年の間における家畜衛生試験場中国支場の外来牛ならびに巡回診療牛を含む 338 頭である。これらの牛は分娩後 40~180 日を経過して未だ発情を示さないもので、HCG 注射時あるいはその 1 週間前の 1~2 回の検査により卵巢に黄体の形成がなく、かつ卵胞の發育が全く触知されないか、あるいは小卵胞が存在するがその直径が 10 mm

Ovulatory response of quiescent ovary in beef cattle by injecting lower dose of human chorionic gonadotrophin.

NAKAHARA, Tatsuo, Ikuo DOMEKI & Makoto YAMAUCHI (Chugoku Branch Laboratory, National Institute of Animal Health, Wadayama, Asako, Hyogo 669-52)

Jap. J. Animal Reprod. 16 (2), 1970.

を越えないことから卵巢静止と診断されたものである。

使用した HCG は国内 2 社 (友田, 東芝) の製品で剤型は水溶性、油性の 2 種類で、力価は IU または MU で表示されたものである。水溶性 HCG は凍結乾燥粉末の状態でアンプルに封入されているもので、使用に当り滅菌生理食塩液で 250~500 IU/ml になるように溶解して使用した。油性 HCG は植物油に 200 IU/ml の割合に懸濁され、これに V_A, V_D, V_E などが添加されているものである。なお、MU 表示のものは 1 MU=3 IU として IU に換算して使用した。

試験群は HCG の剤型ならびに注射方法によって水溶性静脈内注射群、水溶性筋肉内注射群および油性筋肉内注射群の 3 群に分けた。HCG の注射回数は各群とも 1 回で、検討された HCG の用量は 250~3,000 IU の範囲である。処理後の卵巢の反応すなわち卵胞發育、排卵、黄体形成などの状態は処置後約 7 日の間隔で直腸検査により追跡した。また、排卵時における発情徴候発現の有無は畜主の観察結果によった。なお、HCG 注射後、無排卵の牛あるいは 2 回目の排卵が起こらなかった牛には HCG, PMS (500~1,000 IU) あるいは下垂体前葉性 gonadotrophin 製剤 (Vetrophin, 10 RU; Antrin, 10 AU) を再注射して、これらの gonadotrophin による排卵誘起効果を比較検討した。

試験成績

1. HCG 注射後 7 日以内の卵巢の反応

全試験牛 338 頭について HCG 注射後 5~7 日における卵巢の状態をみると、それまでに誘起排卵の起こったものは 222 頭 (65.7%)、無排卵のものは 116 頭 (34.3%) であった (Table 1)。無排卵牛 116 頭の検査時における卵巢の状態は卵胞の發育が触知されないものが 26 頭、直径 10 mm 以下の小卵胞が 1~2 個存在するものが 38 頭であり、残りの 52 頭のうち 50 頭には直径 10 mm 以上のかかなり大きい卵胞が存在し、これらの卵胞は注射前に比べて發育が進んでいることが認められた。また、他の 2 頭には直径約 20 mm の囊腫様大卵胞がみられた。次に誘起排卵がみられた 222 頭について

Table 1. Response of quiescent ovary to HCG injection in beef cow within 5~7 days after the treatment

Number of cows treated	338	%
Unovulatory animals	116	34.3
No developing follicle	26	7.7
With small sized follicle (a)	38	11.2
With medium sized follicle (b)	50	14.8
With cystic follicle (c)	2	0.6
Ovulated animals	222	65.7
Postovulatory	4	1.2
With soft corpus luteum	149	44.1
With hard corpus luteum	69	20.4

(a): Smaller than 10 mm. in diameter,

(b): Larger than 10 mm. in diameter,

(c): Larger than 20 mm. in diameter.

は、4 頭は排卵した跡の凹みが柔軟で排卵後間もないものと推察されたが、その他の 218 頭には排卵後数日 (3~4 日) を経ていると思われる黄体が形成されていた。これら黄体の大きさ、形は区々であるが、大部分は正常性周期の黄体初期のそれと同程度のものであった。しかし、直腸検査による黄体の触感 149 頭においては黄体初期のそれのように柔軟であったが、残りの 69 頭においては硬く弾力性が乏しいものであった。

本試験においては誘起排卵の時期を正確に知ることができなかったが、これら黄体の形状から推測すると、HCG 注射後 2~3 日のきわめて早期であろうと考えられた。

2. HCG 注射後 7 日以内における各群間の排卵誘起状態の比較

HCG 注射後 7 日以内における各注射用量に対する排卵誘起率は Table 2 に示す通りである。すなわち、250 IU では水溶性静脈内注射群においては 30% (9/30 頭) で、同筋肉内注射群の 11% (1/9 頭) に比べると若干高かったが、いずれもかなり低かった。しかし、500~750 IU では水溶性静脈内注射群 79% (26/33 頭)、同筋肉内注射群 71% (30/42 頭)、油性筋肉内注射群 75% (21/28 頭) で、各群ともかなり高い排卵誘起効果が認められた。また、1,000~3,000 IU 注射群における排卵率は 64~83% であり、この範囲では用量による差異はみられず、かつ 500~750 IU 群とも大差がないことが認められた。これらの成績から排卵を誘起し得る HCG の最小有効量は 500~750 IU であり、かつ用量 500~3,000 IU における排卵率は HCG の剤型、注射法の違いによる明瞭な差がないことが認められた。なお、

Table 2. Ovulatory response of quiescent ovary to HCG in the cow within 7 days after the treatment

Doses of HCG (IU)	HCG dissolved in saline		HCG suspended in sesame oil		Total	
	IV (a)	IM (b)	IM			
	(c) %	%	%			
250	9/30 30	1/9 11			10/39 26	
500~750	26/33 79	30/42 71	21/28 75		77/103 75	
1,000~1,500	27/39 69	57/86 66	16/25 64		100/150 67	
2,000~3,000		24/29 83	11/17 65		35/46 76	

(a): Intravenous injection,

(b): Intramuscular injection,

(c): Ovulated animals/Treated animals.

500~3,000 IU 注射例について、分娩後処置までの日数を 60 日以内、61 日以降に区分して排卵率を比較すると、Fig. 1 に示すように 61 日以降に処置を受けたものの排卵率は 60 日以内に処置を受けたものより若干高い傾向がみられた。

A: Induced ovulation within 7 days after the treatment.

B: Ovulation occurred between 8~15 days after the treatment.

C: Second ovulation following the treatment.

*: Number of animals.

Fig. 1. Relations between the rate of induced and second ovulations and the days from parturition to HCG injection.

3. HCG 注射後 7 日までの無排卵牛におけるその後の排卵発現状況

HCG 注射後 7 日までに無排卵であった 87 頭のうち、つぎの 8 日間に検査し得たものは 59 頭であった (Table 3)。このうちの期間内 (処置後 8~15 日) に排卵したものは 19 頭 (32%) のみで、この排卵率は処置後

Table 3. Occurrence of ovulation in the cow with quiescent ovary between 8 to 15 days after HCG injection

Days from parturition to HCG injection (a)	No. of cows examined	No. of cows ovulated	%
Within 60	21	4	19
61~100	27	9	33
101 or more	11	6	55
Total	59(b)	19	32

(a): Doses of HCG were ranged from 500 IU to 3,000 IU.

(b): Cystic follicles were found in 2 cows, 28 days and 41 days after the treatment, respectively.

7 日以内のそれに比べてかなり低かった。また、ここにおいても分娩後 61 日以降に処置を受けたものは 60 日以内に処置を受けたものに比べて高い排卵率を示した。

4. HCG 注射後の 2 回目排卵

HCG 注射後 15 日までの間に排卵がみられた 241 頭のうち、処置後の 2 回目の排卵の発現状況を検査し得たものは 159 頭であった (Table 4)。このうち HCG 注射後 31 日までに 2 回目の排卵が起こったものは全体で 134 頭 (84%) あり、各群間の排卵率 (82~86%) には差違がみられなかった。

Table 4. Occurrence of the second ovulation following HCG injection

Injection of HCG	No. of cows examined	No. of cows ovulated	%	Days from HCG injection to 2nd ovulation	
				Mean	Range
HCG dissolved in saline (IV)	39	32	82	15.1	10~31
HCG dissolved in saline (IM)	83	70	84	14.1	7~23
HCG suspended in sesame oil (IM)	37	32	86	14.8	8~31
Total	159	134	84	14.5	7~31

Doses of HCG were ranged from 500 IU to 3,000 IU.

また、HCG 注射から 2 回目排卵までの日数は平均 14.5 日あったが、この日数の分布は Table 5 に示すように処置後 10 日までのものは全体の 22%、15 日までのものは 54%、20 日までのものは 75% で、誘起排卵と 2 回目排卵の間隔は正常性周期に比べてかなり短いも

Table 5. Interval from the injection of HCG to the second ovulation

Days after HCG injection	No. of cows ovulated	No. of cows unovulatory	%
Within 10	35	22	
11~15	51	32	4
16~20	34	21	3
21~25	9	6	11
26~31	5	3	7
Total	134	84	25

Doses of HCG were ranged from 500 to 3,000 IU.

の多いことが注目された。

なお、Fig. 1 に示すように 2 回目の排卵の発現率は分娩後 61 日以降に処置を受けたものが 86% (105/122 頭) で 60 日以内に処置を受けたものの 78% (29/37 頭) に比べて若干高い傾向がみられた。

5. HCG 注射後の排卵に伴う発情徴候の発現状況

誘起排卵時における発情徴候の発現状況は Table 6 に示す通りである。すなわち、7 日以内の排卵例ではほとんど不明であり、わずか 7.2% (16/222 頭) に認められただけであった。しかし、8~15 日間の排卵例では 57.9% (11/19 頭) でこれに比べてかなり高く、また、2 回目排卵時には 73.1% (98/134 頭) と大半のものに認められた。

Table 6. Occurrence of estrous signs at the first and second ovulation following HCG injection

Injection of HCG (a)	At the 1st ovulation				At the 2nd ovulation	
	Within 7 days (b)	Between 8 to 15 days (b)	Between 16 to 20 days (b)	Between 21 to 31 days (b)	Within 7 days (b)	Between 8 to 15 days (b)
HCG dissolved in saline (IV)	6/62	9.7	3/6	50.0	21/32	65.6
HCG dissolved in saline (IM)	8/112	7.1	5/8	62.5	56/70	80.0
HCG suspended in sesame oil (LM)	2/48	4.2	3/5	60.0	21/32	65.2
Total	16/222	7.2	11/19	57.9	98/134	73.1

(a): Doses of HCG were ranged from 250 IU to 3,000 IU.

(b): Days after the injection of HCG.

6. HCG 注射による無排卵牛に対する gonadotrophin 再処置の効果

HCG 注射により排卵しなかったものあるいは 2 回目

Table 7. Induction of ovulation following the reinjection of gonadotrophin in unovulatory cow treated with HCG

Reinjection of gonadotrophin	Doses of HCG (IU) at the 1st treatment				Total	%
	250	500~750	1,000~1,500	2,000~3,000		
HCG 500~750 IU	3/6	2/3			5/9	56
" 1,000~1,500 IU	5/8	2/6	2/6	0/1	9/21	43
" 2,000~3,000 IU	1/2	1/3	3/4	1/5	6/14	43
Total		15/29 (52)		5/15 (33)	20/44	45
PMS 500~1,000 IU		3/3	7/14	4/6	14/23	61
Pituitary G. (a)	3/3	1/1		2/3	6/7	86

(a): Swine pituitary gonadotrophin (10 AU) or sheep pituitary gonadotrophin (10 RU).

の排卵が起こらなかった 74 頭に対して gonadotrophin を再注射した後の 卵巢の反応は Table 7 に示す通りである。HCG を再注射した場合の排卵率は初回と同用量では 33% (5/15 頭) で、2 倍以上の用量における 52% (19/29 頭) に比べて若干低率を示した。しかし、この排卵率は再注射に PMS 500~1,000 IU を用いた場合に 61% (14/23 頭)、下垂体前葉性 gonadotrophin を用いた場合に 86% (6/7 頭) とそれぞれ高まることが注目された。

考 察

分娩後の生理的な卵巢休止期が過ぎても卵胞の発育が悪く無排卵の状態が続くものは卵胞発育障害と呼ばれ、本症はさらに卵巢の病状によって卵巢静止、ならびに卵巢萎縮に区分されている (山内 1957)¹⁰⁾。これらのうち卵巢静止は卵巢萎縮に比べて一般に障害の程度が軽いことが認められているが、本試験の対象牛はごく少数の卵巢萎縮を除くと大部分が卵巢静止と診断されたものである。

HCG による牛の卵胞発育障害の治療効果については国外では MERZDORF (1937, 1939)¹⁾、Koch (1938)²⁾、わが国では山内ら (1948³⁾、1951⁴⁾、星ら (1952)⁵⁾ をはじめとして多くの臨床試験⁶⁻¹¹⁾の結果が報告されている。しかしながら、これらの報告における HCG の治療用量には油性 250 RU ($\div$ IU) ~ 2,000 MU ($\div$ 6,000 IU) と発表者によりかなり幅広い差がめられる。本試験においては水溶性ならびに油性 HCG の卵巢静止に対する排卵誘起効果を比較した結果、用量 250 IU では排卵誘起はほとんど認められなかったが、両者とも 500~750 IU で

70% 以上の排卵率が得られた。このことから牛卵巢静止に排卵を誘起し得る HCG の最小有効量は 500~750 IU であることが認められたが、この用量は MERZDORF (1937, 1939)¹⁾、Koch (1938)²⁾ らの示している治療用量 250~375 RU ($\div$ IU) より多く、国内の諸報告³⁻¹¹⁾ に示されている 1,000 IU ~ 2,000 MU ($\div$ 6,000 IU) より少量であった。このように卵胞発育障害に対する HCG の有効用量にかなりの差がみられることの理由としては試験対象牛の障害程度に差があること、本病の診断ならびに治療成績の判定基準が報告者により異なることなどが挙げられよう。本試験の対象牛はすべて肉牛 (黒毛和種) で大部分が卵巢静止であったが、これらの 70~80% に排卵を誘起し得る最小用量が 500~750 IU で、また、この最小有効量の 2~4 倍の 1,000~3,000 IU を用いた場合でも排卵誘起率が 64~83% であることから用量 500~3,000 IU の範囲では用量の増加に伴う反応の向上 (用量反応関係) はないものと認められた。これらの点から、卵巢静止治療のための HCG の実際の用量は肉牛に関する限り最小有効用量より若干多い 1,000 IU 位を標準として良いものと考えられる。一般に薬剤効果が発現するためには体液中に有効濃度がある時間保持されることが必要である。従って、肉牛より体重の重い乳牛については、この基準を若干高くとることが妥当と考えられる。中原ら (1961)^{19, 20)} は牛に大量の HCG を反復投与すると、これに対する抗ホルモンが体内に産生され、このような牛にはその後 HCG を再投与しても治療効果が期待できないことを認めているが、このような点からも、HCG の治療用量の基準をできるだけ低単位に抑えることが望ましいと考えられる。

従来から、HCG による卵胞発育障害の治療においては、油性 HCG は水溶性 HCG に比べて効力が優ると考えられている。また、山内ら (1965)²¹⁾ は牛に筋肉内注射した油性 HCG の血中における濃度は水溶性 HCG のそれに比べて、最高レベルは若干低いが、その持続時間はかなり長く、かつ低下の勾配がゆるいことを認めている。しかしながら、本試験においては用量 500~3,000 IU の範囲の筋肉内注射による排卵誘起率は水溶性 HCG では 66~83%、油性 HCG では 64~75% と両者ほとんど差がなかったことから、実際には両剤型による治療効果には差がないことが認められた。

各種 gonadotrophin による排卵誘起反応の鋭敏度は実験小動物においては静脈内注射では皮下注射に比べて数倍高いことが認められている¹²⁻¹⁷⁾。今道ら (1962)¹²⁾、信永ら (1963)¹⁴⁾、1965¹⁶⁾ によると HCG を静脈内注射

した場合の排卵誘起効果は皮下注射例のそれに比べてマウスでは 2.8~3.2 倍、ラットでは 6.7 倍、家兎では 10 倍それぞれ鋭敏であることが示されている。しかしながら、卵巢静止牛に水溶性 HCG を注射した場合の排卵誘起効果は静脈内注射群が筋肉内注射群に比べて若干優ってはいたが、その差違は僅少で、最小有効量はともに 500~750 IU で等しかった。上述の諸報告において使用されている実験動物は生理的に卵巢周期を営むものであり本試験においては病的な卵巢静止状態にある牛を対象としている。また静脈内注射ならびに皮下注射による排卵誘起反応の鋭敏度の差違は上述のように動物の種類によってもかなり異なることが認められているので、本試験の結果が実験小動物における成績と一致しなかったことはこれらの理由によると考えられる。

卵胞発育障害牛の下垂体前葉の gonadotrophin 含有量は正常性周期を営む牛の最高レベル（発情前期）に及ばないことから、本症の発生は直接には前葉における gonadotrophin 生産性の低下に起因すると推察されている（山内ら 1964）²²⁾。HCG による排卵誘起は内因性 gonadotrophin との協力作用によると考えられるので、処置後の卵巢の反応が一様でないことは病牛の下垂体前葉の gonadotrophin 分泌状態が各個体によってかなり異なることに関係があるのではなからうか。とくに分娩後 60 日以内のものは 61 日以降に処置を受けたものに比べて排卵誘起率、2 回目排卵の発現率ともに低かったことは分娩後の生理的な卵巢休止期における下垂体前葉の gonadotrophin 含有量が著しく低いこと（山内ら 1964）と関連して興味あることである。

誘起排卵は大多数において処置後 2~3 日のきわめて早期におこり、排卵後形成された黄体の中には硬く弾力性の乏しい（形成不全）ものがかなり多数みられた。HCG は LH とともに牛の黄体機能を維持する作用を有することから（DONALDSON ら、1965^{23,24)}；HANSEL 1966²⁵⁾），この種の黄体が形成されたことはこれら両ホルモンが不足している状態にあったと考えられる。これに関連して一般に誘起排卵後形成された黄体の寿命は性周期におけるそれに比べてかなり短かく、次の排卵が処置後平均 14.5 日とかなり早く起こっていることは興味深い。

これらのことから、HCG による卵巢静止の治癒機転としては、まず誘起排卵は内因性 gonadotrophin との協力による HCG の直接作用により起こるが、処置後 2 回目の排卵は誘起排卵後に形成された黄体に由来する progesterone ならびに estrogen が 2 次的に feed back 機構を介して下垂体前葉の分泌機能を activate してこ

れを転機として正常な性中枢——下垂体前葉——卵巢間の相互の機能調節が得られたことによると考えられる。従って、下垂体前葉の gonadotrophin 分泌機能が著しく減退しているものにおいては、HCG の直接作用による卵巢の反応が弱く現われるだけでなく、誘起排卵後の黄体形成が著しく悪い場合にはその後の卵巢機能の回復も得られないことになろう。このことは HCG 投与後の無排卵牛あるいは 2 回目排卵が起こらなかったものに HCG を再投与した場合の卵巢の反応が前回処置後のそれと同様に良くなかったことによっても理解される。また、これらの無排卵牛に対して前葉性 gonadotrophin あるいは PMS を再投与した場合の排卵誘起の状態が HCG に優る結果が得られたことは卵巢静止牛の下垂体前葉の gonadotrophin 分泌状態は LH または FSH が不足しているもの、あるいは両成分とも不足しているものなどがあり、一様でないことを示すものであろう。またこのことから実際の治療に当っては HCG を単一に用いるより、これと卵胞刺激作用の強い PMS を併用する方法（山内ら 1958）²⁶⁾ が推奨されよう。

HCG 注射後の誘起排卵時に発情徴候の発現したものは少数であったが、2 回目排卵時には大多数が発情徴候を示した。牛においては分娩後の初回排卵は発情徴候を伴わないで起こるものが多いことが知られている（MORROW ら 1969²⁷⁾，中原ら 1969²⁸⁾）。CARRICK ら（1969）²⁹⁾ は卵巢割去牛に estrogen を連続注射すると、このホルモンに対する反応性が漸次低下してくるが（refractory state to estrogen），このような状態の牛に progesterone を前処置した後に estrogen を注射すると発情徴候が再び現われることから、分娩後の初回排卵時における無発情（鈍性発情）は妊娠後期における内因性の高単位 estrogen の影響によるものであり、また、progesterone による発情徴候の再発現はこれが神経系に作用して estrogen に対する感受性を高める可能性を示唆している。本試験における誘起排卵は大部分が分娩後の初回排卵であることから、誘起排卵時における無発情は分娩後の初回排卵時における無発情と同一理由によることが推察される。一方、MELAMPY ら（1957）³⁰⁾，小笠ら（1958）³¹⁾，山内ら（1959）³²⁾ は牛において発情徴候の発現には progesterone が estrogen と協力的に作用することを示している。本試験においては HCG 注射後 7 日以内の誘起排卵例ではほとんど全部が無発情で、処置後 8~15 日の間の排卵例では半数以上に発情徴候が現われていることから、HCG 注射後の急激な卵胞の発育、排卵の過程における estrogen ならびに progeste

rone の分泌状態は量的にも両者の均衡においても正常性周期における卵胞成熟時のそれと異なる可能性も考えられる。

結 論

卵巣静止牛（黒毛和種、経産牛）338 頭に油性ならびに水溶性の低単位 HCG (250~3,000 IU) を筋肉内あるいは静脈内注射した場合の排卵誘起効果を検討して次の成績を得た。

1. HCG 注射後 5~7 日までに排卵を誘起し得る HCG の最小有効量は 500~750 IU であり、かつ用量 500~3,000 IU の範囲における排卵率は 64~83% で HCG の剤型、用量、注射法の違いによる明瞭な差は認められなかった。

2. 排卵誘起時期はその後に形成された黄体の形状から処置後 2~3 日のきわめて早期であると推測された。

3. 処置後 7 日以内の無排卵牛で 15 日までに排卵したものは検査した 58 頭のうち 19 頭 (33%) であった。

4. HCG 注射後 2 回目の排卵の発現は HCG の注射条件による差はなく、全体で 134/159 頭 (84%) にみられた。また、処置後 2 回目排卵までの日数は平均 14.5 日 (7~31 日) で誘起排卵後形成された黄体の寿命が全般に短いことが注目された。

5. 誘起排卵率、2 回目排卵の発現率はともに分娩後 61 日以降のものは 60 日以内のものに比べて高い傾向がみられた。

6. 発情徴候は処置後 7 日以内の誘起排卵時には 16/222 (7.2%) 頭にみられたのみで、8~15 日の間の排卵時には 11/19 頭 (57.9%) とかなり多くの例に認められ、2 回目排卵時には 98/134 頭 (73.1%) と大部分のものに認められた。

終りに臨み、本研究の遂行のために多量の gonadotrophin 製剤を御恵与下さった友田製薬、東芝製薬ならびに大日本製薬株式会社の各社に深謝します。

(1970. 6. 26 受付)

文 献

- 1) MERZDORF, G.: Inaug. Diss. Hannover, 1937; *Deut. Tztl. Wschr.*, 343, 1939.
- 2) KOCH, W.: *Berl. u. Münch. Tztl. Wsch.*, 576, 1938.
- 3) 山内 (亮)・藤井 (毅)・星 (冬): 日獣学誌, 10, 115, 1948.
- 4) 山内 (亮)・芦田 (浄): 同誌, 13, 311, 1951.
- 5) 星 (冬)・山内 (亮)・西川 (治)・藤井 (毅): 日獣会誌, 5, 321, 1952.
- 6) 小暮 (尚): 同誌, 9, 532, 1956.
- 7) 加藤 (和): 同誌, 9, 481, 1956.
- 8) 蘭守 (竜)・高橋 (正): 同誌, 10, 56, 1957.
- 9) 高橋 (正)・蘭守 (竜): 獣畜新報, (219), 1289, 1957.
- 10) 川村 (昇): 同誌, (202), 278, 1957.
- 11) 横田 (景): 同誌, (224), 144, 1958.
- 12) 今道 (友)・信永 (利)・三浦 (豊)・塩田 (尚): 家畜繁殖誌, 8, 58, 1962.
- 13) 今道 (友)・三浦 (豊): 同誌, 8, 127, 1963.
- 14) 信永 (利)・今道 (友): 同誌, 9, 25, 1963.
- 15) 信永 (利)・今道 (友): 同誌, 9, 41, 1963.
- 16) 信永 (利)・中村 (勝)・細谷 (妙): 同誌, 11, 16, 1965.
- 17) 信永 (利)・高橋 (和): 同誌, 13, 85, 1967.
- 18) 山内 (亮): 家畜繁殖学最近の歩み (文永堂), 1957.
- 19) 中原 (達)・山内 (亮)・片岡 (敏): 家畜繁殖誌, 7, 27, 1961.
- 20) 中原 (達)・山内 (亮)・片岡 (敏): 同誌, 7, 33, 1961.
- 21) 山内 (亮)・中原 (達)・百目鬼 (郁): 日獣学誌, 27 (附), 410, 1965.
- 22) 山内 (亮)・中原 (達)・金田 (義): 同誌, 26 (附), 426, 1964.
- 23) DONALDSON, L. E., W. HANSEL & L. D. VAN-VLECH: *J. Dairy Sci.*, 48, 331, 1965.
- 24) DONALDSON, L. E. & W. HANSEL: *ibid.*, 48, 903, 1965.
- 25) HANSEL, W.: *J. Reprod. Fert.*, Suppl. 1, 33, 1966.
- 26) 山内 (亮)・中原 (達)・大塚 (佳)・乾 (純)・円山 (八)・久米井 (信)・高村 (礼): 家畜繁殖誌, 3, 117, 1958.
- 27) MORROW, D. A., S. T. ROBERTS & K. MCENTEE: *Cornell Vet.*, 59, 134, 1969.
- 28) 中原 (達)・百目鬼 (郁)・山内 (亮): 日獣学誌, 31 (学会号), 145, 1969.
- 29) CARRICK, M. J. & J. N. SHELTON: *J. Endocrinol.*, 45, 99, 1969.
- 30) MELAMPY, R. M., M. A. EMMERSON, J. M. RAKES, L. J. HANKA & P. G. ENNESS: *J. Animal Sci.*, 16, 967, 1957.
- 31) 小笠 (晃)・山内 (亮)・円山 (八): 家畜繁殖誌, 3, 123, 1958.
- 32) 山内 (亮)・中原 (達)・橋本 (和)・乾 (純)・円山 (八)・麻山 (力): 家畜繁殖誌, 4, 167, 1959.

Summary

Ovulatory responses and fertility in the cow by injection of human chorionic gonadotrophin (HCG) for treating quiescent ovary have been reported by many workers. In these reports, however, a wide range of doses has been employed due to a lack of precise evidence on the optimum therapeutic doses of HCG. In small animals, such as mouse, rat and rabbit, it has been recognized that ovarian responses to exogenous gonadotrophin given by intravenous injection are more sensitive than those by intramuscular injection, and the preparations of HCG suspended in oil appear to be more effective than those dissolved in saline. These problems are important for the practical treatment of ovarian diseases in cattle, but have not been investigated. The objectives of the present study were (1) to examine the ovulatory responses of quiescent ovary in the cow by injecting different doses of two forms of HCG preparation—aqueous solution and oily suspension, at the same time to establish the minimum effective dose of HCG, and (2) to compare two routes of administration—intravenous and intramuscular injection—on the effectiveness for stimulating quiescent ovary.

A total of 338 Japanese beef cows was employed as materials. These animals were treated from 1963 to 1969 as outpatient cows of our laboratory or treated by ambulatory clinic. Ovaries were examined by rectal palpation once or twice a week prior to the treatment and diagnosed as ovarian quiescence because of absence of corpus luteum and non or poor development of follicle. Aqueous solution or oily suspension of HCG at a dose level ranging from 250 IU to 3,000 IU were injected either intravenously or intramuscularly. Animals were divided randomly into three treatment groups: (1) aqueous solution—intravenous injection group, (2) aqueous solution—intramuscular injection group and (3) oily suspension—intramuscular injection group. Ovarian responses following the treatment were examined per rectum at an interval of 5~7 days, and occurrence of estrus was checked by owner. Certain animals in which ovulation was not induced primarily or ovarian condition relapsed into quiescence following the induction of ovulation were retreated with HCG, PMS (500~1,000 IU) or anterior pituitary gonadotrophins (Vetrophin 10 RU, Antrin 10 AU). The results obtained were summarized as follows:

(1) Within 5~7 days after HCG injection, ovulation was induced in 222 of 338 treated cows (65.7%) as shown in Table 1. By rectal palpation, 4 of them were known to be at postovulatory phase. The remaining 218 animals having medium sized corpora lutea which seemed to be passed for few days after the induced ovulation. These findings suggested that ovulation might be induced as early as within 2~3 days after HCG injection in most of the treated animals. Corpora lutea existing in 149 out of 218 animals were as soft and elastic as those in early luteal phase of normal estrous cycle, whereas corpora lutea existing in the remaining 69 animals were as hard as those in regressive phase. In 116 unovulatory cows, one or two follicles of various size including two cases of cystic follicles were found, except 26 animals in which no follicular development was palpated per rectum.

(2) Ovulation rate in the groups each received an injection of 250 IU, 500~750 IU, 1,000~1,500 IU and 2,000~3,000 IU of HCG was 26%, 75%, 67% and 76% respectively, as shown in Table 2. Among the three groups given more than 500 IU, the ovulation rate did not differ, and no difference was found between two forms of HCG preparation—aqueous solution and oily suspension. In the group given 250 IU of an aqueous solution, ovulation rates were little higher in animals injected intravenously than in those injected intramuscularly. However, they were distinctly lower than those in the groups given more than 500 IU. Eventually, the minimum effective dose of HCG for inducing

ovulation within 5~7 days after the treatment in most of treated cows with quiescent ovaries was recognized to be 500~750 IU. Furthermore, it seemed that there were no distinct differences in ovulation rate between the forms of HCG preparation—aqueous solution and oily suspension, and also between the routes of administration—intravenous and intramuscular injection.

(3) Of 59 cows in which induced ovulation was not induced within 5~7 days after the treatment, ovulation occurred only in 19 animals (33%) in the following 8 days (Table 3). This ovulation rate was considerably lower than that of induced ovulation within first 7 days.

(4) The second ovulation occurred in 134 (84%) of 159 cows between 7 to 31 days after the treatment, and there were no differences of ovulation rate between different preparations of HCG nor different routes of injection (Tables 4 and 5). Life span of corpus luteum grown following the induced ovulation seemed to be considerably short in comparison with that formed in the normal estrous cycle, mean interval from the injection of HCG to the second ovulation being 14.5 days.

(5) Ovulation rate in both induced ovulation and second ovulation was somewhat higher in the animals which passed over 61 days after parturition than in those within 60 days (Fig. 1). This difference might possibly be due to inferior secretion of pituitary gonadotrophin in the animals within 60 days after parturition.

(6) Estrous signs were found only in 16 (7.2%) of 222 animals at the induced ovulation. However, ovulation occurred between 8~15 days after the treatment and the second ovulation were accompanied with estrous signs in 11 (57.9%) of 19 animals and 98 (73.1%) of 134 animals respectively. It was conceivable that a state without preconditioning with progesterone might be involved in the cause of anestrus at the induced ovulation.

(7) In the cows with refractory ovaries to HCG, reinjection of some or two times doses of HCG was not so effective for inducing ovulation as shown in Table 7. However, by reinjection of PMS and swine or sheep pituitary gonadotrophin, ovulation was induced in 14 of 23 animals (61%) and 6 of 7 animals (86%) respectively.