

家兎の排卵に関する研究

登内 徳一郎

信州大学農学部 家畜育種繁殖学研究室

I 緒 言

通常の哺乳動物は性成熟期に達すれば、周期的に発情が起り自然に排卵があるが、家兎は自然には排卵が起らず、交尾が必要であるとされている^{7,14)}。しかしこのような交尾排卵をする家兎も、必ずしも排卵に交尾が必要ではなく、陰莖の膣内への挿入なしに交尾類似動作をさせても¹²⁾、電気刺激によっても¹⁵⁾、銅塩注射によっても¹⁷⁾排卵が起り、また Friedman 反応によって知られる妊婦尿の注射³⁾、Gonadotropin¹⁰⁾ とくに LH の注射によっても排卵する。

この家兎の交尾から排卵までの時間については交尾後10時間前後で排卵するという多くの報告があるが、Human chorionic gonadotropin (HCG) などの排卵誘起物質投与による排卵時間についての研究は比較的少ない。HARPER (1962)⁵⁾ は LH 注射後 9 時間30分から14時間まで、また山本 (1941)²⁰⁾ は妊婦尿注射後12時間から13時間で最も多く排卵したと報告した。一方従来の排卵に関する実験は排卵処理を行なった後、種々の時間に多数の動物につき開腹を行って比較研究している。この方法では生体内に自然状態にある卵巣の変化や同一卵胞の時間的推移に伴う変化を連続的に観察することは困難である。腹窓を通じての観察は生体内雌性生殖器の状態および機能を解明するにはより適した方法であると考えられる。この腹窓法で排卵の状態をみた報告は 2, 3^{3,10,12)} みられるが排卵誘起物質として HCG 製剤を用いて排卵を観察した報告は少なく、HCG 製剤ではないが妊婦尿を家兎に注射した山本の研究を見るのみである。そこで腹窓法を用いて交尾による排卵と、HCG を家兎に注射し排卵させ、両者の排卵の状況を比較検索し、若干の所見をえたので報告する。

II 実験材料および方法

実験には日本白色種の雌家兎21頭を用いた。実験時の体重は最高3.65kg、最低2.5kg、年齢は最高33ヶ月、最低7ヶ月で、15頭は未経産、6頭は経産の家兎であった。

前報¹⁸⁾と同様な腹窓を装着した家兎は排卵処置として、交尾排卵については1頭宛隔離飼育したものを雄家兎の飼育箱に入れ、原則として1回の交尾を確認後雌雄を分離し、腹窓下で卵巣を観察しつつ排卵を待った。HCG注射家兎については交尾をさせることなく、HCG (帝国臓器K. K.) を各腹窓家兎にそれぞれ 25 I. U. および 50 I. U. を耳静脈より注射した。なお多くの HCG 注射家兎は注射排卵誘起後、30~45日目に反復して第2回の HCG 注射を行ない排卵の状況を観察した。排卵の確認は排卵処置をした腹窓装着家兎を背位に保定し腹

窓を通して卵巣を観察し、山本¹⁹⁾、原⁴⁾らと同様、卵胞頂点の出血あるいは出血点を確認することによって行ない、排卵処置から排卵までの経過時間を排卵時間とした。

III 実験結果

1 交尾による排卵

(1) 卵胞の変化

交尾後の卵胞は暫時発達して、ついに排卵するが、この経過を外形的な直径でみれば、交尾前約1.0~1.5mm前後の卵胞が交尾後1時間から約4時間までの間に急速にその直径の増加を示し、以後緩漫に増加し、交尾後7~8時間で2.0~2.3mmの大卵胞となり、その後はほとんど増加がなく排卵に至る。しかしこの大卵胞は直径の増加の停止とともに卵胞表面が急速に隆起し、半球状に卵巣表面に突出する。さらに排卵がせまれば隆起部の中央附近に小点状の小突出部が表われ、この小突出部が破裂して線状の小出血をみる。本実験においてはこれを排卵とした。排卵する卵胞は交尾前白黄色半透明であるが、交尾後3~4時間より卵胞の周囲に小血管が現われ、卵胞内面は暫時桃色から紅色となり、充血し、卵胞表面の小突出部の破裂部は紅色の小点となって出血点が明らかにみられた。

(2) 排卵時間

交尾から最初の排卵および最後の排卵が見られるまでの時間を排卵開始時間および排卵終了時間とし、両者を平均した時間を中間排卵時間、排卵開始より排卵終了までに要した時間を排卵所要時間とし、これらを一括して表に示せば Table 1 の通りである。すなわち排卵開始時間の最も早いものは9時間12分で最も遅いものは10時間33分、排卵終了時間の最も早いものは10時間16分、最も遅い個体は12時間4分であった、したがって交尾家兎は交尾後9時間12分から12時間4分の間にすべて排卵があった。また中間排卵時間の平均は、交尾後10時間18分であって、この時間を中心にして排卵が見られた。各家兎の排卵所要時間の平均は1時間11分であって、排卵が始まってから約1時間前後で終了した。なお交尾排卵における排卵数は 7.9 ± 1.35 であった。

2 HCG 注射による排卵

(1) 卵胞の変化

HCG注射後卵胞は交尾後と同様、多くは暫時発達して排卵に至るが、交尾排卵とは多少趣きを異にする、すなわち排卵直前の卵胞の直径が2.5~2.7mmとやや大きく、卵胞の破裂する小突起部および出血点が大きく、出血量も多い、卵胞の色彩も注射後4~5時間で充血し、淡紅色から次第に紅色となり、注射後8~9時間で卵胞は混濁し、深紅色となる、このころから卵胞小突起部周辺に内出血様に黒紅色の小斑点が次第に現われ数を増加し、同時に小突起部が形成されて行き、これが破裂し排卵が起る。この場合交尾排卵より強力で噴出状であって、破裂までの経過時間が長いようにみられた。また交尾排卵時にはみられなかった非排卵性の血様卵胞が常に数箇存在した。この血様卵胞は出血点を形成することなく、時間経過とともに黒紅色から黒色となり注射後3~4日で1~2mmとなって次第に萎縮した。これらの傾向は注射量の多い50 I. U. 注射の方が25 I. U. 注射より強く、25 I. U. 注射は50 I. U. 注射より交尾排卵に近い状態にあった。

Table 1. The time from mating to ovulation in the rabbit

Rabbit no.	Time between mating and ovulation			Time of ovulation from onset to end	No. of ruptured follicle
	onset of ovulation	end of ovulation	mid-time of ovulation		
	hr. min.	hr. min.	hr. min.	hr. min.	
28	9 : 12	10 : 16	9 : 44	1 : 04	8
27	9 : 20	10 : 22	9 : 51	1 : 02	7
215	9 : 24	10 : 38	10 : 01	1 : 14	10
19	9 : 35	10 : 33	10 : 04	0 : 52	9
46	9 : 45	10 : 56	10 : 26	1 : 14	7
92	10 : 03	11 : 23	10 : 43	1 : 20	6
250	10 : 33	12 : 04	11 : 18	1 : 31	8
Mean	9 : 42 ±0 : 28	10 : 53 ±0 : 39	10 : 18 ±0 : 33	1 : 11 ±0 : 13	7.9 ±1.35

Table 2. The time from injection of HCG to ovulation in the rabbit

Dose of HCG (I. U.)	Rabbit no.	Time between injection of HCG and ovulation			Time of ovulation from onset to end	No. of reptured follicle
		onset of ovulation	end of ovulation	mid-time of ovulation		
		hr. min.	hr. min.	hr. min.	hr. min.	
50	219	9 : 38	10 : 35	10 : 07	0 : 57	5
	239	9 : 50	11 : 00	10 : 25	1 : 10	10
	232	10 : 00	11 : 00	10 : 30	1 : 00	7
	222	9 : 50	11 : 16	10 : 30	1 : 26	14
	231	10 : 11	11 : 11	10 : 41	1 : 00	10
	221	10 : 20	11 : 20	10 : 50	1 : 00	8
	243	11 : 25	13 : 28	12 : 27	2 : 03	9
	Mean	10 : 10 ±0 : 36	11 : 24 ±0 : 57	10 : 47 ±0 : 46	1 : 14 ±0 : 24	9.0 ±2.83
25	243	10 : 05	11 : 05	10 : 35	1 : 00	11
	245	9 : 55	11 : 25	10 : 40	1 : 30	7
	252	10 : 10	11 : 25	10 : 48	1 : 15	7
	225	10 : 31	11 : 30	11 : 01	0 : 59	6
	229	10 : 14	11 : 54	11 : 04	1 : 40	5
	246	10 : 19	12 : 05	11 : 12	1 : 46	9
	249	10 : 30	12 : 06	11 : 18	1 : 36	8
	227	11 : 01	12 : 15	11 : 38	1 : 14	4
Mean	10 : 21 ±0 : 20	11 : 43 ±0 : 25	11 : 02 ±0 : 21	1 : 21 ±0 : 20	7.1 ±1.88	
Mean	10 : 16 ±0 : 27	11 : 34 ±0 : 42	10 : 55 ±0 : 34	1 : 18 ±0 : 21	8.0 ±2.61	

(2) 排卵時間

(i) HCG注射と排卵時間

HCGを初めて50 I. U. および25 I. U. 注射した家兔の排卵時間は Table 2 に示す通りである, HCGを注射した家兔は全例排卵したが, 最も早い排卵開始時間は9時間38分, 最も遅い排卵終了時間は13時間28分であって, この間にすべての排卵が起った。HCGを注射して排卵させた15例の中間排卵時間の平均は10時間55分であって, これを交尾家兔の10時間18分と比較すれば約30分交尾家兔が早く排卵したことになるが, 有意な差は認められなかった。排卵の開始時間および終了時間もほぼ同様であって交尾排卵はHCG注射による排卵より早く起る傾向が認められた。またHCGの50 I. U.

と25 I. U. 注射とを比較すれば中間排卵時間では50 I. U. 注射がやや早い傾向が認められた。排卵所要時間については, いずれも大差なく約1時間から1時間30分前後を要した。なおHCG 50 I. U. を注射した家兔番号243は注射後の排卵がHCGの初回注射例中で最も遅く, 排卵開始時間11時間25分, 終了時間13時間28分, 中間排卵時間12時間27分で, 排卵所要時間も2時間3分と長く異例ともみられる。

つぎにHCGの50 I. U. および25 I. U. 注射を通じ, 体重1 kg 当りに換算した注射量と中間排卵時間との関係を Fig. 1 に示した。注射量の最高は家兔番号231の19.23 I. U. で中間排卵時間は10時間41分, 最低は家兔番号227の8.06 I. U. で中間排卵時間は11時間38分であった。異例ともみられる家兔番号243を除外すれば単位体重当りのHCG注射量の中間排卵時間に対する回帰が存在し ($y = 11.69 - 0.076x$), 1頭当り注射量25 I. U. から50 I. U. 注射の範囲においては単位体重当り注射量の多いものは早く排卵する傾向が認められた。

(ii) 反復HCG注射と排卵時間

初めてHCGを注射した15例のうち9例に初回のHCG注射後30~45日に第2回のHCG注射を行なって排卵時間をみたが, その結果は Table 3 の通りである。なお反復HCG注射を行なった実験家兔の初回注射における排卵開始時間は10時間9分±18分, 排卵終了時間は11時間20分±30分, 中間排卵時間は10時間45分±23分, 排卵所要時間は1時間10分±19分, 排卵数 7.9 ± 1.90 であった。この初回のHCG注射による排卵時間と第2回の注射による排卵時間を平均値と比較すれば, 傾向として排卵の開始, 終了, および中間の各時間ともに第

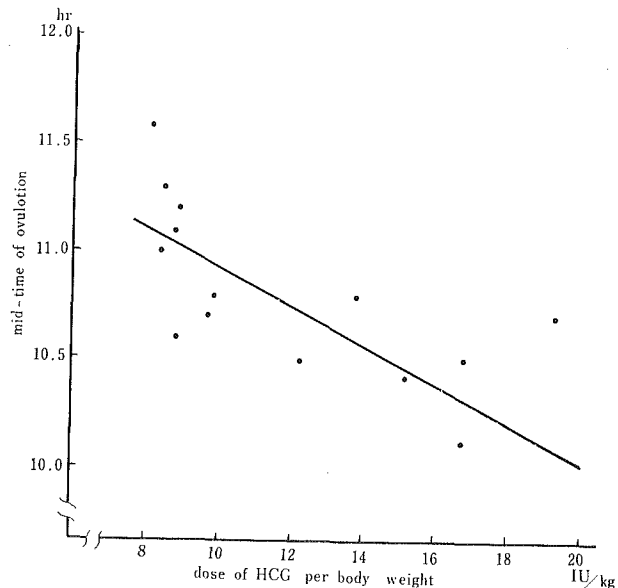


Fig. 1. The relation between the mid-time of ovulation of 14 rabbits and the dose of HCG per kg of body weight. (Linear regression; $y = 11.69 - 0.076x$)

2回注射においてやや遅くなり、排卵所要時間も第2回注射でやや長くなった。

(3) 排卵数 (破裂卵胞数)

本実験における最も多い排卵数は14、最も少なかった排卵数は4で、HCG注射における初回および第2回注射をこみにした平均は 7.6 ± 2.41 であった。HCG注射時の排卵数についても50 I. U. 注射と25 I. U. 注射との間に有意な差はみられなかったが、傾向としては50 I. U. 注射が25 I. U. 注射より排卵数多く (初回注射と第2回注射をこみにすれば50 I. U. 注射 8.7 ± 2.46 , 25 I. U. 注射 6.6 ± 1.98)、初回注射は第2回注射より多い傾向にあった。

Table 3. The time from the second injection of HCG to ovulation in the rabbit

Dose of HCG (I. U.)	Rabbit no.	Time between injection of HCG and ovulation			Time of ovulation onset to end	No. of reaptured follicle	Dose of initial injection (I. U.)
		onset of ovulation	end of ovulation	mid-time of ovulation			
		hr. min.	hr. min.	hr. min.	hr. min.		
50	249	9:35	10:51	10:13	1:16	9	25
	246	10:08	11:16	10:42	1:08	10	25
	252	9:53	12:00	10:57	2:07	10	25
	221	9:54	12:03	10:59	2:09	6	50
	225	10:27	12:19	11:23	1:52	6	25
	Mean	9:59 $\pm 0:19$	11:42 $\pm 0:37$	10:51 $\pm 0:26$	1:42 $\pm 0:29$	8.2 ± 2.05	
25	243	10:08	11:38	10:53	1:30	5	25
	239	11:05	11:52	11:29	0:47	6	50
	219	10:53	12:16	11:35	1:23	6	50
	232	11:03	12:08	11:36	1:15	5	50
	Mean	10:47 $\pm 0:27$	11:59 $\pm 0:17$	11:23 $\pm 0:24$	1:14 $\pm 0:19$	5.5 ± 0.58	
Mean		10:21 $\pm 0:33$	11:49 $\pm 0:31$	11:05 $\pm 0:28$	1:30 $\pm 0:29$	7.0 ± 2.06	

IV 考 察

交尾排卵における排卵時間は交尾後10時間前後とするものが多く、HEAPE (1905)⁷⁾は交尾後10時間、WALTONら(1929)¹⁹⁾は交尾後9時間45分~13時間30分、HILLら(1935)⁸⁾は交尾後8時間~12時間、また腹窓法によったものでは原(1941)⁴⁾が10時間前後、山本(1941)²⁰⁾が9時間半より10時間半、中曾(1952)¹¹⁾が9時間30分より12時間と報告している。本実験においても交尾家兎の排卵は交尾後9時間12分から12時間4分の間であり、中間排卵時間の平均が10時間18分であったことから、交尾家兎の排卵は交尾後10時間前後、9時から12時間の間にあるものと考えらる。

25 I. U. および50 I. U. のHCG注射家兎の排卵は9時間35分から13時間28分の間であったが、山本は妊婦尿1cc/kgの静脈内注射で10~15時間、多くは12時間前後に排卵が見られ

ると報告している。また HARPER (1962)⁵⁾ は、LH (Pregnyl, Organon) 25~50 I. U. の静脈注射で $9\frac{1}{2}$ ~13時間に排卵が起るとし、その後の実験(1963)⁶⁾ では LH注射後10時間で排卵なく、 $10\frac{1}{2}$ 時間と $10\frac{3}{4}$ 時間の間に50%、14時間で100%排卵をみたとし、LH注射家兎の排卵は $9\frac{1}{2}$ 時間と14時間の間に起ると報告した。この HARPER の実験は多数の家兎を屠殺して排卵を確認すると云う方法で行なわれているが、本実験は同一個体を一貫して観察できる腹窓法によって行なわれている。この方法の違いにも拘らず、HCG 25 I. U. および 50 I. U. 静脈注射家兎の排卵時間はこれらの報告とほぼ一致しており、注射後9時間30分から13時間30分の間にあり、中間排卵時間は約11時間と考えられる。しかし、HARPER⁶⁾ は家兎における排卵がLH注射によるにせよ交尾によるにせよ同じ時期に起るとしているが、本実験においては交尾家兎の排卵時間の平均がHCG注射家兎の平均より約30分早く起ることが認められた。この差は有意ではなかったが、本実験と同様、腹窓法を用いた山本は妊婦尿注射による排卵は交尾による排卵より遅く、卵胞が破裂するまでの卵胞発達の経過は交尾排卵より長いと報告している。本実験においても山本と同様卵胞の発達過程に差がみられたこと、また HARPER とは実験方法が異なることなどから、交尾家兎はHCG注射家兎より排卵時間はやや早いものと考えられる。

HCG注射家兎においては中間排卵時間が単位体重当りHCG注射量に対する直線回帰を示したことから25~50 I. U. 注射の範囲においては排卵時間は体重当りの注射量によって影響され注射量の多いものが早く排卵するので、50 I. U. 注射の方が25 I. U. 注射の場合よりも早く排卵したものと推定する。なお家兎番号243は排卵時間が他の例より著しく遅れたが、この原因は同家兎が年令30ヶ月、体重も3.30kgと比較的重く、しかも経産の家兎であったことによる個体的な原因にもとづく異例であるものと思われる。

反復HCG注射において初回注射より第2回注射時の排卵時間が遅くなり、排卵所要時間も長くなる傾向にあった。その原因について一部黄体の存在、あるいは COLLIP^ら^{2,15)} のいう Antihormone の産生なども考えられるが、本実験からはこの点について解明しえない。前述の山本は交尾による排卵は最初の排卵が起ってから最後の排卵の完了するまでに約1時間を要するに過ぎないが、妊婦尿注射では2時間以上を要する場合があると報告し、本実験においても初回注射の際の異例とみられる個体および第2回注射時の3個体が約2時間を要し、石田^ら(1962)⁹⁾ の報告した血様卵胞様の卵胞がHCG注射家兎に存在することなどから、HCGの注射とくにこの反復は排卵前の卵胞に作用して gonadotropin の感受性を減じ排卵を遅らせるものとも考えられる。なお本実験においては卵胞頂点の出血あるいは出血点の確認、すなわち「卵胞の破裂」をもって排卵としたが、卵のすべてが卵胞の破裂時卵胞から放出されるものでないことを示唆した HARPER の報告があるので、本実験における実際の卵胞からの卵の放出は前述の排卵時間よりやや遅くなるものとも考えられる。本実験の腹窓家兎については同一個体を一貫して観察し卵胞の経時的变化を調べることを目的としたため、観察中に HARPER らのように卵巣を摘出し卵胞内を洗うなどの実験は行なわれなかった。

この実験において排卵数はHCG注射家兎では25 I. U. から50 I. U. 注射の範囲においては注射量の多いものが排卵数やや多く、HCGの30日~45日の間隔をおく反復注射は排卵数を減ずる傾向が認められた。

なお排卵に必要な誘起物質の注射量について ADAMS (1961)¹⁾ は1頭当りLH (Pregnyl,

organon) 20 I. U. でもよいとし、前記 HARPER は LH 25 ~ 50 I. U. 注射で排卵されると報じている。HCG 25 I. U. および 50 I. U. 注射を行なった本実験においても全例排卵し、25 I. U. 注射は 50 I. U. 注射より卵胞の発達、排卵の状態が交尾排卵に近いが、卵胞の破裂数がやや少ないことから、20 I. U. でも排卵が期待されるものの、25 ~ 50 I. U.、体重 1 kg 当り 8 ~ 19 I. U. の静脈注射の方が適当と考えられる。

V 摘 要

腹窓を装着した家兎に交尾あるいは排卵誘起物質として HCG 25 I. U. および 50 I. U. を耳静脈に注射して排卵を調べた。

(1) 交尾による排卵は交尾後 9 時間 12 分から 12 時間 4 分の間に起り、中間排卵時間は 10 時間 18 分であった。

(2) HCG の注射による排卵は注射後 9 時間 38 分から 13 時間 38 分の間にあり、中間排卵時間は 10 時間 55 分であった、したがって交尾家兎は HCG 注射家兎より排卵時間は短かいものと考えられる。

(3) 中間排卵時間は単位体重当り HCG 注射量に対する回帰を示し、排卵時間は単位体重当りの注射量によって左右され、注射量の多いものは早く排卵する傾向が認められた。また 25 I. U. 注射は 50 I. U. 注射より排卵数がやや少なかった。しかし排卵に至るまでの卵胞の状態は 25 I. U. 注射が 50 I. U. 注射より交尾排卵に類似していた。

(4) 30 日 ~ 45 日間隔の HCG 注射において初回注射より第 2 回注射の方が排卵生起が遅れ、排卵数もやや減じた。

本実験の実施にあたり、御指導をいただいた岩手大学丹羽太左衛門教授ならびに御校閲を賜った本学吉田重雄教授に対しつつしんで感謝の意を表する。

文 献

- 1) ADAMS, C. E. (1961) Artificial insemination in the rabbit. *J. Reprod. Fertil.*, 2:521.
- 2) COLLIP, J. B. (1934) The loss of sensitivity to gonadotropic hormones. *Am. J. Physiol.*, 109: 22.
- 3) FRIEDMAN, M. H. (1929) Mechanism of ovulation in the rabbit. *Am. J. Physiol.*, 90: 617.
- 4) 原 昊 (1941) 腹窓法による家兎性器の研究. 第 1 編家兎における排卵の状況並びに其の前後の卵巣所見. *日生理誌.*, 6: 599.
- 5) HARPER, M. J. K. (1961) The time of ovulation in the rabbit following the injection of luteinizing hormone. *J. Endocrinol.*, 22: 147.
- 6) HARPER, M. J. K. (1963) Ovulation in the rabbit: The time of follicular rupture and expulsion of the eggs, in relation to injection of luteinizing hormone. *J. Endocrinol.*, 26: 307.
- 7) HEAPE, W. (1905) Ovulation and degeneration of ova in the rabbit. *Proc. Roy. Soc.*

- Lond., 76 : 260.
- 8) HILL, R. T., ALLEN, E. & KRAMER, T. C. (1935) Cinematographic studies of rabbit ovulation. *Anat. Rec.*, 63 : 239.
 - 9) ISHIDA, K. & SAKUMA, Y. (1962) Histochemical studies of blood follicles of the rabbit. *日不妊誌.*, 7 : 151.
 - 10) 星冬四郎・兼松満造 (1934) 所謂下垂体前葉性ホルモンの家兎に及ぼす生理的作用について. *日畜会報.*, 7 : 1.
 - 11) 中曾栄吾 (1952) 家兎卵管運動に関する研究. *日産婦誌.*, 4 : 159.
 - 12) 加藤 浩・堀川 坦 (1952) 家兎の排卵機構と発情に関する研究. *日獣畜大紀要.*, 1 : 10.
 - 13) 倉品克一郎 (1942) 子宮の運動に関する研究. *日生理誌.*, 7 : 263.
 - 14) PARKES, A. S. (1960) Marshall's physiology of Reproduction, Vol. 1, Part 1, (ed. A. S. PARKES) Longmans, Green & co. London. P.257.
 - 15) 柴生田潤一 (1952) 性腺刺戟ホルモンの抗ホルモンに就て. *日産婦誌.*, 4 : 418.
 - 16) 芝田清吾 (1932) 家兎の発情周期および排卵. *日畜会報.*, 2 : 2.
 - 17) 鈴木雅洲 (1963) 排卵機転. *日不妊誌.*, 8 : 14.
 - 18) 登内徳一郎 (1963) 家兎の子宮運動に関する研究. *信大農学報.*, 8 : 49.
 - 19) WALTON, A. & HAMMOND, J. (1929) Observations on ovulation in the rabbit. *Brit. J. Exp. Biol.*, 6 : 190.
 - 20) 山本晃朝 (1941) 妊婦尿注射時の家兎卵巣の観察. *日生理誌.*, 6 : 621.

Studies on the Ovulation in the Rabbit.

Tokuichiro TONOUCHI

Laboratory of Animal Breeding, Fac. of Agric. Shinshu Univ.

Summary

The induction of ovulation in the mature rabbit which was induced either by mating or by intravenous injection of 25 I. U. or 50 I. U. of human chorionic gonadotropin (HCG) was studied by means of abdominal window method.

The results obtained were as follows.

1. Ovulations in seven rabbits took place between 9 hr. 12 min. and 12 hr. 4 min. after mating. The average mid-time of ovulation was 10 hr. 18 min. after mating.

2. Ovulations in fifteen rabbits took place between 9 hr. 38 min. and 13 hr. 28 min. after injection of HCG. The average mid-time of ovulation was 10 hr. 55 min. after injection of HCG. It seems that the time of ovulation in the rabbit after mating was a little shorter than after the injection of HCG.

3. A significant linear regression was observed between the mid-time of ovulation in fourteen rabbits after the injection of HCG and the doses of HCG per kg of body weight. A significant difference was observed between the number of ruptured follicles which were induced by the injection of 25 I. U. HCG and that of 50 I. U. The changes which occurred in the follicles before ovulation in the case of 25 I. U. HCG injection were more similar to those after mating than those in the case of 50 I. U. HCG.

4. The injection of HCG for ovulation were repeated two times using the same rabbits at the intervals of one to $1\frac{1}{2}$ months, the time required for ovulation after injection seemed to be longer in the second injection than in the first injection.