

研究レポート

重軌馬雌馬へのGnRH類似体ブセレリン単回投与が
排卵効果に及ぼす影響と内分泌動態三木 渉^{1,2)}・鬼山裕幸³⁾・竹田直将⁴⁾・木村優希¹⁾・羽田真悟⁴⁾・松井基純⁴⁾・田谷一善⁵⁾・南保泰雄⁴⁾

要約

重軌馬雌馬の発情期の卵胞、子宮の形態的变化を観察し、GnRH類似体 ブセレリン(以後ブセレリン)単回投与が排卵と内分泌動態に及ぼす影響を検討した。重軌馬雌馬22頭をブセレリン投与群(n=8)、対照群(n=14)に分類し、試情馬による発情徴候を示し、>45mmの主席卵胞が存在し、前回検査と比較して子宮浮腫の減少が認識された時に、ブセレリン40 μ gを筋肉内投与した。定時に経直腸超音波診断装置による卵胞、子宮の観察と血中LH、FSH、プロジェステロン、エストラジオール-17 β を測定した。

48時間以内の排卵率は投与群100%(8/8)で、対照群57.1%(8/14)に比べ高く (P=0.051)、排卵確認までの平均時間は投与群29 \pm 9(SEM)時間、対照群59 \pm 7(SEM)時間であった。交配回数、二排卵率、受胎率は両群に差は認められなかった。ブセレリン投与1~2日にLH、FSHは一過性に上昇し、対照群ではLHは排卵時に高く、FSHは卵胞の成長に伴い一過性的の上昇が認められた。45mm以上の主席卵胞を有し、子宮浮腫減少時のブセレリン40 μ g単回投与は、重軌馬雌馬に対して排卵効果に有用性があることが示唆された。

はじめに

馬は長日性の季節繁殖動物で、交配時期が限定される。重軌馬の生産地である北海道(十勝)の交配適期は3~6月に限定され、受胎の成否により生産性は大きく左右される。効率的な重軌馬生産のために、一発情一回の交配、衛生的な人工授精による受胎が望ましく、授精適期の調節が効果的であると考えられるが、重軌馬雌馬の効果的な排卵誘起に関する研究報告はほとんど認められない。

一般的に馬の排卵誘起には、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(以後hCG)が用いられている。>35mmの卵胞に対してhCG1500~6000IU投与し、48~72

時間以内に排卵が集中する高い排卵効果が報告されている[5.8.13.21.22.33]。hCGは経済的で高い排卵効果の反面、複数排卵による双胎妊娠のリスク[27]や、抗体産生による反応性の低下が指摘されている[30.31]。そこで、GnRH類似体デスロレリンインプラント製剤(OvuplantTM)による効果的な排卵誘起が試みられている[4.7.18.20]。しかし、インプラント製剤の適応は不受胎の場合、下垂体性ダウンレギュレーションによる発情休止期や排卵間隔の延長が指摘され、排卵確認後インプラント製剤を除去することが推奨されている[7.18]。また、日本ではインプラント製剤は認可されてい

¹⁾Miki Wataru, Kimura Yuki ; 岐阜大学大学院連合獣医学科

²⁾Miki Wataru ; 北海道農業共済組合連合会

³⁾Oniyama Hiroyuki ; 十勝農業共済組合

⁴⁾Takeda Naomasa, Haneda Shingo, Mastui Motozumi, Nanbo Yasuo ; 帯広畜産大学

⁵⁾Taya Kazuyoshi ; 東京農工大学

*本研究リポートは、Journal of Equine Science誌、2016年27巻144-156頁に英文で掲載された論文を和訳し、一部改編したものである。

ない。そこで、ブセレリン投与による排卵誘起が試みられ[1.2.14.32]、単回投与による排卵効果の報告がある[32]。一方で、ブセレリン単回投与は、LHの一過性の上昇を示すが、LHサージの持続には不十分である [10.21.26.29]との報告もある。このような背景からブセレリンの単回投与による排卵効果と、繁殖成績に及ぼす影響を検討し、重軌馬雌馬の発情期の卵胞、子宮の形態的变化と内分泌動態を明らかにするために試験を行った。

供試馬および試験方法

連続する2繁殖シーズンの4~6月、正常な発情周期を有する重軌馬雌馬のべ102頭に対して、試情馬による発情徴候を示し、1~3日間の経直腸超音波検査にて>45mmの主席卵胞が認められた時にブセレリン[エストマル注、川崎三鷹製薬(株)、東京]40 μ g(n=31)、20 μ g(n=21)を筋肉内投与し、同様の条件で観察した無処置群(n=50)との48時間以内の排卵率の比較検討を行った。ブセレリン40 μ g投与群の48時間以内の排卵率は93.5%(28/31)、ブセレリン20 μ g投与群は71.4%(15/21)、無処置群は56%(28/50)であった[図1]。ブセレリン40 μ g投与群の48時間以内の排卵率が、無処置群に比べ有意に高かった(P<0.01)ことから、ブセレリン投与量を40 μ gと設定し、発情期の卵胞、子宮の形態的变化を明らかにし、内分

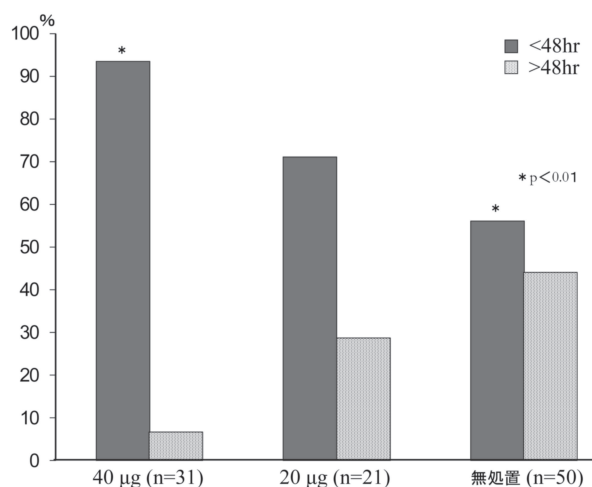


図1 ブセレリン40 μ g、20 μ g投与群と無処置群の排卵率

(試情馬による発情徴候を示し、>45mmの主席卵胞が認められた時にブセレリン40 μ g、20 μ gを筋肉内投与し、同様の条件で観察した無処置群との48時間以内の排卵率の比較)

泌学的検索を目的として本試験を実施した。

連続する2繁殖シーズンの4~6月、正常な発情周期を有する重軌馬雌馬16頭、のべ22頭に対して、試情馬による発情徴候を示し>45mmの主席卵胞が確認され、前回記録された子宮浮腫の減少が観察された時にブセレリン40 μ gを筋肉内投与した投与群(n=8)と、無処置で排卵まで観察した対照群(n=14)において観察を行った。供試馬の年齢は3~17歳、平均8.9 \pm 4.7(SD)歳、産次数は0~10産(未経産3頭、経産19頭)、平均3.2 \pm 2.8(SD)産であった。対照群の1例が分娩後15日での観察であったが、投与群(8頭)およびその他の対照群(13頭)は、分娩後29日以降の観察および空胎馬(4頭)における発情で観察を行った。

投与試験は、総発情周期数を基に、投与群、対照群をクロスオーバーデザインにより試験を実施した。投与群は投与後、排卵確認まで6時間間隔、排卵後は48時間まで12時間間隔で卵胞(卵巢)、子宮の経直腸超音波検査を行った。対照群は、排卵確認後2日まで、1日間隔で同様に卵胞(卵巢)、子宮の観察を行った。卵胞および子宮の形態は、経直腸にて超音波診断装置に5MHzリニア型直腸検査用探触子 [SSD-500,UST-588-5,Aloka,tokyo]を接続して検索した。描出された卵胞静止像から(長径+短径)/2を卵胞径として計測した。両群とも超音波検査に際しへパリンナトリウム加真空採血管にて、頸静脈より採血し、遠心分離後、血漿を-30 $^{\circ}$ Cにて凍結保存し、ホルモン測定に供した。

試験期間中、供試馬は種雄馬による自然交配を行い、交配回数と、初回排卵から48時間以内に排卵が確認された場合を二排卵とし二排卵率を比較した。排卵確認後、14日と21日に経直腸超音波検査による妊娠診断を行い両群における受胎率を比較した。

結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。主席卵胞径は継続して計測しANOVAの分散分析に供した。有意な変化はANOVAの分散分析に供し、投与群と対照群との間で有意差検定を行った。群間での排卵率と妊娠率の相違はフィッシャーの正確確立検定、交配回数はウェルチのT検定、二排卵率はカイ二乗検定を行った。すべての統計処理にはコンピュータのソフトウェアStat Viewを使用し、5%

未満の危険率で有意差を検討した。

成績

排卵までの卵胞径および形状の変化

排卵5日前から1日前までの平均卵胞径の推移を図2に示した。対照群では3日前、卵胞径は 45.7 ± 1.1 mm(n=9)から1日前 50.3 ± 1 mm(n=14)に成長し排卵に至った。投与群では3日前の卵胞径 47.0 ± 1.6 mm(n=7)から1日前 52.1 ± 1.9 mm(n=8)に成長し排卵に至った。投与群と対照群の卵胞径は排卵に向け成長したが、卵胞発育に伴う卵胞径は両群に差は認められなかった。6時間間隔で観察を行った投与群の8例において、6例(75%)は排卵前24~6時間で卵胞は球形から円錐形、また洋梨状への形態的变化が認められ排卵したが、2例(25%)は球形のまま排卵に至り、明らかな形態的变化は認められなかった。

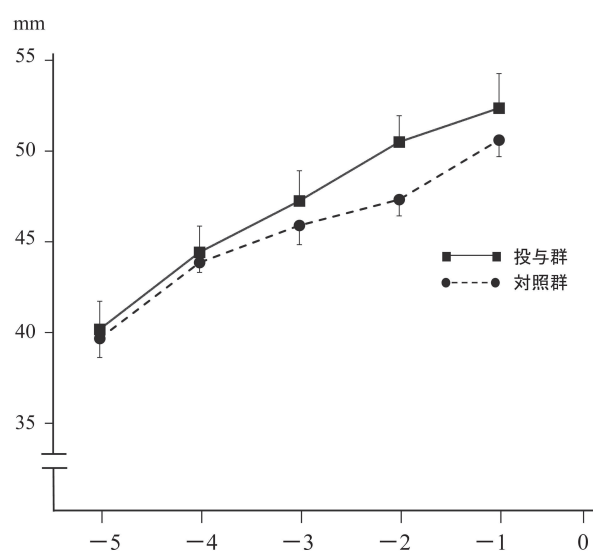


図2 排卵までの主席卵胞径の推移(0=排卵)

(排卵5日前から1日前の主席卵胞の(長径+短径)/2を卵胞径とした平均卵胞径の推移。0:排卵)

排卵までの時間

供試馬の24時間間隔での排卵率を図3に示した。排卵確認までの時間は投与群が6~48時間、平均 29 ± 9 (n=8)時間、対照群が12~120時間、平均 59 ± 7 (n=14)時間であった。投与群では48時間以内の排卵率が100%(8/8)で、非投与群の57.1%(8/14)に比べ高い傾向が認められた(P=0.051)。投与群では6時間以内に排卵が確認されたのが37.5%(3/8)、また42~48時間が62.5%(5/8)と2

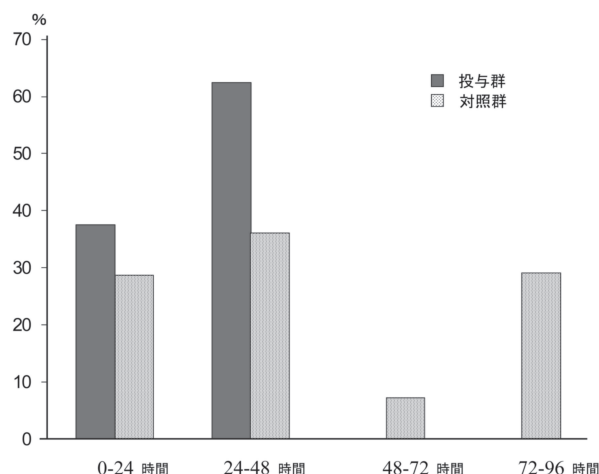


図3 投与群と対照群の排卵間隔(時間)

(投与群: プセレリン投与時0時、対照群: 卵胞径>45mm、子宮浮腫の減少を0時)

群に分かれた。対照群では48~72時間後に排卵したのは1頭(7.1%)のみで5頭(35.7%)は72時間以上経過して排卵に至った。

交配回数、二排卵率、受胎率

一発情あたりの交配回数は対照群では1~3回、平均 1.6 ± 0.2 (n=14)回、投与群では1~2回、平均 1.8 ± 0.2 (n=8)回で両群に有意な差はなかった。対照群では3回の交配が3例あったが、投与群では2回以上の交配はなかった。

投与群の48時間以内の二排卵率は37.5%(3/8)で、対照群の28.6%(4/14)に比べ高い傾向がみられたが有意な差は認められなかった。

受胎率は投与群、対照群ともに50%(4/8および7/14)で両群に差はなく、双胎妊娠も認められなかった。交配回数、複数排卵率、受胎率は表1に示した。

内分泌動態

投与群はプセレリン投与日、対照群は投与群と同様に>45mmの卵胞、子宮浮腫の減少が認めら

表1 交配回数、2排卵率、妊娠率

| | n | 交配回数* | 2排卵率(%) | 妊娠率(%) |
|-----|----|----------|---------|--------|
| 投与群 | 8 | 1.8(1-2) | 37.5 | 50 |
| 対照群 | 14 | 1.6(1-3) | 28.6 | 50 |

* 平均(回数)

れた日を0日とし、-3日から4日までのLH、FSH、プロジェステロン、エストラジオール-17 β の推移を図4に示した。投与群における値は開始日と同じ時間の値、もしくは前後の平均を用いて1日1値として解析した。

対照群における黄体形成ホルモン(LH)の推移は、0日に1.8 \pm 0.4(n=13)ng/mlから漸増し、3日には3.0 \pm 0.5(n=11)ng/mlに上昇、4日に2.6 \pm 0.6(n=9)ng/mlと減少に転じた。一方投与群では、0日まで対照群と類似して推移しブセレリン投与時1.6 \pm 0.3(n=8)ng/mlが投与後1日に3.6 \pm 1.5(n=8)ng/mlに一過性の上昇を示し、2日に1.7 \pm 0.5(n=8)ng/mlに減少した。

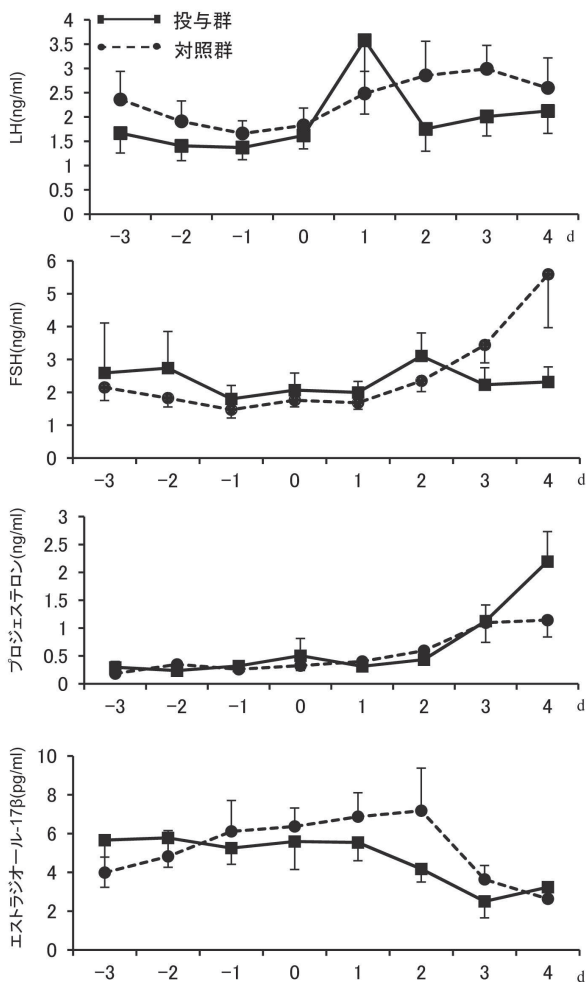


図4 血中LH、FSH、プロジェステロン、エストラジオール-17 β (平均 \pm SEM)の推移

(投与群はブセレリン投与日、非投与群は投与群と同様に $>$ 45mmの卵胞、子宮浮腫の減少が認められた日を0日とした。投与群は開始日と同じ時間、もしくは前後の平均を用いて1日1データとして解析)

対照群における卵胞刺激ホルモン(FSH)の推移は-3日から1日までは2.0ng/mlの近値で推移し、2日から増加に転じ4日に5.6 \pm 1.6(n=9)ng/mlに増加した。一方投与群は0日に2.1 \pm 0.5(n=8)ng/mlから2日に3.1 \pm 0.7(n=8)ng/mlと一過性に増加し、4日に2.3 \pm 0.5(n=6)ng/mlに減少し、対照群に対して低値であったが、有意な差は認められなかった。

プロジェステロン(P₄)の推移は投与群、対照群とも-3日から1日にかけて0.5ng/ml以下の基底値で推移し、2から3日に両群増加に転じ、投与群で4日に2.2 \pm 0.5(n=6)ng/ml、対照群で1.1 \pm 0.3(n=9)ng/mlに増加した。排卵が48時間以内であった投与群のP₄は高い傾向であったが対照群との間に有意な差は認められなかった。

エストラジオール-17 β (E₂)の推移は、対照群は-3日から増加し2日に7.2 \pm 2.2(n=14)pg/mlとピークに達し、3日に3.6 \pm 0.7(n=12)pg/mlと減少した。投与群では0日に5.6 \pm 1.4(n=8)、3日に2.5 \pm 0.8(n=6)pg/mlに減少した。両群ともに排卵確認前後に低下する傾向が認められた。

考察

馬の排卵時期予測の指標として、主席卵胞径と子宮の浮腫所見が有力な手がかりとされている[3,16,22,28]。馬の排卵前の卵胞径は約40~45mmとされ、季節や馬の種類によって変動がある[15]。本研究において、世界最大級の馬として認識されている日本輓系種(重輓馬)の排卵前の卵胞径は50mm以上で、60mmに達する卵胞も認められ、報告されている馬の平均的な卵胞径より大型であった。また、日本の重輓馬における排卵前の卵胞径に関する報告とほぼ一致していた[17]。

排卵前の卵胞形状は84%が球形から円錐、洋ナシ状などに形状の変化が認められ、16%が球形の状態まで排卵に至った報告がある[28]。6時間間隔で観察を行った投与群において、排卵6時間前に球形を呈していたのは2例(25%)で、6例(75%)は、排卵前24~6時間は球形から円錐形、また洋梨状への形態的变化が認められた。卵胞の形態的变化は排卵7日前にも認められる(3%) [28]ことから、卵胞の形態変化のみで排卵時期を推測することは適切ではない。子宮の浮腫所見は排卵約3日前に

最も明瞭になり排卵1～2日前に減少し、排卵時期の有力な指標とされている[3.11]。しかし、繁殖移行期の排卵を伴わない発情においても64%に子宮の浮腫像が認められ[34]、また、子宮内膜炎において高度な浮腫像が認められる[15]ことから、子宮の浮腫所見のみで排卵の時期を判定することも適切ではない。ブセレリン投与時期を $>45\text{mm}$ の卵胞を有し、子宮浮腫の減少時に設定したところ48時間以内の排卵率は100%、36時間以内が37.5%(3/8)、36～48時間が62.5%(5/8)と2群に分かれた。36時間以内に排卵が確認された群は、投与時すでに排卵に近似した内因性のホルモン動態であったと推測される。排卵が36～48時間に集中する傾向が認められたことは、ブセレリン投与によるLH、FSHの上昇が卵胞の成熟を早め、排卵を促進したと考えられる。 $>35\text{mm}$ の卵胞を有する馬へのhCG投与においても、排卵が36時間前後に集中する傾向があるとの同様な傾向が認められた[33]。馬は二排卵率が高く、特にサラブレッド種では37.2%に二排卵が認められ、早期妊娠診断(排卵後13～16日)において16.2%に双胎妊娠が認められている[25]。本試験では二排卵率が投与群で高い傾向にあったが、両群の受胎率は、それぞれ50%(4/8.7/14)で差はなく、危惧された双胎妊娠例は認められなかった。

頻回交配が常態化している重軌馬生産において、交配回数の低減は一つの課題である。試験期間中、両群とも畜主の判断により自然交配が行われ、交配回数に有意な差は認められなかった。しかし、対照群では一発情3回交配が3例あったが投与群は全て2回以内であった。頻回交配を避けることは交配誘導性子宮内膜炎のリスクを低下し、種雄馬の負担軽減による利活用の促進に有用であると考えられる。

ブセレリン単回投与による内分泌動態の変化は対照群と比較して、LH、FSHにみられた。対照群のLHは排卵3日前より漸増し、排卵1～2日後にピークに達し、報告されているウマLH分泌パターン[19.23]と近似していた。一方、投与群では投与6～24時間に一過性の上昇を示したのち低値で推移した。ブセレリン投与によりLH分泌が促進され、性腺刺激ホルモン分泌細胞が脱感作状態にある

か、LH分泌に負のフィードバックが働いていることが推測された。

馬の排卵前後におけるFSHは、対照群と同様に排卵前後に上昇を開始する内分泌動態が知られている[6]。しかし、投与群では投与1～2日後に一過性の上昇を示し、排卵後は低値で推移した。FSH分泌刺激によるLHの推移と同様の作用が推測された。

P_4 は排卵まで基底値で推移し、排卵後24～36時間に上昇し5～7日に最大に達するとされ[19.24]、両群ともに同様の推移を示した。投与群では排卵が全て48時間以内で4日の P_4 値は高かったことからブセレリン投与後の黄体形成に対する生理的影響はないものと推測される。

E_2 の推移は、減少傾向に転じて排卵に至り、報告[12.19]されている E_2 分泌パターンと近似していた。排卵前のhCG投与によって、 E_2 の減少と卵胞発育の停止との関連が指摘されている[9]。 E_2 は大型卵胞の顆粒層から分泌され、卵胞の発育と成熟に密接に関与している。子宮の浮腫所見が減少する時期は、 E_2 が減少に転じ排卵に向けた卵胞成熟の指標となりうる。

本研究では、ブセレリン投与群の48時間以内の排卵率が100%であり、重軌馬雌馬が $>45\text{mm}$ の主席卵胞を有し子宮の浮腫が減少した時、ブセレリン $40\mu\text{g}$ 単回投与の排卵効果への有用性が明らかになった。さらに、排卵誘起により、交配回数を減らすことは交配誘導性子宮内膜炎のリスクを低減し、重軌馬の効率的、衛生的な繁殖管理技術の一つとなりうることが示唆された。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導をいただいた三宅陽一先生(三宅繁殖サポート)、野外試験に多大なるご協力をいただいた帯広ファームの佐々木啓文場長、加来一氏、野外試験をサポートしていただいた十勝農業共済組合の獣医師の皆様に感謝申し上げます。

参考文献

- 1.Barrier-Battut,I., LePoutre,N., Trocherie,E., Hecht,S., Grandchamp des Raux,A.,

- Nicaise, J.L., Verin, X., Bertrand, J., Fieni, F., Hoier, R., Renault, A., Egron, L., Tainturier, D., Bruyas, J.F. 2001. Use of buserelin to induce ovulation in the cyclic mare. *Theriogenology* 55:1679-1695.
2. Camillo, F., Pacini, M., Panzani, D., Vannozi, I., Rota, A.I., Aria, G. 2004. Clinical use of twice daily injections of buserelin acetate to induce ovulation in the mare. *Vet. Res. Commun.* 28:169-172.
3. Cuervo-Arango, J., Newcombe, J.R. 2008. Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. *Theriogenology*. 69:681-687.
4. Derar, R.I., Maeda, Y., Tunoda, N., Hoque, M.D.S., Osawa, T., Miyake, Y. 2002. The Peripheral Levels of Luteinizing Hormone (LH), Follicle-Stimulating Hormone (FSH), Immunoreactive (ir-), Inhibin, Progesterone (P) and Estradiol-17 β (E_2) at the Time of Control of Ovulation With Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) Agonist (Deslorelin) in pony Mares. *J. Equine. Sci.* 13: 83-87.
5. Evans, M.J., Gastal, E.L., Silva, L.A., Gastal, M.O., Kitson, N.E., Alexander, S.L., Irvine, C.H.G. 2006. Plasma LH concentrations after administration of human chorionic gonadotropin to estrus mares. *Anim. Reprod. Sci.* 94:191-194.
6. Evans, M.J., Irvine, C.H.G. 1975. Serum concentration of FSH, LH, and progesterone during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 23:193-200.
7. Farquhar, V.J., McCue, P.M., Carnevale, E.M., Squires, E.L. 2001. Interovulatory intervals of embryo donor mares administered deslorelin acetate to induce ovulation. *Theriogenology*. 55:362.
8. Gastal, E.L., Silva, L.A., Gastal, M.O., Evans, M.J. 2006. Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 94:186-190.
9. Gastal, M.O., Gastal, E.L., Ginther, O.J. 2006. Effect of hCG on characteristics of the wall of the developing preovulatory follicle evaluated by B-mode and color-Doppler ultrasonography and interrelationships with systemic estradiol concentration in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 94:195-198.
10. Ginther, O.J., Wentworth, B.C. 1974. Effect of a Synthetic Gonadotropin-Releasing Hormone on Plasma Concentrations of Luteinizing Hormone in ponies. *Am. J. Vet. Res.* 35:79-81.
11. Ginther, O.J., Pierson, R.A. 1984. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. *Theriogenology*. 21:505-515.
12. Ginther, O.J., Utt, M.D., Bergfelt, D.R., Beg, M.A. 2006. Controlling interrelationships of progesterone/LH in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 95(1): 144-150.
13. Grimmer, J.B., Perkins, N.R. 2001. Human chorionic gonadotropin (hCG): the effect of dose on ovulation and pregnancy rate in Thoroughbred mares experiencing their first ovulation of the breeding season. *New Zealand Vet. J.* 49:88-93.
14. Harrison, L.A., Squires, E.L., McKinnon, A.O. 1991. Comparison of buserelin and luproston for induction of ovulation in cycling mares. *Equine. Vet. Sci.* 11:163-166.
15. Samper, J.C., Pycock, J.F., McKinnon, A.O. 2007. *Current Therapy in Equine Reproduction*. Co Saunders WB, Philadelphia.
16. Samper, J.C. 1997. Ultrasonographic Appearance and the pattern of Uterine Edema to Time Ovulation in mares. *Proc. Am. Ass. Equine. Practnrs.* 43:189-191.
17. Kaneko, M., Miyake, Y., Kaneda, Y., Watanabe, G., Taya, K. 1995. Induction of Estrus and Promotion of Fertility by Prostaglandin F₂ α Administration in Mares. *J. Equine. Sci.* 6:7-14.

18. McCue, P.M., Farquhar, V.J., Carnvale, E.M., Squires, E.L. 2002. Removal of deslorelin (OvuplantTM) implant 48 hours after administration results in normal interovulatory intervals in mares. *Theriogenology*. 58:865-870.
19. Meineke, B., Gips, H., Meinecke, T.S. 1987. Progestagen, androgen and oestrogen levels in plasma and ovarian follicular fluid during the oestrus cycle of the mare. *Anim. Reprod. Sci.* 12:255-265.
20. Meyers, P.J., Bowman, T., Blodgett, G., Conboy, H.S., Gimenez, T., Reid, M.P., Taylor, B.C., Thayer, J., Jochle, W., Trigg, T.E. 1997. Use of the GnRH analogue, deslorelin acetate, in a slow-release implant to accelerate ovulation in oestrus mares. *Vet. Rec.* 140:249-252.
21. Michel, T.H., Rossdale, P.D., Cash, R.S. 1986. Efficacy of human chorionic gonadotrophin and gonadotrophin releasing hormone for hastening ovulation in thoroughbred mares. *Equine. Vet. J.* 18:438-442.
22. Miyakoshi, D., Ikeda, H., Maeda, M., Shibata, R., Sikitani, M., Ito, K., Sonoda, K., Nanbo, Y. 2014. Efficacy of Human Chorionic Gonadotropin for Inducing Ovulation in Thoroughbred Mares Relative to Follicle Diameter and Uterine Edema Pattern. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 67:183-187.
23. Nagamine, N., Nambo, Y., Nagata, S., Nagaoka, K., Tsunoda, N., Taniyama, H., Tanaka, Y., Tohei, A., Watanabe, G., Taya, K. 1998. Inhibin secretion in the mare: Localization of inhibin alpha, betaA, and betaB subunits in the ovary. *Biol. Reprod.* 59:1392-1398.
24. Nett TM, Pickett BW, Squires EL. 1979. Effect of equimate (ICI-81008) on levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and progesterone during the estrous cycle of the mare. *J Anim Sci.* 48:69-75.
25. Newcombe, J.R. 1995. Incidence of multiple ovulation and multiple pregnancy in mares. *Vet Rec.* 137:121-123.
26. Oxender, W.D., Noden, P.A., Pratt, M.C. 1997. Serum Luteinizing Hormone, Estrus, and Ovulation in Mares Following Treatment with prostaglandin F_{2α} and Gonadotropin-Releasing Hormone. *Am. J. Vet. Res.* 38:649-653.
27. Perkins, N.R., Grimmett, J.G. 2001. Pregnancy and twinning rates in Thoroughbred mares following the administration of human chorionic gonadotropin (hCG). *New Zealand. Vet. J.* 49:94-100.
28. Pierson, R.A., Ginther, O.J. 1985. Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare. *Theriogenology*. 24:359-368.
29. Pope, A.M., Campbell, D.L., Davidson, J.P. 1979. Endometrial histology and post-partum mares treated with progesterone and synthetic GnRH (AY-24,031). *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 27:587-591.
30. Roser, J.F., Kiefer, B.L., Evans, J.W., Neeply, D.P., Pacheco, D.A. 1979. The development to human chorionic gonadotropin following its repeated injection in the cyclic mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 27:173-179.
31. Sullivan, J.J., Parker, W.G., Larson, L.L. 1973. Duration of Estrus and Ovulation Time in Nonlactating Mares Given Human Chorionic Gonadotropin During Three Successive Estrous Periods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 162:895-898.
32. Tunoda, N., Akita, H., Tagami, M., Ogata, S., Oosaki, K., Ikeda, M., Hara, K., Satou, K., Kwaguchi, M., Iwama, K. 1989. Effect of Synthetic Gonadotropin Releasing Hormone on Ovulation and Fertility in Mares. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 42:477-479.
33. Voss, J.L., Sullivan, J.J., Pickett, B.W., Parker, W.G., Burwash, L.D., Larson, L.L. 1975. The effect of HCG on duration of oestrus, ovulation time and fertility in mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 23:297-301.
34. Watson, E.D., Thomassen, R., Nikolakopoulos, E. 2003. Association of uterine edema with

follicle waves around the onset of the breeding season in pony mares. *Theriogenology*. 59:1181-1187.