Early Pregnancy Diagnosis by the Ultrasonographical Device and Observation of Fetal Growth in Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*)

Fumiaki CHO, Hayato NARITA*, Takahiro ONO*
and Shigeo HONJO

*Tsukuba Primate Center for Medical Science, The National Institute
of Health, and *The Corporation for Production and Research
of Laboratory Primates, Hachimandai, Yatabe-machi,
Tsukuba-gun, Ibaragi-ken, 305, Japan.*

(Received 10 June 1986/Accepted 1 October 1986)

Usefulness of the ultrasonographical device (USD) for early diagnosis of pregnancy and for observation of fetal growth was examined in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). Firstly, 50 females, each of which was mated for 24 hours in an individual cage, were used. They were diagnosed for pregnancy by the use of USD 15 to 29 days and 35 days after mating. Then, 20 of them were judged to be pregnant. The early pregnancy diagnosis was based on the detection of gestational sac (GS) in the uterus. The GS was detected 20.0 ± 1.8 days after mating. The duration from the day on which GS was first detected to the day on which the heart beat of embryo (HBE) was detected averaged 5.6 ± 1.5 days. In 17 of these 20 pregnancies, GS was detected 17 to 23 days after mating. As regards the remaining three pregnant cases, GS and HBE were simultaneously detected on the 28th day of pregnancy in two cases, and on the 35th day in one case. Secondly, 225 females who were mated by the routine 3 day-mating system were used. Pregnancy diagnosis by USD was conducted on the 21st, 28th and 35th day after mating. Ninety-six of the 225 females were judged to be pregnant. In 33 (34.1%) of the 96 pregnant cases, GS was detected on the 21st day of pregnancy. In 57 females (59.4%), GS was detected on the 28th day of pregnancy, and in the remaining 6 (6.2%) cases GS was detected on the 35th day. Furthermore, it was able to judge conditions of fetal growth by measuring the size of GS and biparietal diameter. In conclusion, USD is a useful means for the early diagnosis of pregnancy and the observation of conditions of fetal growth in the cynomolgus monkey.

超音波診断装置によるカニクイザルの 早期妊娠診断と胎仔の発育観察

長 文 昭・成田 勇人*・小野 孝浩*・本庄 重男

国立予研筑波医学実験用霊長類センター

*社団法人予防衛生協会

医療機器としての超音波診断装置 (Ultrasono-
graphical Device, USD) は、近年長足の進歩・改良

を遂げてきた。今日、周知のようにヒト用の装置は診療
科別の型特性をもっている。また、ヒト以外の動物用で

は動物の大きさ別にウシ、ウマから実験動物のウサギ、ラットに至る広い範囲に対応して多様な機種が開発されている。これら USD をサル類に適用した報告としては、既にアカゲザル (*Macaca mulatta*) の胎仔成長を主題とした報告 [5, 6, 7] がある。私どもは USD が持つ即時性、無侵襲性等の特長に着目して、ここ 3・4 年来同装置を実験用サル類の大規模繁殖の場で利用してきた。私どものカニクイザル (*Macaca fascicularis*) 繁殖技術への USD の利用は、他の技術的調査研究や改善 [1, 2] と相まって現場での作業に大きな革新をもたらしている。本報はそれらのうちの早期妊娠診断と胎仔の発育観察とに関するものである。

材料および方法

I. 動物と交配方式：被検雌カニクイザルは、筑波医学実験用霊長類センター [4] の繁殖コロニーにおいて種ザルとして使用している動物である。交配は、正常な長さの月経周期を連続 2 回観察した後、3 回目の月経出血の初日から数えて第 11 日に、雌ザルを雄ザルケージに入れ、一定期間同居させることによった。妊娠日齢は同居初日を零日として算出した。USD 導入の当初には、まず、雌 50 頭をもちい、受胎期判定の誤差が極力少なくなるよう同居時間を 24 時間にして交配した。次いで、日常

的交配方式にしたがい 3 日間交配された雌 225 頭（うち後刻妊娠と判定されたもの 96 頭）を用いた。

II. 飼育条件：飼育室の照明は 14 時間の蛍光灯点灯と、10 時間の消灯の繰返しである。空調条件としては、100% の新鮮空気を 1 時間に 10 回換気し、 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の温度と $60 \pm 10\%$ の湿度を保持した。飼料は、午前にリンゴ、ミカン各 100 g を給与し、午後に 2 回に分けて計 70 g の固型飼料（オリエンタル酵母製 A S 型）をあたえた。飲水は自動給水装置により自由に摂水させた。交配時以外、雌ザルは 45cm W×60cm D×60cm H のステンレススチール製金網ケージに収容された。

III. USD による妊娠判定法、①装置：USD は Aloka 株式会社製、SSD-256（電子リニア型）である。用いた探触子の周波数は 5 MHz である。②判定：診断はケタラール 50（三共パークデイビス製）による麻酔下で実施した。子宮内に胎のう（Gestational Sac, GS）が検出された場合に「妊娠」と診断した。その後、GS 内に胎芽を、さらに胎芽の中または辺縁に胎芽心拍を検出することにより妊娠を再確認した。③診断スケジュール：24 時間交配後の 50 頭については、同居初日を零日とした第 15 日より第 29 日までの毎日と第 35 日に診断を試みた。日常的な繁殖の作業である 3 日交配後の被検雌ザル 225 頭については、第 21、28 と 35 日に診断をおこなった。

IV. GS および胎仔の大きさの測定：「妊娠」と診断

[Abbrev.] G: Detected gestational sac. H: Detected heart beat.

Fig. 1. The first day on which gestational sac and the heart beat of embryo were detected in the uterus by the USD after 24-hour-mating.

された個体では、その GS の大きさを長径と短径について 1 ～ 3 回 (第 21, 28 および 35 日) 計測した。さらに、妊娠個体については、妊娠 8, 12, 16, 20 および 22 週齢時に胎仔の頭部大横径 (Biparietal Diameter, BPD) を測定した。

成 績

24時間交配で 50 例中 20 例が妊娠した。妊娠した 17 例

Table 1. Detection of the gestational sac and the heart beat of embryo by USD on different days after mating in 96 females who became pregnant after 3-day-mating.

Number of days after mating		21	28	35
Gestational sac	+	33	90(57)	96(6)
	—	63	6	0
Heart beat of embryo	+	0	70	96
	—	33	20	0

Number in parenthesis indicates number of pregnant females whose GS was first detected.

Fig. 2. An image of gestational sac detected on the 24th day of pregnancy.

は、胎齢第 17 日から第 23 日の間に妊娠と診断し得た (Fig. 1)。GS が見出された胎齢の平均は 20.0 日であった。胎芽心拍は、これより平均 5.6 日後れて確認された。なお残り 3 例のうち 2 例では第 28 日に、他の 1 例では第 35 日に、GS、胎芽および胎芽心拍が同時に確認された。

3 日間交配による妊娠数は 96 頭であった (Table 1)。これら 96 頭のうち、胎齢第 21 日における診断では 33 頭、すなわち 34.4% を検出し得た。次いで第 28 日の診断で新

Table 2. The size of the gestational sac.

	Number of days after mating		
	21	28	35
Mj	8.2±3.1*(33)**	12.1±3.7(90)	19.6±4.7(96)
Mi	4.3±1.6 (29)	7.3±2.2(80)	11.5±3.2(89)

*: Mean±S.D.

**: The values in parentheses are the number of animals.

Mj: Major axial length

Mi: Minor axial length

Fig. 3. An image of fetal head in 16th week of gestation. An echo line (arrow) indicating fissura longitudinalis cerebri can be seen.

Table 3. The fetal biparietal diameter with respect to gestational age.

Number of animals used	Gestational age				
	8 weeks	12 weeks	16 weeks	20 weeks	22 weeks
96	13.4±1.7*	26.2±1.8	36.3±1.7	41.9±2.1	42.8±2.4

*: Mean±S.D.

たに妊娠と判定されたものは 59.4% (57/96) 同じく 第 35 日の診断では 6.2% (6/96) であった。

胎のうの大きさの測定値は, Table 2 に示したとおりである。交配後第21日に検出された GS の長径は, 平均 8.2 ± 3.1 mm, 短径は平均 4.3 ± 1.6 mm で, 柿の種のような形であった (Fig. 2)。第28日のそれは, 12.1 ± 3.7 mm $\times$ 7.3 ± 2.2 mm, 第35日では 19.6 ± 4.7 mm $\times$ 11.5 ± 3.2 mm と増大した。

妊娠8週齢における胎仔の BPD は平均 13.4 ± 1.7 mm, 妊娠12週齢の BPD は平均 26.2 ± 1.8 mm, 妊娠16週齢の BPD は平均 36.3 ± 1.7 mm, 妊娠20週齢の BPD は 41.9 ± 2.1 mm, そして妊娠22週齢の BPD は平均 42.8 ± 2.4 mm であった (Table 3, Fig. 3)。

考 察

当センターにおけるカニクイザルの早期妊娠診断は通常, 交配後5週目で子宮の膨らみを触知する, いわゆる子宮触診法により実施してきた。この方法は多少の熟練を要するとはいえ, 極めて簡便, 確実である。しかし, どんなに早くとも4~5週後でないと判定できない。また, 血中胎盤絨毛性ゴナドトロピン (CG/LH) を検出し, 妊否を診断することも可能である。この場合妊否の判定には少なくとも, 数時間を要するが, 交配後3週(21日)で全妊娠例の86%を検出できる [8]。

一方ここに報告したように, 本装置により, ほとんどの妊娠例が胎齢17~23日の間に妊娠と判定されたことから, カニクイザルの早期妊娠診断のための USD の有用性は非常に高いものと言える。なお, 最も早期, つまり第17日と第19日に GS を見出し得た例, および第35日に GS と胎芽心拍とを初めて同時に見出し得た例の計3例は, それぞれ第50, 45, 53日に流産した。これらの流産は月経様出血を観察した日に実施した USD による観察で GS の存在は明瞭であるにもかかわらず, 胚および胎芽心拍は共に存在しないことが観察されたため流産と判定されたものである。残る17例は正常仔を分娩した。

ところで, 今回 GS および胎芽心拍を初めて検出し得

た胎齢に関しては可成り大きな個体差 (GS: 第17~23日, 胎芽心拍: 第23~38日) が認められた。このような個体差は, 今後 USD の解像力がさらに増強され, かつまた術者が一層観察に習熟するならば, 次第に小さくなるものと予想される。

交配後20日のアカゲザル (*Macaca mulatta*) の GS の大きさは 6 ± 5 mm, 25日では 13 ± 5 mm, 30日では 19 ± 5 mm そして, 35日では 26 ± 5 mm であると報告 [5] されている。第35日において, すでにカニクイザルとの差が平均値で7mm もあることは注目に値する。このアカゲザルの報告は胎芽心拍の観察には触れていない。また, Nyland らが用いた装置の探触子はセクタ型であったので胎仔の BPD をはじめとする胎仔の身体各部が計測されている。一方, 私どもの使用した装置はリニア型

Fig. 4. An image of 8-week-old fetal crown-rump length (the arrow).

Fig. 5. Increase of the biparietal diameter with increasing gestation age.

であったために、最大限8週齢までしか胎仔の頭臀長を計測し得ず (Fig. 4)、それ以上の胎齢の胎仔の全身を一画面に映し出すことはできなかった。しかし、頭部全体を映し出すことは可能であったので胎仔発育の指標として、胎仔のBPDを観察・計測することができた。Fig. 5に示した値は、当センターのカニクイザル繁殖コロニーの現場作業において既に活用されている。すなわち、8, 12, 16, 20と22週齢胎仔でBPDを計測し、その測定値をFig. 5の値と照合、比較し胎仔が正常に発育しているか否かを確認している。

GSやBPDの胎齢に伴う増大に性差があるか否かはひとつの問題である。ところが私どもは未だ画面上で性を判別することに成功していないので出生時に判明した雌雄別にもとづいてTables 2, 3のデータを整理し、性差の有無につき検討した。その結果は、妊娠のいずれの時期においても雌雄間で有意差を検出し得なかった ($p=0.05$)。なお、参考資料としてTable 4に、BPDの計測対象とした胎仔の雌雄別在胎期間 (=妊娠期間) と出生時体重を示した。これらの値は、いずれも既に私どものカニクイザル繁殖コロニーで標準値としているもの [3] とほとんどおなじである。また雌より雄の出生時体重が大きい。今後USDによる胎仔の身体各部の観察

・計測を進め、雌雄の体重差をもたらしているものが、身体のどの部分であるかを検討して行きたい。なお操作技術上の問題であるがGSを観察する時、探触子と腹壁面とのなす角度、探触子が腹壁を圧定する強さ、探触子を動かす方向や速さ等を少しずつ変えて走査を繰返し、画像の判断に誤りのないよう充分注意を払う必要がある。すなわち、角度を変えて像を確認し、圧定の強さを

Table 4. Gestation period and birth weight of the newborns who were measured for their biparietal diameters (presented in Table 3).

Sex	Number of animals used	Gestational** period (day)	Birth weight*** (g)
Male	45	164.7 $\pm$ 5.5*	368.0 $\pm$ 71.8
Female	51	165.0 $\pm$ 4.7	345.0 $\pm$ 61.8
Combined	96	165.0 $\pm$ 5.1	355.8 $\pm$ 67.6

*: Mean $\pm$ S.D.

** & ***: Differences in the average values between male and female newborn were statistically examined at 5% level.

**: No significant difference was detected.

***: Statistically significant difference was detected ($p=0.037$).

極く僅かに変えてもGSに極端な変形の無いことを確かめねばならない。

さらにまた、私どもが今回使用した装置の探触子の振動数は5MHzであったが、今日では7.5, 10MHzの探触子も開発され、一部ではそれらが実用化されている。最近私どもは7.5MHzの探触子(メカニカル・セクタ型)を試用する機会があったが、ここに報告した成績よりも若干早く妊娠診断が可能であるとの結果を得ている。

要 約

超音波診断装置(USD)を用いて、実験用カニクイザルの妊娠診断と、妊娠個体における胎仔の発育観察を行った。妊娠の判定は同装置により映し出された子宮内に胎のう(GS)を検出し得るか否かによった。まず当センター繁殖コロニーの雌ザル50頭を、その交配適期に24時間交配した。それらは交配日を零日と算えて第15~29日までの間および第35日に診断し、うち20頭がこの間に妊娠と判明した。これら20頭中17頭では第17~23日の間にGSを検出することができた。GS検出時の平均胎齢は20.0日であった。GS検出後平均5.6日でGS内に胎芽心拍が認められた。残りの3頭中2頭では第28日に、他の1頭では第35日にいずれも、GSと胎芽心拍が同時に検出された。次に、日常的な繁殖方式である3日間交配後の225頭を対象とし、第21, 28と35日の3回同装置により妊娠診断を試み、96頭で妊娠が確認された。96頭中33頭(34.1%)では第21日に、57頭(59.4%)では第28日に、そして残り6頭(6.2%)では第35日にそれぞれGSが検出された。次に本装置でGSの大きさ、および胎仔の頭部大横径(BPD)を測定することにより胎仔の発育の程度を判断することが、また、心拍動の有無を観察することにより胎仔の生死を判定することが可能

であった。以上の結果から、USDはカニクイザルの早期妊娠診断および胎仔発育観察にとって極めて有用であると判断される。

文 献

- [1] Cho, F., Hanari, K., Suzuki, M.T., and Honjo, S. (1985). Relationship between fetal position and stillbirth in the cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): Retrospective analysis. *J. Med. Primatol.*, **14**, 169-174.
- [2] Cho, F., Suzuki, M., and Honjo, S. (1986). Adoption success under single-cage conditions by cynomolgus macaque mothers (*Macaca fascicularis*). *Am. J. Primatol.* **10**, 119-124.
- [3] Honjo, S., Cho, F., and Terao, K. (1984). Establishing the cynomolgus monkey as a laboratory animal. In "Research on Nonhuman Primates" (ed. by A.G. Hendrickx) *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine.*, **28**, 51-80. Acad. Press, N.Y.
- [4] Honjo, S. (1985). The Tsukuba Primate Center for Medical (TPC): An outline. *J. Med. Primatol.*, **14**, 75-89.
- [5] Nyland, T. G., Hill, D. E., Hendrickx, A. G., Farver, T. B., McGahan, J. P., Henrickson, R., Anderson, J., and Phillips, H.E. (1985). Ultrasonic assessment of fetal growth in the nonhuman primate (*Macaca mulatta*). *J. Clin. Ultrasound.*, **12**, 387-395.
- [6] Peterson, E. N., Hutchinson, D. L., Sabbagha, R.E., Royal, J.S., and Levitt, M.J. (1972). Sonography and amniocentesis as predictors of gestational age and fetal growth in the rhesus monkey. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **114**, 883-889.
- [7] Sabbagha, R.E., Turner, J. H., and Chez, R. H. (1975). Sonar biparietal diameter growth standards in the rhesus monkey. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **121**, 371-374.
- [8] Yoshida, T., Suzuki, K., Cho, F. and Honjo, S. (1987). Serum chorionic gonadotropin levels determined by radioreceptor assay and early diagnosis of pregnancy in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Am. J. Primatol.*, **12**, 101-106.