妊娠診断に於ける日本産蛙の使用に関する研究

III. 雄トノサマ蛙に依る馬の妊娠診断について

佐藤 幸雄 村 松 隆

(宇都宮大學農學部畜産學科)

昭和 26 年 12 月 25 日受付

I. 緒 言

TABARELLI⁽¹⁾ は馬の妊娠診断にヒキガヘルを用いた 余等は前報⁽²⁾に引續き蛙に依る馬の妊娠診断を行ひ新知見を得たのでその概要を報告する

II. 材料並に實驗方法

1. 妊馬血清

1949~1951 年に 19 頭から 50 回, 又對照として不妊馬 3 頭から 8 回採血した

2. 血清から妊馬血清質 (以下 PMS と略す) の抽出方法

CARTLAND-NELSON⁽³⁾ 法に準じ, 被檢馬血清の pH 6.0, Acetone 45~70% に於ける分劃沈澱を作り, 之を水に溶して用いた 原法は分劃實施の 3 段階を各 16 時間氷室に放置せるも各段階を 30 分流水中に放置し抽出操作の所要時間を約 3 時間に短縮したが同程度の成績を得た

3. 注射方法

前報⁽⁴⁾の如く注射量 1cc 以下の場合には背淋巴腔を適當と認め注射法は之に依つたが 2~4cc の場合は豫備試驗に於て背淋巴腔, 腹淋巴腔, 腹腔内の 3 部位に等量分割注射したものが稍良好である事を認めたので之の方法に依つた

III. 實驗成績及び論議

1. 妊馬血清そのまゝの注射に依る蛙試験

イ. 5 頭の妊馬の血清は蛙試験陰性であつた

即ち妊娠 49~84 日迄の PMS 含量最高時に 9 回に亘り採血し蛙 99 匹を用いて, 血清 0.2~4.0cc を注射後 6~10 時間迄及び翌朝検査 (17~20 時間後) し, すべて陰性であつた

ロ. 5 頭の妊馬の血清は蛙試験陽性を示した

即ち妊娠 49~96 日の間に 11 回に亘り, 血清 0.2~4.0cc を注射せる供試蛙 410 匹中 99 匹は注射後 10 時間或は 14~20 時間迄の觀察に依つて陽性反應を呈した

之等 5 頭の中 3 頭に於ては, 蛙の感度の高い 5, 6 月に妊娠 54 日 1 回, 61 日 2 回と夫々 0.5cc 注射で $\frac{6}{10} \sim \frac{7}{10}$ の陽性を呈したが同條件で陽性反應出現の弱い馬もあつた

[日本獸醫學會雜誌, 第 15 卷, 第 2 號昭和 28 年]

2. 尿 Prolan (以下 PU と略す) の血清溶液及び其の抽出物に依る成績

1. に依り妊馬血清注射に於ては陽性反應出現の不良な事を知り、之の原因を明かにせんが爲以下の實驗を行つた

Table 1. Results Obtained with PU, Dissolved in 0.5~4cc of the Non-pregnant Mare's Serum, and Its Extracts after CARTLAND-NELSON.

Season Volume of Injection PU	Spring						Summer							
	cc 0.5		1.0		2.0		0.5		1.0		2.0		4.0	
	Serum	Ext.	Serum	Ext.	Serum	Ext.	Serum	Ext.	Serum	Ext.	Serum	Ext.	Serum	Ext.
5 M.U.	$\frac{0}{4}$		$\frac{0}{5}$	$\frac{10}{22}$ (45%)					$\frac{0}{10}$	$\frac{2}{10}$				
7.5	$\frac{6}{10}$	$\frac{6}{10}$	$\frac{2}{10}$	$\frac{8}{10}$					$\frac{0}{10}$					
10	$\frac{6}{10}$		$\frac{2}{10}$	$\frac{8}{10}$			$\frac{1}{10}$		$\frac{0}{10}$	$\frac{6}{10}$	$\frac{0}{10}$	$\frac{7}{10}$		
12.5	$\frac{7}{10}$		$\frac{6}{10}$	$\frac{10}{10}$			$\frac{4}{20}$		$\frac{3}{20}$	$\frac{12}{20}$	$\frac{0}{10}$	$\frac{12}{20}$		
15											$\frac{0}{10}$	$\frac{3}{5}$		
17	$\frac{7}{10}$		$\frac{8}{10}$	$\frac{10}{10}$							$\frac{3}{10}$	$\frac{10}{10}$		
20			$\frac{9}{10}$						$\frac{8}{26}$ (31%)				$\frac{0}{5}$	$\frac{6}{10}$
25			$\frac{9}{10}$				$\frac{25}{30}$ (83%)				$\frac{2}{20}$	$\frac{29}{30}$ (97%)	$\frac{0}{10}$	$\frac{6}{8}$
30													$\frac{1}{5}$	
40			$\frac{10}{10}$		$\frac{9}{10}$				$\frac{10}{15}$ (66%)					
50							$\frac{20}{20}$		$\frac{37}{50}$ (64%)		$\frac{14}{20}$	$\frac{6}{6}$	$\frac{3}{10}$	

N. B. The threshold results (positive results over 60%) were underlined.

PU (1 M.U.=10~12γ) 5~50 M.U. を 0.5~4.4cc の不妊馬血清に溶解したもの及び同様血清から上記方法に依り抽出せるものを 0.5~2.0 cc の水に溶解したものをを用いて行つた蛙試験の結果は Table 1 の如くである

Table 2-1. Compared Results Obtained by the Serum
and Its Extract (in Spring).

Volume of Serum ¹⁾	Injected Material Frequency of Positive Tests	Serum		Extract	
		Total ²⁾	Threshold ³⁾	Total ²⁾	Threshold ³⁾
0.5 cc		$\frac{5}{5}$	$\frac{2}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{2}{5}$
1.0		$\frac{4^4)}{4}$	$\frac{3}{4}$	$\frac{4}{4}$	$\frac{4}{4}$
2.0		$\frac{1^5)}{1}$	$\frac{0}{1}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$

- N.B. 1) In the column of "extract", from these volumes of serum, PMS was extracted, and dissolved in 0.5~2.0cc of water, and injected to each frogs.
- 2) Numerator=Number of frog tests in which positive reactions were observed.
- 3) Numerator=Number of frog tests in which positive reactions in over 60% of the 5~10 injected frogs were observed.
Denominator in 2) and 3)=Number of frog tests performed.
- 4) In one test, one of the 10 frogs ejaculated 8 hours after the injection, and others negative.
- 5) In this case, 2 of the 5 frogs ejaculated 9 hours after the injection, and others negative, while, in all above mentioned cases, the extracts provided a positive reaction within 3 hours in over 60% of the injected frogs.

Table 2-2. The Same as Above (in Summer).

Volume of Serum ¹⁾	Injected Material Frequency of Positive Tests	Serum		Extract	
		Total ²⁾	Threshold ³⁾	Total ²⁾	Threshold ³⁾
1.0 cc		$\frac{0}{2}$	$\frac{0}{2}$	$\frac{2}{2}$	$\frac{0}{2}$
2.0		$\frac{1}{3}$	$\frac{0}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{2}{3}$
4.0		$\frac{0}{2}$	$\frac{0}{2}$	$\frac{2}{2}$	$\frac{2}{2}$

N.B. 1), 2), 3). The same as above.

余等⁽⁵⁾は曩に PU 水溶液に於て蛙の感度は夏が最低であることを述べたが、此の試験に於ても同じ傾向が見られた。ここに注目すべき事は、その閾値は血清量の増加と共に著明に増加し又血清溶液では陰性の PU 用量に於ても、抽出物に依つて容易に陽性

Table 3-1. Results Obtained with the Extracts of Pregnant Mares' Serum (in Spring).

Day of Pregnancy		41~44		50~81	
Volume of Serum ¹⁾	Frequency of Positive Tests	Total ²⁾	Threshold ³⁾	Total ²⁾	Threshold ³⁾
0.5 cc		$\frac{1}{1}$	$\frac{0}{1}$	$\frac{6}{6}$	$\frac{2}{6}$
1.0		$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{7}{7}$	$\frac{7}{7}$
2.0		$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{2}{2}$	$\frac{2}{2}$
10.0		$\frac{2}{2}$	$\frac{1}{2}$		
20.0		$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$		

N. B. 1), 2), 3). The same as in Table 2-1.

Table 3-2. The Same as Above (in Summer).

Day of Pregnancy		51~90		91~109	
Volume of Serum ¹⁾	Frequency of Positive Tests	Total ²⁾	Threshold ³⁾	Total ²⁾	Threshold ³⁾
1.0 cc		$\frac{5}{6}$	$\frac{0}{6}$		
2.0		$\frac{9}{9}$	$\frac{5}{9}$		
4.0		$\frac{11}{11}$	$\frac{9}{11}$	$\frac{3}{5}$	$\frac{1}{5}$
8.0		$\frac{4}{4}$	$\frac{4}{4}$	$\frac{5}{7}$	$\frac{3}{7}$

N. B. 1), 2), 3). The same as in Table 2-1.

結果が得られたことである

尙、陽性反應出現に要した時間は PU 血清溶液に於ては注射後 1~5 時間後に 70% の蛙が射精したが、30% は 6~8 時間或はそれ以後に達したに反し、抽出物に依るものは、大部分の蛙が注射後 5 時間迄に射精した

以上のことより血清は吸収が遅く、その爲抽出物に比して成績が悪いものと思はれる

3. 妊馬血清抽出物に依る妊娠診断

1. に於て妊馬血清注射では陽性の出現しない例を観察し、2. に於て同一の用量にても抽出法を実施すれば反応出現率が高くなると共に所要時間も短縮される事を知り得た。今妊馬血清と其の抽出物に就て並行試験を行つた成績を表示すれば Table 2-1, 2-2 の如くである

即ち血清量 0.5cc の春に於ける成績は抽出物と同程度の成績を示し、Table 1 に於ける 0.5cc の成績と共に、此の程度の少量の場合は血清に依る反応抑制が著明でないことが知られた。然るに血清量の増量と共に兩者の成績の差は著しい事を示す。又 2. に述べたと同様、妊馬血清に於て陰性結果の用量でも抽出物に依つて容易に陽性結果が得られる事を知つた。妊馬血清抽出物に依る蛙試験を行つた 10 頭の供試馬はすべて陽性反応を呈した

之等の中、早期種付の馬 5 頭に就て蛙の感度の良好な 5, 6 月に妊娠 41~81 日の間に行つた成績に就て血清量と陽性試験例の頻度の関係を表示すれば Table 3-1 の如くである

即ち妊娠 41~44 日に於ては血清量 2cc でも陰性のものあり後述の夏に於ける成績を併せ考ふれば此の頃には PMS 濃度の稀薄な事が知られる。妊娠 50~81 日に於ては血清量 0.5cc に於て 6 回の試験はすべて陽性を示すも、其等の中には供試蛙 10 匹中 1~2 匹が射精せるものがあつた

然るに 5 月中頃の蛙の繁殖の最盛期に排泄口の観察陰性の無處置の蛙 10 匹を 1 時間おきに検査せるに、2 時間後に自發的に射精するもの 1 匹（毎視野精子を發見）、6 時間後に全視野に 1 箇の精子を観た蛙 1 匹があつた。即ち繁殖最盛期には $\frac{2}{10}$ 程度の陽性は自發的射精と區別し難い事が有り得る

此の事を考慮すれば妊娠 50~81 日に於ては注射蛙の 60% 以上に陽性を呈する 1cc 注射に依つて診断可能と思はれる

早期に種付せる馬も妊娠日の増加と共に蛙の感度の低下する夏に至る。之等の成績及び種付の遅い馬 5 頭に就て夏に行つた成績を同様表示すれば Table 3-2 の如くである

妊娠 44~48 日に於ては血清量 4cc で供試蛙 5 匹中 1 匹、12cc で 5 匹中 3 匹に陽性を観察せる例あるも血清量 10cc, 16cc に於ても陰性のものがあつた。妊娠 51~90 日に於ては 2cc で 9 回すべて陽性を示し、夏に於ては自發的射精は稀であるから此の量を以て診断可能と思はれる。妊娠 91~109 日に於ては血清量 8cc に於ても陰性のものがあつた。114~124 日に行つた 2 例では血清量 18cc で陰性、36cc で陽性を示した。反応出現時間は注射後 1 時間迄 35%, 2 時間迄 46%, 3 時間迄 10%, 4 時間迄 5%, 5 時間迄 3%, 6 時間迄 0.4% と大部分の蛙は 3 時間迄に陽性を呈した

尙、不妊馬 3 頭より 8 回採血し血清 2~60cc の抽出物を供試せるもすべて陰性であつた

IV. 總 括

1. 血清そのままの注射によつて 10 頭の妊馬に就て行つた蛙試験は陰性例と陽性例が相半し、特に蛙の感度の悪い夏には反應出現の困難な事を知つた

2. 比較のため、不妊馬血清に PU を溶解せるものを用いて蛙試験を行ひ次の結果を得た (Table 1)

イ. 閾値は夏に於ては春の約 3 倍を示し、同一の PU 用量に於て、之を溶解する血清の増量は閾値を増加せしめる

ロ. CARTLAND-NELSON 法に準じて (所要時間を 3 時間に短縮) 抽出を行へば閾値の減少及び反應出現時間の短縮が見られた

3. 妊馬血清そのままの注射にては陰性の用量にても其の抽出物を注射すれば容易に陽性結果が得られた (Table 2-1, 2-2)

4. 10 頭の妊馬血清の抽出物を用いた蛙試験は、すべて陽性を呈し、5, 6 月に妊娠 50~81 日に達せる馬に於ては血清 1cc の抽出物にて、夏期に妊娠 51~90 日に達せる馬に於ては同様 2cc の抽出物にて何れも注射後 6 時間以内に診断可能な事が推定された

5. 馬の妊娠診断に、トノサマ蛙を使用するには、安全のため 4. の血清量の 2 倍を使用する事とし、次の方法が適當と思はれる

イ. 妊馬血清 (5, 6 月に於ては 10cc, 7, 8 月には 20cc) から上記に依る抽出物を作る

ロ. 抽出物を 5~10cc の水に溶して 5 匹の蛙に分割注射後 6 時間迄精子検査を行ふ陽性の場合には大部分の蛙が 3 時間迄に反應を呈する

ハ. 上記血清量に依る診断は妊娠 50~90 日のものに就て行ひ得る

稿を終るに際し恩師島村名譽教授に敬意を表し、終始御指導御鞭撻を賜つた星冬四郎教授に謹謝すると共に、血清採取に便宜を供與された各位に謝意を表す

尙、本研究は文部省科學研究費に依り行つたものである

文 献

- (1) TABARELLI NETO, J. F.: *Amer. J. Vet. Res.*, 10, 74 (1949)
- (2) 佐藤, 村松: 本誌, 12, 87 (1949)
- (3) CARTLAND, G. F. & J. W. NELSON: *J. Biol. Chem.*, 119, 59 (1937)
- (4) 佐藤, 村松: 本誌, 15, 65 (1953)
- (5) " : 宇都宮大學農學部學術報告 1, (1), 119 (1950)

THE USE OF JAPANESE FROGS IN THE DIAGNOSIS
OF PREGNANCY. III. STUDIES ON THE DIA-
GNOSIS OF PREGNANCY OF MARES USING
THE MALE *RANA NIGROMACULATA*
HALLOWELL.

Yukio SATO and Takashi MURAMATSU

(From the Division of Zootechnical Science, Utsunomiya University)

(Received for Publication Dec. 25, 1951)

TABARELLI NETO reported on the reaction of the male toad to pregnant mare's serum.

We studied on the use of the Japanese frog *Rana nigromaculata* HALLOWELL (weighing 6~33 g, most of them about 15 g) in the diagnosis of pregnancy of the mares.

Small volumes (< 1 cc) of the serums were injected into the dorsal lymphsac, and larger volumes (2~4 cc) into three parts simultaneously (dorsal and abdominal lymphsac, intraperitoneal), through the skin and muscules of the upper thigh of the hindlegs, thus leaking of the injected fluid could be avoided.

Summary of the results of the present study is as follows :

1. In the frog-tests with the serums obtained from 10 pregnant mares, the positive and negative results are given as follows :

a) Nine frog-tests with 0.2~4 cc serums from 5 pregnant mares, 49~84 days of pregnancy, gave negative reactions in the cloacal examinations 1~10 hours after the injection, and nextmorning.

b) Eleven frog-tests with 0.2~4 cc serums from 5 pregnant mares, 49~96 days of pregnancy, gave positive reactions, 1~10 or more hours after the injection.

2. For the purpose of comparison, 5~50 M. U. of PU (1 M. U.=10~12 γ) were dissolved in 0.5~4 cc of the non-pregnant mare's serum, and the

[Japanese Journal of Veterinary Science, Vol. XV, No. 2, 1953]

frog-tests were performed.

a) The threshold dosis of PU was about 3 times larger in summer than in spring.

The threshold dosis was larger, when mixed in larger volumes of serum.

b) By extraction after CARTLAND-NELSON, the threshold dosis was much decreased, and the time for the finding of sperms was shortened (Table 1).

We modified the method as follows :

In the original method, "let stand 16 hours in an ice box," in our method, "let stand 30 minutes in an ice box or in running water."

And a similar reaction was provided.

3. Simultaneously obtained results of the frog-tests by the pregnant mares' sera and their extracts were compared (Tables 2-1, 2-2).

4. Crude PMS extracted by the above mentioned method, from 10 pregnant mares' serum, gave positive reactions.

In May and June, the extracts of 1 cc, and in July and August 2 cc, of pregnant mares' serum provided good positive reactions within 6 hours (Tables 3-1, 3-2).

5. For the diagnosis of pregnancy in the mares, the following method would be suitable (for the purpose of security, twice the above mentioned volumes were used).

a) The modified CARTLAND-NELSON method is applied to 10 cc of the pregnant mare's serum in May and June, and 20 cc in July and August.

b) The extract is dissolved in 5~10 cc of water, and injected to 5 frogs, and the cloacal examination is performed 6 hours after the injection. In the positive case, the sperms will be found within 3 hours.

c) This method should be applied within 50~90 days of pregnancy.