

尿による牛の妊娠診断法の研究 (第1報)

鈴木 和也

(化学研究室)

A Study on the Diagnosis of Pregnancy by Cow's Urine...No. 1

Kazuya SUZUKI

(Lab. of Chemistry, Fac. of Education, Kagoshima Univ.)

I. 緒 言

家畜の繁殖率を高めるにはよく受胎させることであり、この為には早期の妊娠診断は重要な意義がある。ABDERHALDEN (1912) が防衛酵素反応による妊娠診断法を報告して以来、木内 (1916) の尿診断法、ZONDEK-ASCHEIM (1928) の Prolan 検出法、FRIEDMANN 反応 (1929) 等、種々の生化学的妊娠診断法が報告された。

牛の妊娠診断法として実際応用されているのは、直腸検査法、膣検査法 (含、子宮頸管粘液法) 及び卵胞ホルモン注射法等の臨床診断法である。

著者は牛尿を用いてアセトン処理を行い、その水溶液が氷酢酸に対して妊娠時と非妊時とで相異なる反応を呈すること、併せてニンヒドリン呈色の有無を検することによって牛の妊否を診断しうることを知りえたのでここに報告する。

II. 実験材料及び方法

まづ牛の早朝尿を採取し、新鮮なうちに表1-1ならびに表1-2の処理を行ないながら試料とした。

表 1-1

早	朝	尿	
	↓	・濾過	
濾	過	尿 4 cc.……検体 A [尿色の薄いもの及び pH 7.0 以下の尿は除く]	
		・アセトン 10 cc. 添加	
		・遠心 (5000 r. p. m.) 2 分間	
	↓		
沈		澱	
		・水 2 cc. にとかす	
		・遠心 (5000 r. p. m.) 2 分間	
	↓		
水	溶	液 …… 検体 B ₁ [無色のものは除く]	
	↓	・氷酢酸 1 滴添加 (5 分間静置)	
検	体	B ₂ …… 沈澱の有無 [沈澱生成のものは非妊]	
	↓	・振る	

検 体 B_3 …… 清濁の有無〔濁つたものは非妊〕

以上の操作で B_2 , B_3 において沈殿も濁りも生じないもののみについて表1—2の操作を行う。

表 1—2

早	朝	尿	
	↓	・濾過	
濾	過	尿 4 cc. …… 検体 A	〔尿色の薄いもの及び pH 7.0 以下の尿は除く〕
	↓	・アセトン 16 cc. 添加	
	↓	・遠心 (5000 r. p. m.)	2 分間
沈		澱	
	↓	・水 2 cc. にとかす	
	↓	・遠心 (5000 r. p. m.)	2 分間
水	溶	液 …… 検体 C_1	〔無色のものは除く〕
	↓	・氷酢酸 1 滴添加 (5 分間静置)	
検	体	C_2 …… 沈澱の有無	〔沈澱生成のものは非妊〕
	↓	・振る	
検	体	C_3 …… 清濁の有無	〔濁つたものは非妊〕
	↓	・2.5% ニンヒドリン 1 滴添加	
検	体	D …… 呈色の有無	〔呈色しないものは非妊〕

以上に表示したものについて詳述すれば、つぎのとおりである。

(A) 牛の早朝尿 (自然排尿のものでもよい) 約 20~30 cc を濾紙でこす。この尿色及び pH (検体 A) を検し、尿色の薄いもの^(註)及び pH 7.0 以下を呈する尿は本試験の対象から除外する。

(B) 濾過尿 4 cc をポリエチレン製沈澱管 (容量 25 cc) にとり、アセトン 10 cc を加え、ガラス棒で攪拌し、遠心沈澱 (5000 r. p. m. 2 分間) せしめ上清を捨て、沈澱を 10 分間位放置してアセトンを十分に除く。この沈澱を水 2 cc にとかし、ポリエチレン製沈澱管 (容量 10 cc) に移し再び遠心 (5000 r. p. m. 2 分間) して上清を試験管 (径 15 mm) に移す。この上清の着色の有無 (検体 B_1) を検する。無色のものは本試験の対象から除外する。着色のもののみ以下の操作を行う。

この試験管を約 45° に保持し、管壁にそって氷酢酸 1 滴を滴下し 5 分間静置後、20 W 蛍光灯で透光 (黒紙バック) して管底部に沈澱生成の有無 (検体 B_2) を検する。このとき沈澱を生じたものは非妊尿と判定する。沈澱を生じないものについてはその試験管を振り、透光してその清濁の有無 (検体 B_3) を検する。このとき濁つたものは非妊尿である。

以上の操作で B_2 , B_3 において沈澱も濁りも生じないもののみについて、表 1—2 の操作を行う。

(C) 濾過尿 4 cc をポリエチレン製沈澱管 (容量 25 cc) にとり、アセトン 16 cc を加え、前記 (B) 同様の操作を繰り返す。

(D) (C) において氷酢酸で全く沈澱も濁りも生じなかったものに 2.5% ニンヒドリン 1 滴を

註) 径 15mm の試験管に尿を満たし、上視 (白紙バック) したとき赤味を含まないものを尿色の薄いものとす。

加えて加熱し、振りながら10回沸騰させ放置して10分後に呈色の有無(検体D)を検する。このとき紫色を呈するものを妊娠尿とする。呈色のないものは非妊娠尿である。

以上の処理を実施例についてまとめると、表2のおとりである。

表 2. 牛の妊否判定基準一覧表

(A)		(B)			(C)			(D)	判 定	反 応 型
着 色	pH	着 色 (B ₁)	沈 殿 (B ₂)	濁 否 (B ₃)	着 色 (C ₁)	沈 殿 (C ₂)	濁 否 (C ₃)	呈 色		
+	7.2 以上	+	+						(-)	B ₂
+	〃	+	-	+					(-)	B ₃
+	〃	+	-	-	+	+			(-)	C ₂
+	〃	+	-	-	+	-	+		(-)	C ₃
+	〃	+	-	-	+	-	-	-	(-)	D ₁
+	〃	+	-	-	+	-	-	+	(+)	D ₂

(註) 空欄は処理不要箇所である。

+: 着色, 沈殿, 濁りあるいは呈色の認められるもの。

-: 着色, 沈殿, 濁りあるいは呈色の認められないもの。

(+): 妊娠反応陽性,

(-): 妊娠反応陰性を示す。

尿色の薄いもの, pH 7.0 以下の尿は本試験の対象から除く。

方法(B)において沈殿を生ずるものを「反応型 B₂」とし、方法(B)において沈殿も濁りも生じないで、方法(C)において沈殿を生ずるものを「反応型 C₂」とする。以下同様に反応型をきめる。

III. 実験結果及び考察

本法によって実施した具体例を表3に、それらの例数の総括を表4に示す。

表 3. 尿による牛の妊否判定に関する資料

試験 月日	牛に関する事項		(A)		(B)			(C)			(D)	判定	反応型
	記号	備 考	着色	pH	着色 (B ₁)	沈殿 (B ₂)	濁否 (B ₃)	着色 (C ₁)	沈殿 (C ₂)	濁否 (C ₃)	呈色		
7. 9	T.	出 産 後 12日	+	8.2	+	+						(-)	B ₂
9. 8	I ₁ .	出 産 後 17日	+	7.8	+	+						(-)	B ₂
8. 9	M.	8月9日 発 情	+	7.8	+	+						(-)	B ₂
9. 3	I. K.	未 種 付	+	8.0	+	+						(-)	B ₂
7. 16	I.	7月15日 発 情	+	7.4	+	-	+					(-)	B ₃
8. 28	I. K.	未 種 付	+	8.6	+	-		+	+			(-)	C ₂
8. 19	N ₃ .	未 種 付	+	8.0	+	-		+	-	+		(-)	C ₃
8. 26	X.	未 種 付	+	7.6	+	-		+	-	-	-	(-)	D ₁
8. 19	I ₁ .	分 娩 前 3日	+	8.0	+	-		+	-	-	+	(+)	D ₂
8. 25	Y.	6月10日 種 付	+	8.2	+	-		+	-	-	+	(+)	D ₂
8. 23	W ₂ .	5月7日 種 付	+	7.8	+	-		+	-	-	+	(+)	D ₂
9. 6	N.	4月1日 種 付	+	8.4	+	-		+	-	-	+	(+)	D ₂
8. 19	T ₂ .	1月19日 種 付	+	8.2	+	-		+	-	-	+	(+)	D ₂
8. 19	T. M.	(昭39)12月17日種付	+	8.0	+	-		+	-	-	+	(+)	D ₂

今、表3についてみると非妊娠尿には5つの反応型があり、牛 I. K. についてみてもわかるように同一個体でも日によってあらわれる反応型がちがうがその妊否に影響はない。しかし、妊娠尿につい

表 4. 実施例の総括 (数字は頭数)

種 付 後 7日～30日の間 で試験のもの 12	妊 娠	4	陽 性	4
	非 妊	8	陰 性	0
妊 娠 31日～90日のもの		4	陽 性	4
妊 娠 3カ月～10カ月のもの		15	陰 性	0
未 種 付 の も の		51*	陽 性	0
計		82		51

(註) 妊娠尿, 非妊娠尿にかかわらず尿色の薄いもの, 及び pH 7.0 以下のものは除いたものである。

* 分娩直後の牛 3 頭及び仔牛 (♀) 7 頭を含む

の, 尿が pH 7.0 以下を呈するも及び糞の混入しているものは妊娠尿でも陰性類似反応を呈するので, 時機をかえて採尿し検定をやりなおすことである。また, 濾過尿が常時濁っているもの (病的なものと思われる) は不適である。

つぎに妊娠尿における陽性を呈する物質の本態について考えると斎藤 (1957 年) はステロイド型ホルモンによるものではないと報告しているが本法も同様の結果を示した。この点については今後の究明にまちたい。

IV. 摘 要

家畜における妊娠の早期診断は, その増産上, 非常に重要なことである。これを判定する方法に生理的または臨床的検査法が採用されている。

著者のえた資料は化学的な処理にもとづくものであるが, これによっても, 牛の妊娠診断が可能であると思われる。

(1) 新鮮尿を採取し, その尿色及び pH を検し, 尿色の薄いもの, 酸性を呈する尿は本試験の対象から除外する。

(2) 尿にアセトンを加え, 生じた沈殿を遠心分離して集める。つぎにその沈殿の水溶液に氷酢酸を添加し, その結果, 沈殿を生じたならばその原尿は非妊娠尿と判定する。

(3) (2) において沈殿を生じなかったものの尿につき, アセトンの量を変えて (2) と同様アセトンを加え, 沈殿を集め, その水溶液に氷酢酸を添加し, 沈殿を生じたならば, その原尿は非妊娠尿である。結局, 妊娠尿からえられた水溶液は (2) でも (3) でも氷酢酸によって沈殿を生じない。

(4) 以上において氷酢酸によって全く沈殿を生じなかった溶液について, 2.5% ニンヒドリン水溶液で呈色試験を行う。このとき紫色を呈するものは妊娠尿である。

(5) 本法の試験結果では 82 例中 23 例の妊娠牛を検出した。この結果は生理的方法, もしくは

てはただ一つの反応型だけである。

また, 一般に非妊娠尿は方法 (B) において沈殿を生ずるもの (B₂型) が多い。

なお, 発情期においても妊娠反応陰性を呈し, 分娩後は速やかに陰性を呈しはじめる。

表 4 についてみると, 試験例数としては少ない憾みもあるが, 種付 (人工授精) 後わずか 7 日～30 日目で妊否の判定が可能であるように思われる。しかも, 妊娠期間を通して陽性反応を持続するように推定される。

なお, 本法実施に当って特に留意しなければならないことは, 前述のとおり尿色がうすいも

臨床的方法によって確認したものと全く一致する。

しかも 23 例中 4 例は種付後 7～30 日で妊娠反応陽性を明瞭に示した，なお，妊娠期間中を通して陽性を持続するように推定される。

(6) 非妊尿では発情期においても非妊反応を呈する。

本研究は本学部教授，故斎藤信康先生，田代一男先生 並びに船元重春先生の御懇篤な御指導によって実施された。なお，資料の収集に当っては鹿児島大学農学部畜産科，鹿児島市の福田牧場，山崎（愛）牧場，山崎（秀）牧場，久永牧場，有里牧場，谷山市の鮫島牧場の各位に多大の御便宜と御協力をいただいた。あわせて深甚の謝意を表します。

参 考 文 献

- 板垣四郎：最新必携獣医綜典，朝倉書店（昭26）
児玉桂三監修：臨床生化学，南山堂（昭28）
越智勇一監修：臨床必携家畜別診断法，朝倉書店（昭31）
斎藤信康：鹿児島大学教育学部研究紀要，第9巻（昭32）
佐藤繁雄，星 修三：家畜臨床繁殖学，朝倉書店（昭31）
佐藤繁雄，星 修三：家畜臨床繁殖学（産科篇），朝倉書店（昭32）
湊 顕：ホルモン（昭23）
宮本貞一：生化学（昭38）

Summary

To confirm pregnancy at the early stage is quite important in cattle breeding. For this purpose, biological or clinical methods have been adopted. The data obtained through the present chemical process seem to be reliable in confirming cows' pregnancy.

(1) Fresh cow's urine was gathered and examined for the tone of the color and pH. Pale or acidified urine was excluded.

(2) The precipitate obtained by adding acetone to cow's urine was separated with a centrifuge. Next, glacial acetic acid was added to the aqueous solution of the precipitate. If the precipitate is found in the solution, it can be decided that the original urine came from a non-pregnant cow.

(3) The urine which did not give the precipitate in the process mentioned in (2) was treated in the same way as in (2), adding a different amount of acetone from (2). In this case, too, the solution from the non-pregnant cow's urine gave the precipitate. On the contrary, when glacial acetic acid is used, the solution from a pregnant cow's urine produced no precipitate both in (2) and in (3).

(4) The solution which did not give any precipitate by means of glacial acetic acid in (2) and (3) was tested with 2.5% aqueous solution of ninhydrin. In this case, if the solution shows a purplish color, it can be decided that the solution was from a pregnant cow's urine.

(5) By this method the writer found 23 out of 82 subjects to be pregnant. This value is identical to the results given by biological or physiological reserchers. The urine from pregnant cows responded clearly to this test, and it seems to remains positive throughout pregnancy. Four out of the above mentioned 23 pregnant cases were detected as early as from seven to thirty days after artificial insemination. This method, therefore, may be useful in early confirmation of pregnancy.

(6) The urine from non-pregnant cow showed no response to the test even at the oestrus.