報 文

生殖腺刺激ホルモン投与による
ハコネサンショウウオの産卵誘発

岩沢 久彰・解良 芳夫

(新潟大学理学部生物学教室)

Oviposition in the Lungless Salamander *Onychodactylus japonicus* Induced by Injection of Frog Pituitary and Commercial Gonadotropins. Hisaaki IWASAWA and Yoshio KERA (Biological Institute, Faculty of Science, Niigata University)

Adults of *Onychodactylus japonicus* can be obtained easily in Hinoémata, Fukushima Prefecture, in the breeding season (June-July). Various gonadotropic substances were injected intraperitoneally into preovulatory females (av. body wt. 8.2g) of this species, and the oviposition-inducing effect was examined. The animals were kept at $10 \pm 1^\circ\text{C}$ in a dark refrigerator during the experimental period. If a proper dose of gonadotropic substances was injected, oviposition occurred on the 3rd or 4th day after injection. Administration of 500 IU of *Puberogen* (hCG, Sankyo Co. Ltd., Tokyo) is practical for inducing oviposition. Injection of fresh anterior pituitaries of adult *Rana catesbeiana* showed a lethal effect as well as an oviposition-inducing effect, e.g., one half of the animals injected with one pituitary died on the 4th day or later after the treatment. No difference in the death rate was recognized between the sexes. The lethal effect of acetone-dried pituitaries was less than 1/10 that of the fresh pituitaries. Therefore, administration of acetone-dried pituitaries is also practical. *Serotropin* (PMS, Teikoku Hormone Mfg. Co. Ltd., Tokyo) showed a similar oviposition-inducing potency similar to that of *Puberogen*, but it is rather expensive for practical use. The number of eggs laid by one female of this species was 2-20, 11 on the average.

ハコネサンショウウオは生殖、発生関係の研究材料としては、有尾両生類のなかでは、イモリや *Hynobius* 属のサンショウウオと比べると、かなり特殊な種類といえるであろう。即ち、産卵期が6—7月で、生殖直前の雌雄をほぼ1:1の性比で多数入手でき(岩沢, 1976)、卵は淡クリーム色で大きく、発生速度がいちじるしく遅いこと(工藤, 1934)などが目立って異なる点である。そして、研究の目的によっては、上記のようなことが実験材料としての利点と

考えられる場合もある。本種の産卵誘発については中村 (1939, 1940, 1941 a, b, c, 1942a, b; 岩沢, 1977参照) の一連の研究がある。しかし、これらは主として脳下垂体投与を手段として排卵, 産卵の数量的, 時間的關係などを調べたもので, 産卵誘発の実際的な方法が示されている訳ではない。一方, 脳下垂体投与による両生類の排卵誘発は現在では広く行なわれており (Rugh, 1948; 朝山, 1956), また, 市販の生殖腺刺激ホルモン剤を用いた産卵誘発もアフリカツメガエル (高橋・斉藤, 1967; 石原・田中, 1977) やイモリ (Matsuda and Oya, 1977) では一般化している。それで, 著者らがこれらの産卵誘発方法をハコネサンショウウオで検討したところ, 若干の知見が得られたので報告する。

材 料 と 方 法

実験材料としたハコネサンショウウオ *Onychodactylus japonicus* の成体は福島県南会津郡松枝岐村で産卵期の7月上旬に採集した。動物はそれぞれ同数ずつの雌雄からなる17群 (Nos. 1—17) に分かち, 32×24×11 (深さ) cmのプラスチック容器に若干の素焼の植木鉢片を置き,

Table 1. Ovulation and oviposition in *Onychodactylus japonicus* induced by intraperitoneal injection of various gonadotropic substances.

Group	No. of females	No. of animals which ovulated	No. of animals which laid eggs ^{a)}					
			Days after injection					
			3rd	4th	5th	6th	7th	8th
1. Control (0.6% NaCl)	8	0						
2. Fresh pituitary ^{b)} 1/10	8	0						
3. 1/3	8	2.5	1	1.5 (1)				(1)
4. 1	8	8	3.5	1.5	(1)			(3)
5. 3	8	8	2	(4)	(2)			
6. Acetone-dried pituitary ^{c)} 1	10	4	1	3				
7. 3	16 ^{d)}	13	9.5	2.5	1			
8. 10	8	8		4.5	2.5 (1)	0.5	0.5 (1)	(1)
9. <i>Gonotropin</i> (hCG) 10 IU	8	0						
10. 100 IU	8	1				1		
11. 500 IU	8	3	2	1				
12. <i>Puberogen</i> (hCG) 100 IU	8	3	1	2				
13. 500 IU	8	6	1	4	1			
14. 2500 IU	8	6		2.5	1.5	0.5	(1)	
15. <i>Serotropin</i> (PMS) 10 IU	8	0						
16. 100 IU	8	3				3		
17. 500 IU	8	5	4	1				
18. Fresh pituitary 1	8 males	—			(2)	(1)		

^{a)} Figures in parentheses indicate animals which died.

^{b)} Anterior pituitary of adult *Rana catesbeiana*.

^{c)} 1.6mg.

^{d)} Two boxes were used.

2 cmの深さに水を入れた中に、それぞれの群を収容した。他に雄だけを収容した1群 (No. 18) を設けた。実験期間中、 $10 \pm 1^\circ\text{C}$ の暗黒に保ち、餌は与えず、換水は3日ごとに行なった。

用いた生殖腺刺激ホルモン物質は産卵期の雌雄の ウンガエル *Rana catesbeiana* (新潟産) の新鮮脳下垂体前葉、そのアセトン処理乾燥品 (1個の平均重量 1.6mg, 5月末から6月初めに浜松で採取, 坂口章氏の好意による), ギナトロピン (成分, ヒト胎盤絨毛性生殖腺刺激ホルモン hCG, 帝国臓器製薬株式会社, 原粉末 $30\mu\text{g}$ が 100 IU), プベローゲン (成分, hCG, 三共ゾーキ株式会社, 原粉末 $67\mu\text{g}$ が 100 IU), セロトロピン (成分, 妊馬血清性生殖腺刺激ホルモン PMS, 帝国臓器製薬株式会社, 原粉末 $50\mu\text{g}$ が 100 IU) の5種類である。これらのホルモン物質を0.6%の食塩水溶液に溶解し、その0.2ml ずつを採集後3日目の動物に1回だけ体腔内に注射した。産卵の有無の確認は注射の8日後まで24時間ごとに行なった。各ホルモン物質の投与量と用いた雌の個体数を表1に示す。Nos. 1—17の各群に含まれる雌と同数の雄には、アセトン処理脳下垂体を1匹あたり1個ずつ投与した。

結 果

各処理群における排卵個体数, 産卵個体数, 死亡個体数を表1に示す。ホルモン物質の注射が産卵誘発に有効の場合には、それに先立って総排出口から腹部の後半分にかけて、皮膚の毛細血管が拡張し皮膚が赤味をおびる。

産卵は多くの場合、ホルモン物質投与の3—4日目におこるが、第8, 14群などでは5—6日目に及ぶものもみられた。ホルモン物質の投与に対して卵巣はほぼ悉無律的な反応を示した。即ち、排卵がまったく起らないか、或いは成熟卵のすべてを排卵するかのいずれかで、一部の成熟卵が卵巣に残っていたという場合は少ない。多量のホルモン物質を投与すると、小さい未熟卵をも排出することがあり、このようなケースは全産出卵629個のうち、第4群で1卵ずつ2例、第11群で1卵が観察された。

新鮮脳下垂体の投与は16個 (第2群) では産卵誘発効果は認められず、1/3個 (第3群) では若干の個体で産卵がみられた。1個 (第4群) では全例で産卵誘発効果がみられたが、死亡率が高い。死亡は1/6個投与でもみられ、投与量と死亡率の間には正の相関がある。死亡率には性差は認められず、死は投与の4—8日目におこった。死亡した雌16匹のうち、15匹では排卵しており、それらの卵は1匹では産出され、他の1匹では卵管の中にあり、それら以外の個体では体腔内にあった。脳下垂体投与の8日目に死んだ1匹は未排卵であった。

アセトン処理脳下垂体の投与では、1個 (第6群) で40%, 3個 (第7群) では81%で産卵がみられた。10個 (第8群) では全例で産卵がみられたが、死亡率は38%であった。市販のホルモン剤ではプベローゲン500 IU (第13群) とセロトロピン500 IU (第17群) の投与が過半数の個体に産卵を誘発し、かつ死亡個体はみられなかった。プベローゲン2500 IU 投与 (第14群) は同剤の500 IU 投与の場合と比べて、排卵率は同じであったが、産卵率はむしろ低下した。市販のホルモン剤は特に大量を投与しなければ、動物が死ぬことはなかった。

雌は1対の卵嚢をふつう、平行的にならべて産みつけるが、このように卵嚢が対をなすことが確認された52例について調べた左右の卵嚢に含まれる卵数 (未熟卵を除く) の合計は5—20

個, 平均11.0個であった。

考 察

今回の実験では, 同一ホルモン物質投与群の間では, 産卵誘発効果はホルモン物質の投与量に比例的で, 特に矛盾する点はないが, 各ホルモン物質間の効果については, 更に検討を要する問題がいくつかある。

新鮮脳下垂体1個の投与は全例に排卵をおこしたが, それら動物の半数は産卵することなく死亡した。脳下垂体をアセトン処理すると, 産卵誘発力は減少するが, それにも増して致死効果はいちじるしく減少した。市販の生殖腺刺激ホルモンには致死効果は殆んど認められなかったから, 新鮮脳下垂体投与による動物の死は, 生殖腺刺激ホルモン以外の物質の影響によるものであろう。この物質はアセトンにかなりよく溶解することが考えられる。

市販のホルモン剤ではプベローゲンとセロトロピンがほぼ同様な産卵誘発効果を示し, 共に500 IU で過半数の個体に産卵をおこした。従って本種では実用的な産卵誘発方法としてプベローゲン 500 IU の使用が適当と思われる。セロトロピンはプベローゲンに比べて約2.7倍高価である。もちろん, ウシガエルのアセトン処理脳下垂体が入手できれば, その使用も推奨できる。

ゴナトロピンの成分はプベローゲンと同じ hCG であるが, 同一表示単位の産卵誘発効果はプベローゲンの約 $\frac{1}{2}$ であった。イモリではゴナトロピンの10 IU 投与で充分な産卵誘発効果がみられる (Matsuda and Oya, 1977) が, ハコネサンショウウオでは100 IU の投与でも産卵は8匹中1匹でみられたにすぎない。即ち, 体重あたりのゴナトロピン投与量に換算しても, 本種はイモリと比較してかなり大量のゴナトロピンを投与しなければ産卵を誘発することができない。山本 (1977) はハコネサンショウウオにゴナトロピン 500 IU を3日ごとに3回注射して不完全な産卵を観察し, また, ニジマスのアセトン処理脳下垂体4個を投与して3—4日目に若干例で正常な産卵をみたと報告しているが, 今回の実験結果はこれと矛盾するものではない。

既に述べたように, 中村はハコネサンショウウオに同種の脳下垂体を投与してその排卵, 産卵に及ぼす効果を検討している。2—5個を注射した場合がもっとも効果的で, 72.5%で産卵がみられた (中村, 1939)。その場合, 脳下垂体投与から産卵終了まで, 10°C では50—70時間を要した。同氏の別の研究では93時間 (中村, 1942 a), 3日 (中村, 1942 b) とあり, 3—4日目に産卵がみられるという今回の観察結果はこれらとほぼ一致している。

文 献

- 朝山新一 1956. 性と生殖の実験法. 生物学実験法講座, 中山書店.
 石原勝敏・田中昌子 1977. アフリカツメガエルの発生(1). 遺伝 31(7): 88-96.
 岩沢久彰 1976. 桜枝岐におけるハコネサンショウウオの漁法と燻製. 爬虫両棲類学雑誌 6(4): 105-109.
 岩沢久彰 1977. 中村定八博士の両生類の生殖に関する研究. 両生爬虫類研究会誌 7: 35-45.

- 工藤得安 1934. 函根山椒魚 (*Onychodactylus japonicus* Houttuyn) ノ産卵並ニ胚仔ノ採取ニ就テ. 新潟医科大学解剖学教室輯報 4 : 1-8.
- Matsuda, M. and T. Oya 1977. Induced oviposition in the newt, *Cynops pyrrhogaster* by subcutaneous injection of human chorionic gonadotropin. 動物学雑誌 86 : 44-47.
- 中村定八 1939. 脳下垂体前葉ホルモン注射に依る函根山椒魚の人工生殖. 動物学雑誌 51 : 14-23.
- 中村定八 1940. 函根山椒魚に於ける同種脳下垂体前葉ホルモン一回注射量と排卵並に産卵との関係. 動物学雑誌 52 : 100-119.
- 中村定八 1941 a. 函根山椒魚に於ける脳下垂体の重量とその注射に依る人工排卵とに就て. 動物学雑誌 53 : 275-283.
- 中村定八 1941 b. 妊婦並に悪性絨毛上皮腫患者の尿 (乾燥粉末) 注射に依る函根山椒魚の排卵並に産卵に就て. 動物学雑誌 53 : 437-451.
- 中村定八 1941 c. 脳下垂体の眼球内移植に依る 函根山椒魚の人工排卵に就て. 動物学雑誌 53 : 513-520.
- 中村定八 1942 a. 函根山椒魚の人工排卵実験に於ける実験動物固有脳下垂体の意義に就て. 動物学雑誌 54 : 1-10.
- 中村定八 1942 b. 太陽光線遮断法に依る函根山椒魚の産卵. 動物学雑誌 54 : 51-59.
- Rugh, R. 1948. Experimental Embryology. Burgess Publ. Co., Minneapolis.
- 高橋裕哉・斉藤松太郎 1967. クセノプス——その飼育と繁殖. 採集と飼育 29(1) : 16-25.
- 山本俊朗 1977. ハコネサンショウウオの形態. 採集と飼育 39(6) : 296-303.