The Zoological Society of Japan

動物学雑誌 ZOOLOGICAL MAGAZINE 83: 91—95 (1974)

ヒキガエル耳腺分泌物質の種内変異について

松 井 正 文

606 京都市 京都大学理学部動物学教室

1972年12月11日 受領
1973年 8 月24日 再受領

On Intraspecific Variation in the Parotoid Gland Secretion of the Japanese Toad, *Bufo bufo japonicus*. MASAFUMI MATSUI (Department of Zoology, Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto 606)

ABSTRACT Intraspecific variations in the parotoid gland secretion of the Japanese Toad, *Bufo bufo japonicus*, from Kyoto, were examined using paperchromatography. Ethanol extracts were stained and detected with (1) ninhydrin, (2) diazotized *p*-nitroaniline, (3) phosphomolybdic acid, and (4) Dragendorff's reagent. The chromatographic patterns, except those detected with ninhydrin, were similar, with no significant variation with age or sex. As compared with the patterns obtained by investigators of several North American species belonging to *B. americanus* species group and *B. cognatus* species group, the chromatographic pattern of the secretion from *B. japonicus* is considerably different, possibly indicating phylogenetic divergence. (*Zool. Mag. 83: 91—95, 1974*)

日本産ヒキガエル (*Bufo bufo japonicus*) は，ヨーロッパ産のヒキガエル (*Bufo bufo bufo*) とたがいに亜種の関係にあるとされている (Schlegel, 1838; Okada, 1931 他)。しかし著しい地方変異が含まれているためにその分類学的位置づけはいまだ明瞭でなく，日本産のすべてを1亜種 (*B. b. japonicus*) とする考え方 (中村・上野, 1963) と，数亜種を認める考え方 (Okada, 1966) とが並立している。日本産のものに限らず，一般にヒキガエル科 (Bufonidae) の動物は分類が困難なものとされているが，こうした分類状況の不統一は，従来の研究方法が比較的少数の個体の外部形態の比較のみに基いていたところに一因があると考えられる。

ところでヒキガエル属 (*Bufo*) の動物は耳の上方に耳腺とよばれるこの属特有の器官をそなえている。これは外敵に襲われた際に毒液を出すもので，一種の防衛器官とみられている。この耳腺の分泌物質をペーパークロマトグラフィーによって分析し，ヒキガエル類の系統分類に役立てた研究 (Hunsaker *et al.*, 1961; Wittliff, 1962 など) が近年とみに試みられるようになった。なかでも，Low (1972) は世界各地に産する多数の種類を対象とし，この分析にもとづいて広汎な論述を行っている。この方法の系統分類学に対する有効性は，耳腺の特殊化とその適応的・機能的意義からみて十分予想しうるところである。

しかしながら，これらの研究ではアジア地域に産するヒキガエルについてはほとんど触れられておらず，また種間の比較を行なうさいに基本的な重要性をもつ種内変異の討論が十分に行なわれていない。

以上のような観点から，筆者は，1972年8月に京都市内で採集したヒキガエルを対象とし，ペーパークロマトグラフィーによる耳腺分泌物質の分析を行い，齢，性別による同物質構成の種内変異を調査した。また，その結果にもとづきすでに知られている北米産，イタリア産の *Bufo* 属の諸種との比較により日本産のヒキガエルの系統の問題についても考察を試みた。

対象としたヒキガエルは15個体でこれらの個体には性的に未成熟な7個体から十分に生長し，明らかに性成熟に達していると考えられる成体の雌雄各4個体まで種々の発育段階のものが含まれている。ヒキガエルの生理・生態的性成熟を判別する方法は確立していないが，今回は次の基準に基いて成熟度を判定した。i) 前肢第Ⅰ～Ⅲ指内側に肉瘤を有し，発声するものは成体の雄。ii) 体長 90 mm 以上で i) の形質をもたないものは成体の雌。iii) i) ii) に概当しないものは幼蛙とした。

ヒキガエルを採集後数日内に耳腺の周囲を湿ったガーゼでふき，乾燥させてから，耳腺を圧迫し，滲出した分泌液を直径約 4 mm の脱脂綿球で吸収した。この脱脂綿球を試験管に投入し，0.2 m*l* のエタノールを加え 5°C で24時間抽出を行った。その後 0.1 m*l* のエタノール抽出物を一次元の上昇法を用いて分離した。

沪紙は東洋沪紙 No. 50 を用い，展開剤には水飽

NII-Electronic Library Service

The Zoological Society of Japan

和 *n*-ブタノール，氷酢酸，水（4：1：1 v/v）を用いた。展開剤は使用のたびに新しく調整し，あらかじめ容器内に蒸気を満たしてから約 25°C で 12 時間展開を行った。展開完了後のフロントまでの平均距離は約 26 cm であった。これを室温で乾燥後，ニンヒドリン（α-アミノ酸グループの検出），diazotized *p*-nitroaniline（フェノールおよびアロマティックアミンの検出），燐モリブデン酸（ヒドロキシステロイドの検出），Dragendorff 試薬（アミンアルカロイドの検出）を用いて検出を行った。ニンヒドリンを使用した場合は室温で一昼夜放置し，燐モリブデン酸では室温で乾燥後 37°C に加熱した。diazotized *p*-nitroaniline, Dragendorff 試薬の場合は室温で乾燥したのち検出を行った。

ニンヒドリン：6 箇所以上に紫色のスポットが見られた。これらのスポットの数，位置にはかなりの個体変異がみられたが，これらの変異には齢や性別による傾向はみられず，いずれも最上部に淡黄色のスポットが現れ，紫色のスポットもたがいに類似したパターンをとった（図 1）。

diazotized *p*-nitroaniline：Rf＝0.61 の位置に強い赤褐色のスポットがみられた。このスポット（表 1, A）はかなりの広がりを持ち，周辺部では弱い赤褐色を呈した。

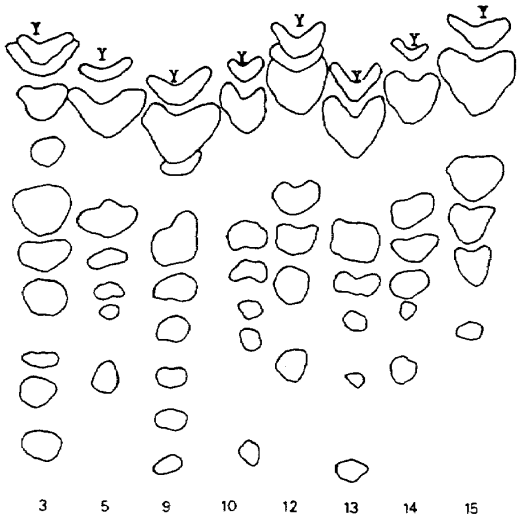

Fig. 1. Paperchromatograms of 8 individuals, sprayed with ninhydrin. Y represents a pale yellow spot, and all others are purple in color. Each number corresponds to the specimen number of Table 1.

Table 1. The Rf values of the secretion components staining positively at room temperature with (A) diazotized p-nitroaniline, (B) phosphomolybdic acid, and (C) Dragendorff's reagent.

Specimen No.	Sex	Body length (mm)	Rf values					
			A	B		C		
				a	b	a	b	c
1	(young)	23.6	0.63	0.63	0.84	0.55	0.64	0.84
2	(young)	34.7	0.62	0.61	0.83	0.53	0.62	0.84
3	(young)	43.5	0.63	0.63	0.85	—	0.63	0.86
4	(young)	49.8	0.63	0.62	0.82	0.53	0.63	0.87
5	(young)	58.0	0.60	0.58	0.83	0.53	0.60	0.85
6	(young)	62.7	0.61	0.59	0.84	—	0.60	0.84
7	(yonng)	72.5	0.60	0.61	0.84	0.51	0.59	0.85
8	♀	93.6	0.60	0.60	0.83	0.49	0.58	0.84
9	♀	100.8	0.55	0.61	0.81	0.49	0.57	0.83
10	♀	101.7	0.61	0.62	0.83	0.51	0.59	0.90
11	♀	102.4	0.61	0.62	0.83	0.55	0.64	0.87
12	♀	117.5	0.64	0.62	0.84	0.51	0.62	0.85
13	♀	122.4	0.57	0.63	0.83	—	0.60	0.82
14	♀	123.0	0.63	0.64	0.86	0.59	0.65	0.86
15	♀	141.0	0.69	0.62	0.84	0.54	0.62	0.85

NII-Electronic Library Service

The Zoological Society of Japan

燐モリブデン酸：室温では Rf＝0.62 の位置と Rf＝0.84 の位置に強く青灰色のスポットがみられ（表1, B-a および B-b），とくに後者は縦長であった。一部の個体ではこれらのスポットが明青色を呈した。次にクロマトグラムを 37°C に加熱したが変化はみられなかった。

Dragendorff 試薬：Rf＝0.61（表 1, C-b）の位置に強くピンクオレンジ色のスポットがみられ，そのほかに Rf＝0.85（表 1, C-c）の位置にはやや弱いオレンジ色のスポットがみられた。後者は縦長でその長さは平均して原点からフロントまでの距離の $^1/_4$ に達した。Rf＝0.53（表 1, C-a）の位置には非常に弱いピンクオレンジ色のスポットが認められたが，これは非常に弱くしばしば検出できなかった。

ニンヒドリンを除く3種の指示薬を用いて検出した場合の Rf 値は体長に関係なく一定の値をとるように思われる（表 1）。そこで，Rf 平均値の信頼限界（信頼度 95%）を幼若個体と成体間で比較すると（表 2）有意差はないと判断された。次に成体について雌雄間で同様な比較を行ったが，有意差はなかった（表 3）。

先に述べたように今回京都市内で採集したヒキガエル個体群内では α-アミノ酸グループを除いて耳腺分泌物質に齢・性別などによる種内変異が見出せず，その構成がほぼ安定していることが判明した。この結果は Hunsaker *et al.* (1961) および Wittliff (1962) が北米産のヒキガエル数種について少数の個体から推測した結果と一致する。

ニンヒドリンによる α-アミノ酸グループの検出では他の三つの方法とは異なり個体変異がみられたが，この内容が実験誤差によるものか，実験下の各個体のもつ生理的な性質を反映しているものかは今のところ不明で，その内容の詳細については今後さらに検討を加える必要がある。

他の3種の方法による結果については，予備的な実験で一部の個体について同一試料を2度以上展開した時ほとんど差がなかったことから実験誤差は僅少とみられる。また被験個体のあいだではパターンに差異がほとんど見出せず安定していることから，ペーパークロマトグラムのパターンを分類学的研究の一手法として利用する際には，これら3種の方法はニンヒドリンによる方法よりも有効であると考え

Table 2. Ninety five % confidence interval of mean Rf values: (1) young individuals and adults.

Spot		Age	n	$\bar{x}\pm tSx$	Spot		Age	n	$\bar{x}\pm tSx$
A		(young)	7	0.617±0.014	C	a	(young)	5	0.530±0.021
		(adult)	8	0.613±0.035			(adult)	7	0.526±0.097
B	a	(young)	7	0.610±0.018		b	(young)	7	0.616±0.017
		(adult)	8	0.620±0.009			(adult)	8	0.609±0.024
	b	(young)	7	0.836±0.010		c	(young)	7	0.850±0.011
		(adult)	8	0.841±0.020			(adult)	8	0.853±0.018

Table 3. Ninety five % confidence interval of mean Rf values: (2) females and males.

Spot		Sex	n	$\bar{x}\pm tSx$	Spot		Sex	n	$\bar{x}\pm tSx$
A		♀	4	0.603±0.040	C	a	♀	3	0.530±0.131
		♂	4	0.623±0.095			♂	4	0.523±0.044
B	a	♀	4	0.623±0.027		b	♀	4	0.605±0.049
		♂	4	0.618±0.008			♂	4	0.613±0.047
	b	♀	4	0.853±0.046		c	♀	4	0.855±0.054
		♂	4	0.830±0.021			♂	4	0.850±0.026

NII-Electronic Library Service

The Zoological Society of Japan

Table 4. The comparison between American and Japanese toads in the pattern of the paper chromatogram. The data for *B. americanus* and *B. cognatus* species groups adopted from Wittliff (1962)

Rf values		0.30			0.56			0.63			0.73			0.86			0.91		
Species \ Reagent		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
B. cognatus group	*B. cognatus*	lg	—	—	rp	bg	—	rp′	bg′	—	—	—	—	—	bg*	o	—	bg*	—
	B. speciosus	lg	—	—	rp	bg	—	rp′	bg′	—	—	—	—	—	bg*	o	—	bg*′	—
	B. compactilis	—	—	—	rp	bg	—	rp	bg′	—	—	—	po	—	bg*	o	—	bg*′	—
B. americanus group	*B. americanus*	—	—	—	rp	bg	—	rp	bg	po	—	—	—	—	bg*	o	—	bg*	—
	B. woodhousei	lg	—	—	rp	bg	—	rp	bg	po	—	—	—	—	bg*	o	—	bg*	—
	B. hemiophrys	—	—	—	rp	bg	—	rp	bg	po	—	—	po	—	bg*	o	—	bg*′	—
	B. terrestris	—	bg	—	rp	bg	—	rp	bg	po	—	—	—	—	bg*	o	—	bg*	—
B. bufo joponicus	♂	—	—	—	—	—	po′	rb	bg	po	—	—	—	—	bg	o	—	—	—
	♀	—	—	—	—	—	po′	rb	bg	po	—	—	—	—	bg	o	—	—	—
	(Y)	—	—	—	—	—	po′	rb	bg	po	—	—	—	—	bg	o	—	—	—

′: Slightly stained. —: Not stained. *: Stained when heated. lg: light gray. bg: blue-gray. rp: reddish-purple. rb: reddish-brown. po: pink-orange. o: orange.

られる。

つぎに，耳腺物質の構成にほとんど変異がないことに立脚して，Wittliff が北米産の *Bufo* 属の二つの種群（*B. cognatus* 種群，*B. americanus* 種群）に属する7種について報告した結果と本実験の結果を，ペーパークロマトグラム上のパターンによって比較してみる（表 4）。北米産の二つの種群に属する4種はすべて類似のパターンを示し，両種群間の相違点も Rf＝0.63 の位置だけで顕著にみられるにすぎないが，それらと本実験で得られた結果の間には明らかな相違がみられる。Rf＝0.56, 0.86, 0.91 の各位置でみただけでも，日本産のものは両種群とはかけ離れた系統に属することがうかがわれる。

一方，Low (1972) は本実験とは異なった手法を用いてイタリア産のヒキガエル（*Bufo bufo bufo*）の耳腺分泌物質のペーパークロマトグラムパターンを検討し，本実験の結果と同様に，イタリア産のヒキガエルも上記北米産諸種とは近縁でないという結論を得ている。このことから *Bufo bufo* は北米産の上記の二つの種群とは系統的にかけ離れていることが考えられる。このことは Martin (1972) の骨格の形状の研究からも支持されるところである。

もっとも，Low の用いたイタリア産のものを含むヨーロッパ産の原名亜種と日本産の亜種とを同一種（*Bufo bufo*）に属せしめることについては疑問がもたれており（Guttman, 1967; Martin, 1972），多くの角度からの再検討が必要である。

耳腺分泌物質の構成が同一個体群内でほとんど変異しないことが明らかになったこと，またその分析結果と骨格などの形態学的解析とが，種または亜種レベルにおける系統関係について一致した結論を導くことから，逆に耳腺分泌物質の構成が系統関係を反映している可能性は高まり，系統学の研究手段としてそれに一応の信頼性を認めることができる。したがって，微妙な地方変異の実体など，形態学的方法のみでは解明が困難な問題を研究するにあたって，耳腺物質の変異にもあわせて着目することは十分意

NII-Electronic Library Service

The Zoological Society of Japan

動物学雑誌 ZOOLOGICAL MAGAZINE 83: 96—98 (1974)

ゾウリムシの未熟期の長さにおよぼす紫外線照射の影響[1)]

高 木 由 臣

603 京都市 京都府立医科大学生物学教室

1973年5月24日 受領
1973年7月5日 再受領

The Effect of Ultraviolet Irradiation on the Period of Immaturity in *Paramecium caudatum*. YOSHIOMI TAKAGI (Institute of Biology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto 603).

ABSTRACT One of two exconjugants derived from the same conjugant pair was irradiated with 253.7 nm ultraviolet light (800 erg·mm^{-2}); the other was used as a non-irradiated control. The irradiation was performed on the exconjugant at the four macronuclear anlagen stage. The length of the period of immaturity was measured by the number of fissions between conjugation and the first appearance of mating reactivity. Eleven pairs of exconjugant clones were established. The difference of the length of the period of immaturity between UV-irradiated and non-irradiated clones was statistically significant ($P<0.01$) indicating a shortening effect of UV-irradiation. In another experiment in which UV-irradiation was performed on cells at the age of 20 fissions, a tendency to shorten the period of immaturity was recognized in UV-irradiated clones, although the difference between UV-irradiated and non-irradiated clones was not statistically significant ($0.05<P<0.10$). (*Zool. Mag. 83: 96—98, 1974*)

接合を終えたゾウリムシは，ふつう，未熟期と呼ばれる時期にはいる。未熟期とは，ゾウリムシが二分裂による増殖のみを行ない，接合能力をもたない時期である。これに続く，無性生殖と有性生殖がともに可能な時期を成熟期という。

Paramecium caudatum では，未熟期の長さは，温度や栄養条件の違いによる分裂速度の変化とは無関係に，主に接合後の分裂回数と関係した要因によって決められている。言いかえれば，速く分裂しようが遅く分裂しようが，原則として，ある一定の分裂回数を経ないことには成熟期に達しない (Takagi, 1970; Miwa and Hiwatashi, 1970)。*P. caudatum* の分裂速度は，1日当り0回～3.5回分裂の幅でコントロールできるが，これまでの実験では，1日1回分裂以下の速度で飼育した場合について検討が欠けていた。そこで分裂速度を極端に遅らせるため，接合を終えた細胞（4大核原基期の接合完了体）を，1) 4°C に，2) エサを与えないで，それぞれ15日間置いてみた。このような条件では，どちらも15日間に1回分裂するものがわずかに見られる程度で，ほとんど分裂しなかった。そのような処理をしたのちに，25°C・最適培養液という標準環境に移して飼育したものと，初めから標準環境下で飼育したものとの間で，接合完了体クローンの未熟期の長さを比較してみた。その結果は，どの場合もほぼ50回分裂という未熟期の長さを示し，やはり差はみられなかった（高木，未発表）。

分裂回数に関してこのように安定な未熟期の長さを，人為的に変えることに最初に成功したのは，東北大学の三輪ら (Miwa and Hiwatashi, 1970; 三輪, 1970) である。彼らは，接合後5～6回分裂時から20数回分裂時までの期間中，マイトマイシンC，その他のDNA複製阻害剤を含む培養液で飼育することによって，無処理の場合には約60回分裂という未熟期の長さが，約50回分裂に短縮されることを見出した。このような未熟期の短縮効果が紫外線の照射によってもひき起こされることがわかったので，ここに報告する。

材料は，*Paramecium caudatum*, syngen 3 に属する2つの株 Kok（接合型V）と Nks（接合型VI）の F_1 クローンである。Kok は愛知教育大学の伊東氏によって京都市内で採集され，Nks は高木が奈良市内で採集したものである。

培養液は，生レタスしぼり汁を，Dryl の溶液 (Dryl, 1959) で約2.5%に溶かしたもの (pH=7.0) に，*Aerobacter aerogenes* を接種して 25°C で一晩 incubate したもの (Hiwatashi, 1968) を用いた。

紫外線の照射には，東芝GL-15殺菌灯 (λ: 253.7 nm) を用い，線量の測定には Ultra-Violet 社の

1) 文部省科学奨励研究費によった。

NII-Electronic Library Service