

【教育実践報告】

両生類を用いた発生と再生の実験手技

I. 飼育方法と採卵方法

有泉高史

要約

両生類は四足動物の進化の歴史の原点に位置しており、卵から親への発生の過程はわれわれヒトの発生とも共通する部分が多い。また、イモリやサンショウウオのような尾をもつ両生類は再生力が非常に高く、手足や尾を失っても数か月あればもとの姿を取り戻せる。こうした特徴を備えた両生類は、動物の発生や再生の仕組みを明らかにするためのモデル動物として、古くから発生学の分野で用いられてきた。両生類を使って発生や再生の実験を行うには、適切な方法で飼育して受精卵を確実に得る必要がある。本稿では数種の代表的な両生類について、入手から飼育、繁殖、採卵に至るまでの方法を、筆者が独自に改良した点を含めて解説する。彼らの生活史を十分に理解し、観察や実験の目的に合った種類を選べば、本稿で紹介する両生類たちは実験材料や学習教材として大いに役立つであろう。

キーワード：両生類、発生、再生、飼育、採卵

1. はじめに

両生類（両生綱）Amphibiaは、ミミズのような姿をしたアシナシイモリの仲間（無足目Gymnophiona）を除けば、尾があるかないかで二つの仲間に分けることができる。イモリやサンショウウオのように尾のあるものが有尾目Urodela、尾のないカエルたちが無尾目Anuraである。尾で泳ぐのは得意だが肢で歩くのが苦手な有尾目が原始的で、尾が無くて発達した後肢で跳ねまわる無尾目が進化した両生類とも言える。しかし、どちらの両生類もヒトへと続く四足動物の進化史の原点に位置していることに違いはない。体の基本構造はヒトと変わりなく、体の中の器官も相同である。卵から親への発生の過程もヒトとの共通性が見られ、体づくりに関わる遺伝子の種類や発現順序もよく似ている。こうした共通性がゆえに両生類は古くから発生学の重要な研究対象となってきた。また、卵や胚が比較的大きく、体外で発生するために観察しやすいなど、両生類は高等学校「生物」の動物の発生の単元でも、無脊椎動物のウニとともに二大教材として扱われてきた。その学習内容は、スーパーマンによるオーガナイザーの発見や、フォークトの局所生体染色法による原基分布図の作成といった古典的な研究から、誘導物質の発見、未分化細胞からの臓器形成、発生における遺伝子発現の調節など最新の研究にまで及んでいる。

今日では分子生物学の目覚ましい進歩によって、さまざまな生命現象が遺伝子の言葉で語られるようになった。両生類の発生についても、発生過程で発現する遺伝子が次々に単離・同定され、その働きが明らかになってきている。こうした分子生物学的な手法を中心に解説した専門書は数多く出版されている。しかしながら、実験動物の採集にはじまり、飼育方法、観察方法、卵や胚に対する実験手技など、実験や観察の基礎となる内容を解説したものは少ない（石原1980；石原・山上1983a, 1983b）。そこで、これから両生類を使って発生の研究を始める学生や理科教員を対象とした手引書をまとめることにした。第一回目の本稿では、実験材料に用いられている数種の両生類（図1）について、入手方法、飼育方法、繁殖および採卵方法を、筆者が独自に改良した点を含めて解説する。

無尾目の代表は何と言ってもアフリカツメガエル*Xenopus laevis*であろう。カエルの中では最も原始的な仲間だが、実験室での飼育方法や繁殖方法はすでに確立されている（斎藤1983；Green 2009）。発生の研究分野では、「両生類」と「アフリカツメガエル」が同義語であるかのような極めて重要な存在になっている。また、近縁種のネッタイツメガエル*Xenopus (Silurana) tropicalis*は一世代がアフリカツメガエルよりも短く、ゲノムが既に解読されているため最近とくに注目されているツメガエルの仲間である。本稿では、研究材料や教材

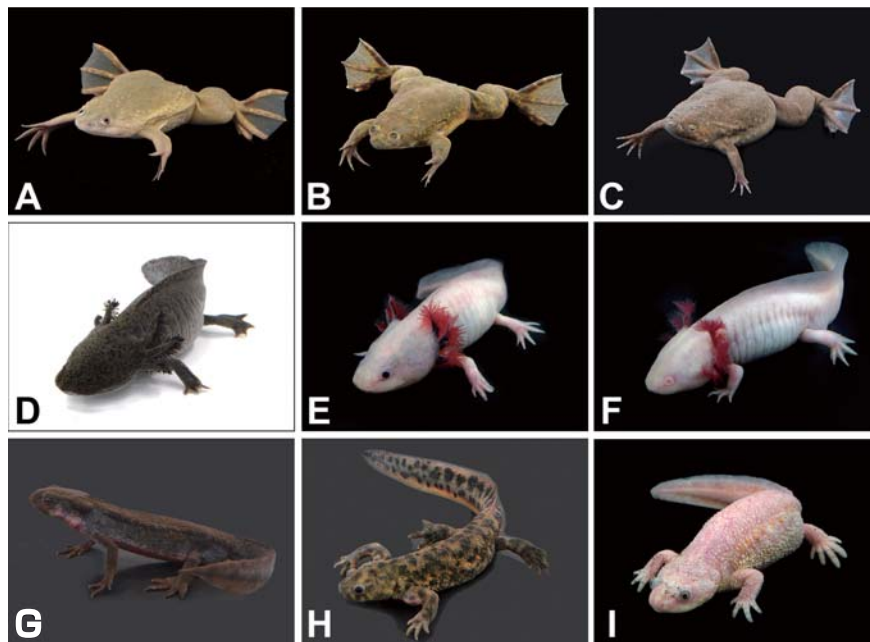


図1 発生や再生の研究に用いられるおもな両生類

- A) アフリカツメガエル。大型のツメガエルで、さまざまな分野で実験動物として用いられている。染色体数36の偽4倍体であるため、遺伝学的な解析には向かない。
- B) キタアフリカツメガエル。アフリカツメガエルよりも小型で動きが鈍く、雄は「カチカチカチ……」と金属音で鳴く。染色体数は36でアフリカツメガエルと同じく偽4倍体。
- C) ネットイツメガエル。その名の通り高い水温を好む。性成熟が早く、染色体数 $2n=20$ の2倍体であり、ゲノムも解読されているため、遺伝学的な解析に適している。
- D) 野生型のアホロートル。野生のアホロートルと同様に全身が斑模様になっている系統。全身が黒いものは黒変種でブラック（商品名）と呼ばれる。
- E) 白変種のアホロートル。「ウーパールーパー」のキャラクター名で一世を風靡したのがこの系統。全身が白色または薄ピンク色で眼が黒い。
- F) アルビノのアホロートル。色素がないため体が白く、眼も白い。黄色味がかった体色のものはゴールデン（商品名）と呼ばれる。
- G) アカハライモリ。発生の優れた研究材料だが、再生能力が非常に高いため、再生の研究にも用いられる。
- H) 野生型のイベリアトゲイモリ。全長30 cmにもなる大型の水棲イモリ。非常に丈夫で飼育や繁殖も容易なため、研究材料や学習教材としての利用価値が高い。
- I) 白変種のイベリアトゲイモリ。国内で繁殖させたCB個体には、この写真のような白い個体も出回っている。両生類を専門的に扱っているペットショップや愛好家から入手できる。

としての利用価値の高いネットイツメガエルやキタアフリカツメガエル *Xenopus borealis* も含めたツメガエル類をはじめに取り上げる。

有尾目の両生類としては、アカハライモリ *Cynops pyrrhogaster*、アホロートル *Ambystoma mexicanum*、イベリアトゲイモリ *Pleurodeles waltli* の3種を取り上げる。いずれも受精卵の直径が2 mm 前後あるため、発生過程を観察したり実験操作を加えたりするには、ツメガエル類（受精卵の直径は1 mm かそれ以下）よりも都合である。また、胚が比較的ゆっくりと発生し、孵化までに2週間程度を要することも観察にとっては都合がよい。そして、何よりもこれらの有尾目の研究材料としての重要性は再生能力の高さにある（Armstrong and Malacinski

1989）。3種とも剥がれた皮膚などは当然のこと、切断された手足や尾も数カ月でもと通りの大きさと形に再生できる。アカハライモリに至っては、眼のレンズ、心臓や脳の一部を失ったとしても完全に再生することができる。より進化した両生類であるカエル類（無尾目）は、有尾目に比べて再生能力が低く、失った手足をもと通りに再生することはできない。そうした違いを明らかにするには、無尾目と有尾目のいずれか一方だけではなく、両者を比較しながら研究していくことも重要である。

日本は国土の大部分が温帯に属しており、広さの割には数多くの種類の両生類が生息している（日高1996；前田・松井1999；奥山・松橋2002；内山ほか2002）。有尾目の宝庫であり、特別天然記念物に指定されているオ

オサンショウウオと18種の小型サンショウウオ、3種のイモリの計22種が生息している。無尾目のカエルの種類はさらに多く、43種（5亜種を含む）のカエルが北海道から南西諸島までの日本各地に分布している。ところが近年では、開発による生息環境の変化、酸性雨、カエルツボカビ症などさまざまな要因で日本の両生類の数や生息範囲は減少してきている。そのような状況では、地域的な絶滅を招くような大量採集は、たとえ研究目的であっても決して許されることではない。その一方で、日本の両生類がもつ研究材料や教材としての優れた価値を理解し、彼らを守っていくには産卵期や産卵場所、産卵数、卵の特徴などを知ることが必要であろう。そのため、本稿では発生学の研究材料に用いられてきた日本の両生類のうち、おもに東日本（北海道を除く）に分布する数種についても解説する。

2. アフリカツメガエル *Xenopus laevis*

ツメガエル類は無尾目の中で最もポピュラーな研究材料である。ピバ科Pipidaeに属する原始的なカエルの仲間、卵からオタマジャクシ、さらにカエルまでの一生を通して水中で過ごす。扁平な体の表面には魚のように側線器官があり、水中のわずかな振動も感知できる（長坂・池田1996；海老沼・川添2006）。一般的なカエルと違って舌をもっておらず、両手でかき込むようにして餌を食べる。飼育は日本にいるカエルなどに比べて遥かに容易で、ハエやコオロギなどの生餌を用意する必要はなく、熱帯魚用の人工飼料や鶏レバーを与えて育てることができる。

ツメガエル類のうち発生の研究分野で用いられているものは、アフリカツメガエル*Xenopus laevis*、キタアフリカツメガエル*Xenopus borealis*、ミューラーツメガエル*Xenopus muelleri*、ネッタイツメガエル*Xenopus (Silurana) tropicalis*などである（図1A-C）。その中で最も一般的なものはアフリカツメガエルで、養殖業者から購入することができる。アフリカツメガエルは学習教材としても重要で、高等学校「生物」の教科書ではイモリやヒキガエルと並んで脊椎動物の発生の代表例として取り上げられている。

ツメガエル類の多くは偽4倍体（異質四倍体）と呼ばれる染色体構成をもつ。アフリカツメガエル、キタアフリカツメガエル、ミューラーツメガエルはいずれも36本の染色体をもっており、ゲノムの解析や遺伝学的な研究には不向きとされてきた。これに対して、ネッタイツ

メガエルの染色体数は $2n=20$ であり、ツメガエル類では唯一の2倍体として注目されている。次世代を残せるようになるまでの性成熟の期間が半年～1年と短く、ゲノムが既に解読されているなど、研究材料としての利用価値が極めて高いツメガエルである。

(1) 入手方法と飼育方法

ツメガエル類は資料1に挙げた養殖業者などから購入することができる。業者によっては、キタアフリカツメガエルやネッタイツメガエルも取り扱っている。また、アフリカツメガエルについても、野生型Wild-type、アルビノAlbino、純系（北大J系統）、近交系など各種の系統を入手でき、それらの幼生や変態直後の子ガエルも販売している。雌雄を交配させて受精卵を得る場合や人工授精を行う場合には、雌が80 g（体長9 cm）以上、雄が50 g（体長7 cm）以上の成熟個体を入手する。図2Aにアフリカツメガエルの雌雄の見分け方を示したが、これは他のツメガエル類にも当てはまる。両生類全般に対して言えることだが、同一年齢では一般的に雌の方が雄よりも大きい。雌の総排出腔には突起があり、産卵の際には充血して赤くなる。雄の総排出腔の突起は小さいが、雄は雌に比べて前肢が太く、その内側が黒くてざらついている。これには雌に抱接する際の滑り止めとしての役割があり、発情した雄では黒さとざらつきが増す。また、頭部を真上から見ると、やや角張っていて鰓が張った感じ（実際には鰓はないが）になっている。

入手した個体は、自然に抱接や産卵することはほとんどないので雌雄を分けて飼育する必要はない。体が大きいため、大型の水槽やコンテナボックス、風呂おけ、衣装ケースなどで飼育する。止水を好むうえに非常に水を汚すので、ろ過装置は不要であり、取り付けたとしても効果は期待できない。図3Aに、100 Lの大型コンテナボックスを用いた飼育例を示した。底面に栓を取り付けて排水口までホースをつなぎ、水換え作業の軽減を図っている。いずれにしても、まとまった数のアフリカツメガエルの飼育には、それなりの場所と労力を必要とすることを覚悟しなくてはならない。水温は18～22℃くらいが適温であり、受精卵を得るには夏場の水温の上昇を抑えなければならない。また、冬場にはヒーターとサーモスタットを使って、水温の低下を防ぐことも重要である。

キタアフリカツメガエルやネッタイツメガエル（いずれも体長5～6 cm）はアフリカツメガエルよりも体小さいので、小型の水槽でも飼育できる。アフリカツメガエルと同様にキタアフリカツメガエルも18～22℃くら

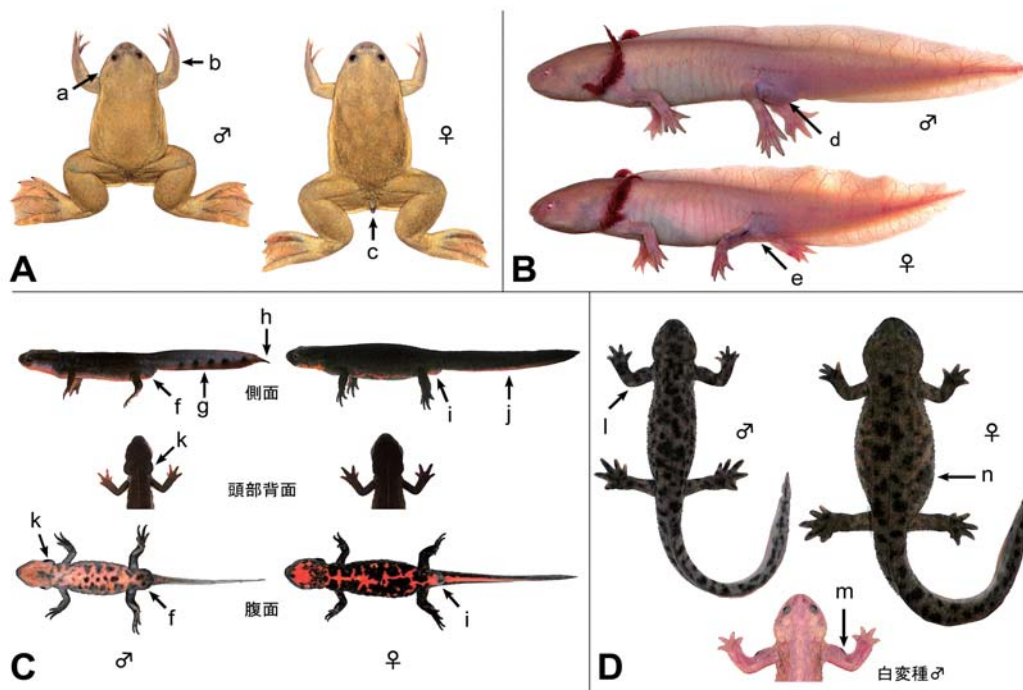


図2 両生類の雌雄の見分け方

- A) アフリカツメガエルは雄よりも雌の方が大きい。雌の総排出腔には突起 (c) があり、産卵の際には赤く充血する。雄の前肢は太く (b)、発情すると内側が黒くなってざらつく。雄の頭部は雌の頭部よりも角張っている (a)。
- B) アホロートルの雄は雌よりも体が細長く、全長に占める尾の割合が大きい。雄の総排出腔の周囲は大きく膨らんでいる (d)。雌は尾が短く、総排出腔の膨らみも小さいが (e)、胴が太くて丸みを帯びている。
- C) アカハライモリの雌は雄よりも大きい。雌は尾が細長く (j)、総排出腔のまわりの膨らみが小さい (i)。繁殖期の雄は、総排出腔の周囲が大きく膨らみ (f)、頭から尾までの体側に鮮やかな青紫色の婚姻色が現れる。雄の尾は幅が広いが (g)、先端部は急に細くなっている (h)。雄の頭部は雌の頭部よりも角張っている (k)。
- D) イベリアトゲイモリの雄は尾が長く、雌よりも体が細長い。雄の前肢は発達していて、いかり肩のような姿をしており (l)、内側には黒い婚姻瘤 (m) がある。雌の胴は太くて丸みを帯びている (n)。



図3 アフリカツメガエルの飼育

- A) コンテナボックスを使った成体の飼育。容量100 Lのコンテナボックスに栓と排水ホースを取り付ける。水の量が70 Lの場合、30匹程度のカエルを飼育できる。餌は週に1~2回、底棲肉食性の熱帯魚用の人工飼料を与える。
- B) 幼生の飼育方法。孵化後4~5日経つと、幼生の頭部は扁平になり、活発に泳ぎ回るようになる。この頃から毎日、薄めた青汁を与えると、2~3カ月で変態してカエルになる。飼育容器の底に土を敷いておくと、水の交換は月に1~2回で済む。変態を始めた幼生は別容器に移し、濡れないように水を浅くする。変態を完了するまでは餌を与えず、変態後は冷凍赤虫を与える。

い水温が適しているが、ネットイツメガエルは水温を25~27℃に保つ必要がある。いずれのツメガエル類も十分な量のカルキ抜きした水で飼育するなどの基本的な事項を守りさえすれば飼育そのものは容易である。餌としては鶏や牛の肝臓片（レバー）が理想的であるが、飼育水が非常に汚れるため、底棲肉食性の熱帯魚用の人工飼料を与えるとよい。週に2回、いずれも10分程度で食べきる程度の量が適量である。餌を与えた翌日には水換えを行い、病気や衰弱した個体を見つけた場合には、他のカエルから隔離して適切な処置を施す（<http://www.fwu.ac.jp/~yuge/manual.html>）。

(2) 幼生の飼育方法

ツメガエル類の幼生は、体が透明で、頭は平たく、ナマズのような細長い触角をもっているなど、いわゆるオタマジャクシとはかけ離れた姿をしている。日本で普通に見られるオタマジャクシの多くは雑食性であるが、ツメガエル類のオタマジャクシは完全な草食性である。野外では藻や植物プランクトンなどを食べていると思われるが、飼育下では大麦若葉の粉末を水で溶いた「青汁」で育てることができる。

タッパーや水槽に深さ5~6 cmのカルキ抜きした水を入れ、その中に少量の土（畑の土や花壇の土）を入れておく（図3B）。土に含まれる微生物が天然のフィルターの役目を果たしてくれるので、半月くらいは水を換える必要がない。餌となる青汁は毎日与えるが、濃い青汁を少量加えて、飼育水がうっすらと緑色になるくらいが適量である（数時間で水が透明になる）。半月して水が汚れたら、水と土を新しいものと交換する。

アフリカツメガエルやキタアフリカツメガエルの場合、水温を20~22℃に保てば2~3ヶ月で変態するが、中には半年経っても変態しない個体もある。ネットイツメガエルの場合は水温を25~27℃に保つ必要があるが、早ければ1ヶ月程度で変態を始める個体も出てくる。前後の肢が生えて頭の幅が狭くなってきたら、幼生を別の容器に移して変態が完了するのを待つ。このとき、水の深さは幼生の体がかろうじて浸かるくらいに浅くして溺れないようにする。また、変態が完了するまでは水が汚れるだけなので餌は一切与えない。尾が消える頃から餌を食べるが、すでに草食性から肉食性に変わっているため、冷凍赤虫や鶏レバーなどを与える。初めのうちは小さく刻んだものをごく少量与え、徐々にその量を増やしていく。餌の食べ残しや排泄物のために死にやすいので、餌を与えて数時間後には必ず水を交換する。

(3) 採卵方法

受精卵を得るにはhCG（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン、入手方法と調製方法は資料2を参照）を注射した雄と雌を一緒にして、抱接から産卵、受精までを行わせるペアリング法がある。この方法では、数時間にわたって産卵が続くため、いろいろな発生段階の胚を得ることができる。一方、同じ発生段階の胚を数多く集めて観察や実験を行う場合には人工授精が有利である（山崎1989；小針1996）。人工授精法では、hCGを注射して排卵を誘発した雌から未受精卵を絞り出し、雄の精巣から取り出した精子で体外受精させる。一回の受精で生じたすべての受精卵の細胞分裂（卵割）は同期している。そのため、若い胚（受精卵~32細胞期胚）に対して割球の除去や移植などの実験操作を加えたり、特定の割球に遺伝子や蛍光色素などを顕微注入（マイクロインジェクション）したりする場合に用いられる。

1) ペアリング法

プラスチック製の四角い水切りバット（カゴとフタがセットになったもの）を用意する（図4B）。バットの半分くらいの深さまで水を入れてカゴをセットする。水は真水ではなく、10 Lに対して塩を15 g溶かした塩水を用いる。塩水中では卵を包んでいるゼリーの粘性が低下するため、カゴから受精卵が落ちてバットの底にたまる。そのため、親によって卵が攪拌されたり、捕食されたりするのを防ぐことができる。

ペアリング法では、雌雄の発情のタイミングを一致させることが重要である。雌雄に対して同時にhCGを注射すると、雌が先に卵を産み始めてしまい、受精のタイミングを外すことが多い。これを防ぐには、あらかじめ雄に半分量のhCGを注射しておくこととよい。10000単位のhCG粉末に対して付属の生理食塩水（哺乳類用の0.9%で構わない）を5 mL加えて、2000単位/mLの濃度のhCG溶液を調製する。6時間前まで（数日前でも可）に雄に200~300単位（0.1~0.15 mL）のhCGを注射しておく。雌に対して全量、すなわち400~600単位（0.2~0.3 mL）のhCGを注射する際に、雄には残りの200~300単位を注射する。図4Aに示したように、一方の手でカエルが暴れないように保持し、他方の手で注射する。ツメガエル類の皮膚には側線器官あり、この部分で皮下の筋層とつながっている。大腿部の皮膚に針を刺して、側線器官の下を潜るようにして背中下の皮下に針先を到達させれば、注入したhCGは背中に留まって確実に作用できる。注射を終えた雌と雄を一緒になると、数時間後には

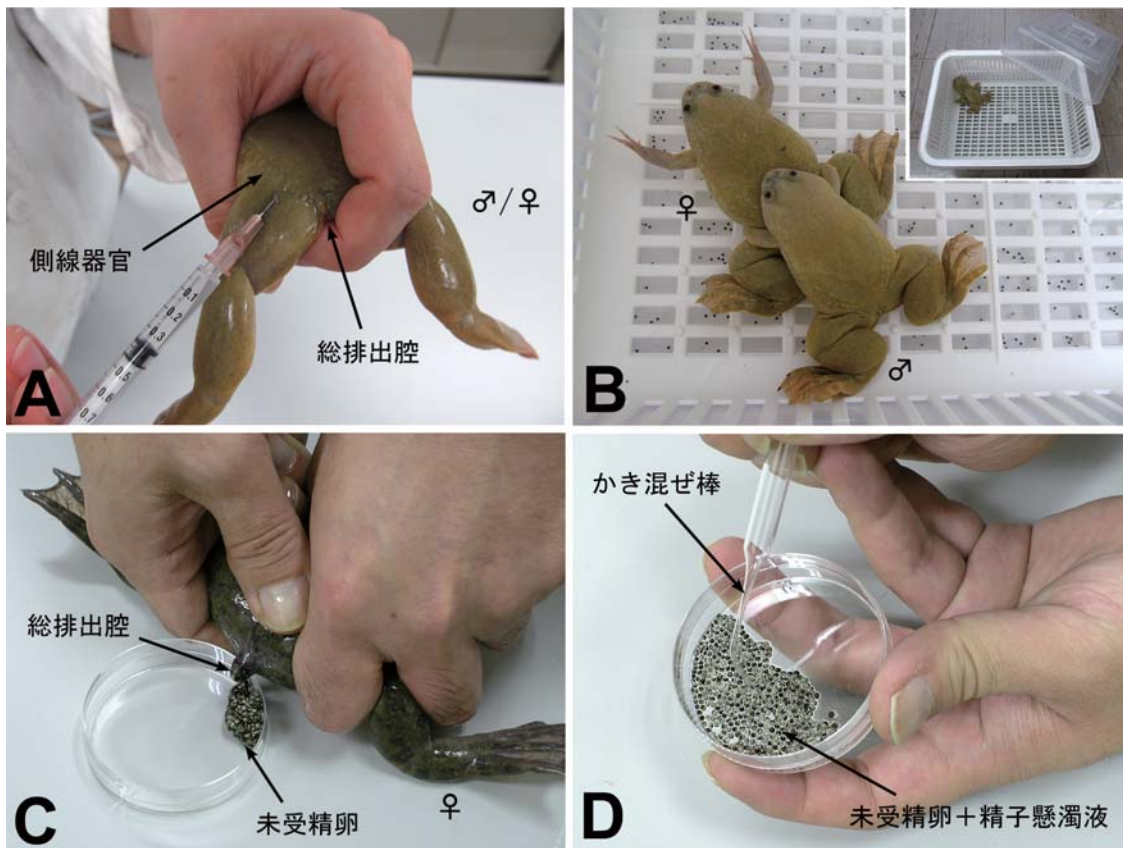


図4 アフリカツメガエルの採卵方法

- A) hCGの注射方法。大腿部から針を入れ、大腿部と背中との境目にある側線器官の下を横切るようにして皮下注射する。注入されたhCGは背中下の皮下に留まるので確実に作用できる。
- B) ペアリング法。水切りバットに塩水(1.5g/L)を半分の深さまで入れ、カゴをセットする。hCGを注射した雄と雌を入れてフタをする。およそ12時間で産卵が始まり、体外受精した卵はカゴから落ちてバットの底にたまる。
- C) 未受精卵の採取。hCGを注射しておいた雌を写真のように保持し、腹部と臀部を押すように軽く絞って未受精卵をシャーレに取る。
- D) 人工授精法。かき混ぜ棒を使って未受精卵が一層になるように広げてから、精子懸濁液を2~3滴たらす。再度、かき混ぜ棒を使って卵全体に精子懸濁液を行き渡らせる。2分後にカルキ抜きした水を加えると受精が完了して発生が始まる。

雄が雌を抱接する。水温が20℃の場合、雌は注射の約12時間後から産卵を始める。産卵を始めるまでの時間は水温によって左右され、特に注射直後の水温の影響が大きい。早く産ませたい場合にはお湯を加えて25℃位に温め、逆に産卵を遅らせたい場合には水を入れて16℃位に冷やすと効果的である。

水切りバットの底に産み落とされた卵は、写真フィルムやクリアファイルの切れ端などを使って静かにかき集め、スポイトで吸って別の容器に移す。容器に卵を入れすぎて酸欠にならないようにする。いくつかの容器に小分けして16~25℃の範囲内に保てば、さまざまな発生段階の胚を観察することができる。

キタアフリカツメガエルの場合は上述のアフリカツメガエルの方法が使えるが、体が小さいのでhCGの量は半分程度にする。ネツタイツメガエルではhCGの量を

減らし、水温を25~27℃に保つ必要がある。ネツタイツメガエルの産卵の様子はアフリカツメガエルやキタアフリカツメガエルとは異なっている。雌雄が抱接したまま仰向けになり、さらに逆立ちをして総排出腔を真上に向けながら卵をばらまくようにして産卵する。

2) 人工授精法

受精を行う10~12時間前に、雌に対して400~600単位のhCGを注射する。数時間後には総排出腔の突起が充血して赤くなる。雄には数日前にhCGを100~200単位ほど注射して発情を促しておく。雄をMS-222溶液(組成は資料3参照)に入れて麻酔する。15分ほどして完全に動かなくなったことを確認してから、開腹して一方の精巣を摘出し、傷口の筋層と皮膚をそれぞれ縫合する。このようにすれば、後日、もう一方の精巣を摘出して用

いることが可能である。雄を殺す場合は、頭の後ろの部分で脊髄を切断して精巢を摘出する。いずれかの方法で摘出した精巢を、FBS（牛胎児血清）を10%の濃度になるように溶かしたDeBoer液（DB液、組成は資料3を参照）に移す。これを冷蔵庫で保管すれば精巢内の精子は1~2週間は保存可能である。

1.5 mLマイクロチューブ（エッペンドルフ・チューブなど）に半分に切った精巢を入れ、0.5 mLのDB液を加える。眼科用の細細バサミを使ってチューブ内の精巢片を細かく刻む。これを15 mLコニカルチューブ（ファルコン・チューブなど）に入れた10 mLのDB液に薄い乳白色になるまで加えて精子懸濁液とする。作製した精子懸濁液は人工授精に用いるまでは氷上で保管する。

図4Cのように両手を使って雌を保持しながら、腹部や臀部を押すと総排出腔から未授精卵が出てくる。総排出腔を60 mm滅菌プラスチックシャーレに向けて、未授精卵を軽くなすり付けるようにして受け止める。一枚のシャーレに入れる卵の数は50~100個程度とし、カエルの体に付着した水滴などが入らないように注意する。かき混ぜ棒（パスツールピペットの先端を火で炙って丸くしたもの）を使って、シャーレの底に未授精卵が一層になるように広げる。これにパスツールピペットを使って精子懸濁液を2~3滴かけて、懸濁液がすべての卵に行き渡るようにかき混ぜ棒で静かに混ぜる（図4D）。この状態で2分ほど待ってから、シャーレを少し傾けてカルキ抜きした水を上方から静かに加える。続いてシャーレを水平して、卵が浮かないように気を付けながら、シャーレの半分くらいの深さまで水をさらに加える。23℃ではおよそ1時間半後に第一卵割を始める。

精子懸濁液の精子は、カエルの体液とほぼ等しい濃度0.64%の生理食塩水中に置かれており（資料3、DeBoer液の組成を参照）、鞭毛運動は抑制されている。未受精卵に滴下した後に水を加えたことによる塩濃度の低下が引き金となって鞭毛運動が始まる（Moriya 1976; 山崎1989）。その結果、精子が未受精卵にたどり着いて受精する。受精が成立すると、卵とそれを包んでいる卵膜との間に囲卵腔と呼ばれる隙間が生じる。いろいろな方向を向いていた卵は定位回転を行い、卵黄を多く含む重い植物半球を下に向け、色素を多く含んだ黒っぽい動物半球を上に向ける。オセロゲームではないが、真上から見たときの白黒の割合を見れば、およその受精率を知ることができる（黒が受精した卵である）。

3. アカハライモリ *Cynops pyrrhogaster*

日本には、アカハライモリ *Cynops pyrrhogaster* とシリケンイモリ *Cynops ensicauda*、そしてイボイモリ *Tylotriton andersoni* の2属3種のイモリ類が生息している。その中でもアカハライモリ（図1G）は、古くから発生や再生の研究材料として用いられ、脊椎動物の発生の学習教材としても重要な位置を占めてきた。アカハライモリは北海道と南西諸島を除く日本各地に広く分布し、かつては平野部の水田や用水路でもごく普通に見られたという。今日では宅地開発や水田の圃場整備が進み、ほとんど見つけることのできない両生類になってしまった。山間部の水田や沼などには今でもかなりの数が生息しているが、地域的な絶滅が進行して分布範囲は確実に狭まっている。ここでは、アカハライモリの採集方法も紹介するが、研究の名のもとに大量に採集するような行為は厳重に慎むとともに、研究や観察に使ったイモリやその子孫は本来の生息地に戻さねばならない。

(1) 採集方法

アカハライモリは水田や用水路、溜池、釣り堀など止水または水の流れが緩やかな場所を好む。図5C、Dは筆者が20年以上前から通いつけている東北地方内陸部の採集地である。この地域は日本有数の豪雪地帯で、山間部に小規模の水田が点在している。アカハライモリは冬場になると、深い淀みに集まって集団で越冬するため（これを“イモリ玉”と呼ぶ、図5B）、冬でも水が枯れることのない用水路などは恰好の越冬場所となる。背後には落葉広葉樹が生い茂った小高い山があり、それと反対側にある川とは道路で隔てられている。また、等高線を見ればわかるように道路や川の傾斜が少ない（図5E）。これは、大雨などで流される危険性が少なく、水の流れが緩やかで落ち葉が堆積しているなど、越冬に適した場所であることを意味している。こうした場所では、晩秋の頃になればまとまった数のイモリを捕獲できる（図5A）。

受精卵を得るためにイモリを採集する場合は、彼らの生殖方法を知っておく必要がある（図6）。図2Cにはアカハライモリの雌雄の見分け方を示した。繁殖期の雄のイモリには婚姻色が現れ、頭から尾までの側面が鮮やかな青紫色になる。雄は雌の進路をふさぐように立ちはだかり、雌の鼻先で曲げた尾を小刻みに震わせ、総排出腔内の毛様突起からソデフリンと呼ばれるフェロモンを放出する。雌がこれに反応して雄の後を歩き始めると、雄

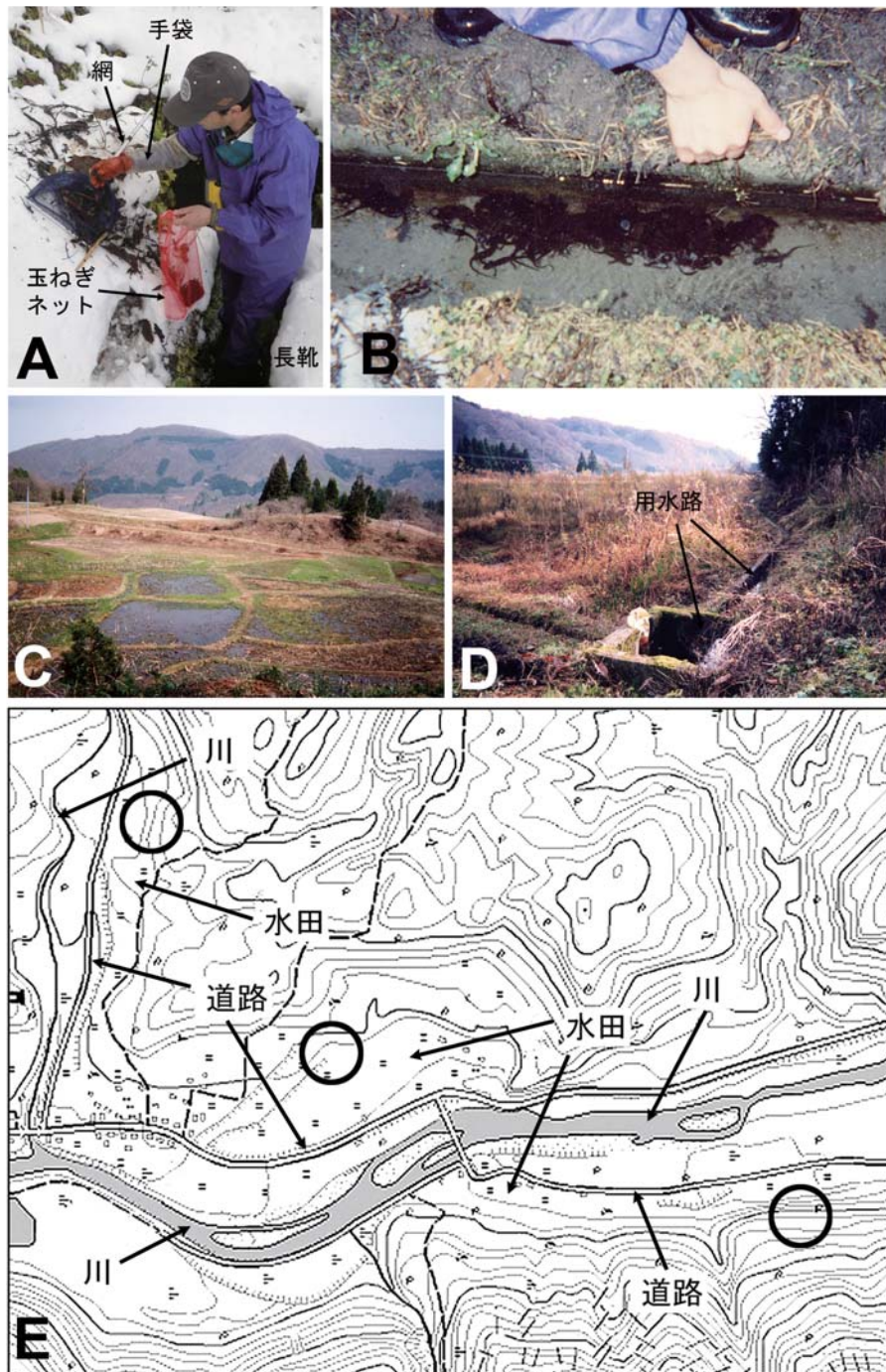


図5 アカハライモリの採集方法

- A) イモリの採集用具。丈夫なタモ網（枠が四角いもの）、長靴（膝上までであるとよい）、手袋（肘の上まで覆うものがよい）、玉ねぎネット（野菜収穫用のネット）、発砲スチロール箱、保冷剤、雨具など。
- B) U字溝の中で集団越冬するイモリ。このような集団は「イモリ玉」と呼ばれ、数百匹のイモリが集まることもある。越冬場所の堆積した落ち葉の中に潜っていることが多いため、この写真のようなイモリだけの塊を見かけることは少ない。
- C) イモリの繁殖場所の例。写真のような山間部の棚田では、春～初夏にかけて雄から雌への求愛行動が至るところで観察できる。山形県大江町。
- D) イモリの越冬場所の例。用水路の落ち葉が堆積した深みに集まって、11月下旬～翌年4月上旬まで越冬する。山形県小国町。
- E) イモリの越冬場所の地理的条件。氾濫を起こす可能性のある川は道路で隔てられている。背後の山には落葉広葉樹が生い茂り、用水路には落ち葉が堆積している。傾斜がほとんどないので、用水路の水の流れは緩やかである。イモリはこのような条件が揃っている場所（図中の○で示した場所）で集団越冬する。

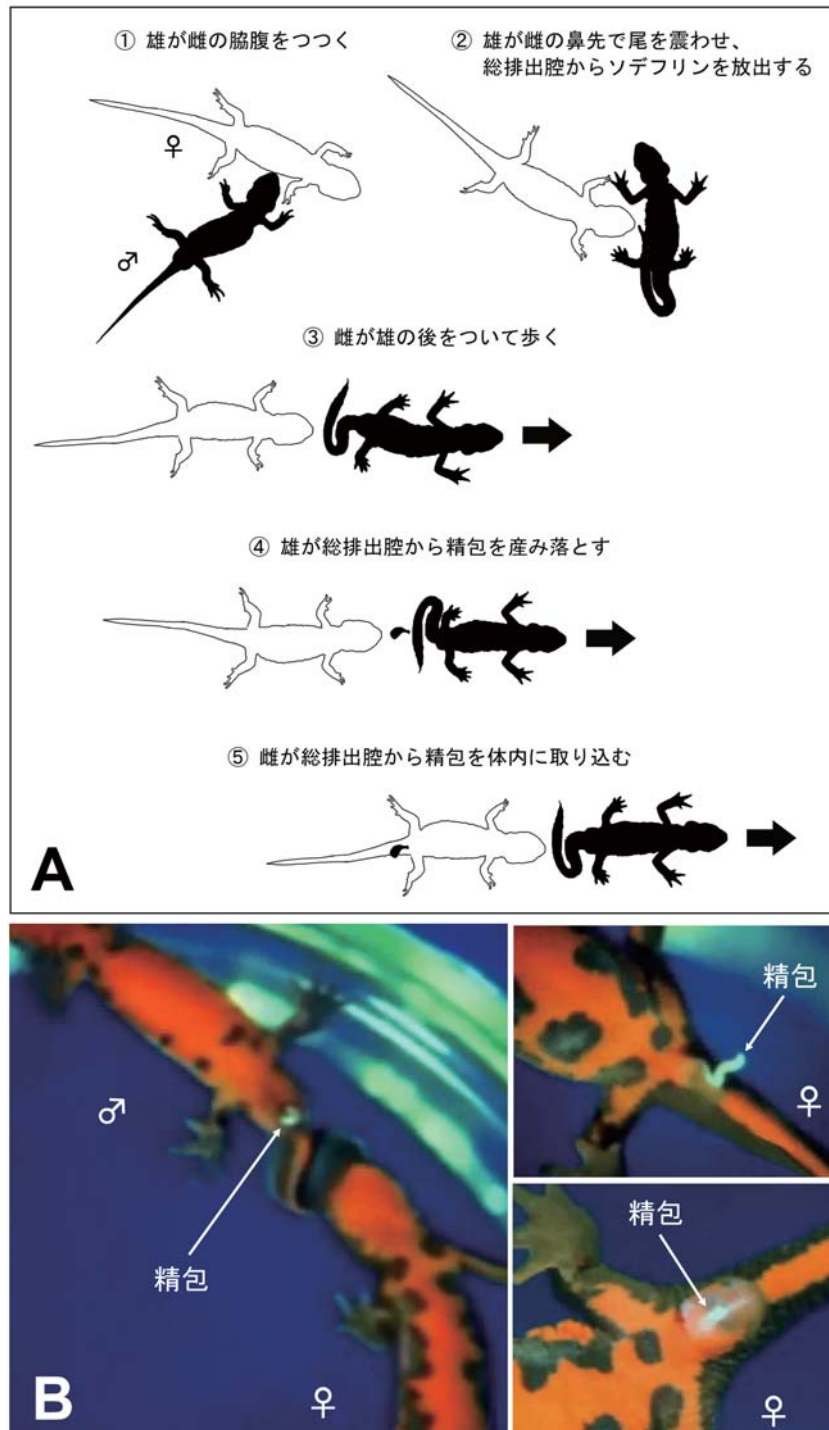


図6 アカハライモリの求愛行動

- A) 求愛行動は①～⑤の一連の行動から成り立っている（黒いイモリは雄、白いイモリは雌を示す）。どれか一つでも欠けると、受精や産卵には至らない。①雄が雌に近づき、鼻先を雌の体に押しつける。②雄は雌の進路をふさぎ、雌の鼻先で盛んに尾を震わせる。このとき、雄の総排出腔内の毛様突起からソデフリンと呼ばれるフェロモンが放出される。③求愛を受け入れた雌が鼻先で雄の体をつつくと、雄は尾を曲げて前進し、雌はその後をついて歩く。④雌が鼻先で雄の尾をつつくと、雄は尾を持ち上げて総排出腔から精包を産み落とす。⑤雌は精包の上を通り過ぎる際に、総排出腔の周囲を伸ばして精包を体内の貯精のうに取り込む。
- B) 求愛行動を行っているイモリを真下から撮影した写真。雄は総排出腔から白い精包を放出する。雌が雄の後をついて歩く際に、雌の総排出腔に精包が付着し、内部の貯精のうへ取り込まれる。

は総排出腔から精子の入った精包と呼ばれる袋を落とす。雌は精包を総排出腔内の貯精のうに取り込み、一種の体内受精を行いながら受精卵を一つずつ水草などに産み付けていく（日高1996；豊田・菊山2003；松井2005）。このような生殖行動が4月から7月上旬までの産卵期と秋頃に行われている。春から初夏の産卵期には直ちに受精卵が産み付けられるが、秋に雌の体内に取り込まれた精包は翌年の産卵期に使われる。したがって受精卵を得るのが目的であれば、体内に精包を取り込んだ雌を産卵期か越冬前の晩秋の時期に採集し、実験室に持ち帰って産卵させればよい。

採集したイモリは玉ねぎネット（野菜の収穫用ネット）に入れて実験室に運ぶ（図5A）。イモリが入ったネットを軽く湿らせた状態で発泡スチロール箱に入れ、冷蔵指定の宅配便を利用して実験室へ輸送する。ネットにイモリを押し込むため残酷な感じもするが、水の入った容器に入れて輸送するよりもはるかに優れており（溺死することがない）、2〜3日程度であれば衰弱させることなく安全に輸送できる。なお、アカハライモリの皮膚からはフグ毒のテトロドトキシンとよく似た成分が分泌されている。イモリを素手で触ったあとは手をよく洗って、毒液が目や傷口などに入らないよう十分に注意する。

(2) 飼育方法と越冬方法

春先に採集したアカハライモリは産卵できる状態にあるため、速やかに受精卵を産ませて観察や実験を行う。産卵後のイモリは、深さ5 cm程度の汲み置き水を入れた水槽やコンテナボックスで飼育する。餌として冷凍赤虫、細かく刻んだ鶏や牛のレバー、底棲肉食性の熱帯魚用の人工飼料などを週に1〜2回程度与える。イモリは大変な大食漢であり、非常に水を汚すので、餌を与えた翌日には必ず水を換える。

晩秋に採集したイモリは、冬眠を継続させ、必要に応じて冬眠から覚まして産卵させる。越冬させる場合には、できるだけ自然の状態に近い屋外で行うとよい。雑木林で集めた落葉を堆積させた深い水の中にイモリを入れて越冬させる。短期間であれば、タッパー（水深約10 cm）にイモリを入れて冷蔵庫で保管し、水温は8℃を保つようにする（図7A）。これは筆者が前述の東北地方の越冬場所の水温を毎年計測し、越冬に適した水温と結論した値である。8℃ではイモリが完全には寝ていないため、食べ残しが出ない程度の量の冷凍赤虫を週に1回与える。また、飼育水を真水ではなく0.3〜0.6%の食塩水にすると、体重の減少とカビなどの病気の発症を抑える

ことができる。

アカハライモリの胚は水温を20℃に保てば、受精から2週間ほどで孵化する。しばらくは卵黄に含まれる栄養で育つので餌を与える必要はない。孵化後1週間くらいしてから、ブラインシュリンプ（アルテミア *Artemia*）の乾燥卵を塩水中で孵化させて与える。水1 Lに対して塩を20〜25 gの割合で溶かした塩水に乾燥卵を入れ、水温を28℃に保ってエアレーションすれば翌日に生きたブラインシュリンプが得られる。ブラインシュリンプが入った塩水をコーヒー用のペーパーフィルターで濾せば、ブラインシュリンプを一気に集めることができる。これを毎日与え、数時間後には飼育水を必ず換えるようにする。幼生の飼育水は真水よりも0.3〜0.6%の食塩水を用いた方が、餌のブラインシュリンプが長く生存でき、イモリの幼生の死亡率も低く抑えることができる。一ヶ月ほど経ってから、小さく刻んだ冷凍赤虫を与え始め、餌をブラインシュリンプから冷凍赤虫に切り替えていく。さらに1〜2ヶ月で変態を始めるが、水深を浅くするとともにスポンジなどで陸地を作ってイモリが溺れないようにする。変態後のイモリは小さく、生餌にしか興味を示さないので飼育は非常に難しくなる。餌の食いつきを改善するには、サンショウウオの飼育法（6-(2) 参照）で述べるように、チオ尿素を溶かした水で幼生を飼育して変態を遅らせる方法もある（Chiba et al. 2012）。

(3) 採卵方法

晩秋に採集して屋外や冷蔵庫内で越冬させたアカハライモリの場合、翌年の秋まで受精卵を得ることができる。しかし、雌の体内に取り込まれた精包内の精子や卵巣内の卵の質や量の低下とともに受精率も低くなる。そのため、実験や観察に使える受精卵を得られるのは、本来の産卵期が終わる7月上旬までと考えた方がよい。

低温で保管しておいた雌のイモリを数日前から室温に慣らしておく。水の深さは1〜2 cm程度でよい。アフリカツメガエルと同様にhCGの注射によって産卵を誘発するが、一回ではなく1日おきに2〜3回注射する（図7B: Matsuda and Oya, 1977）。注射器はツベルクリン用（針は26 G）を使う。一回の注射に必要なhCGの量は50単位（1000単位/mLを0.05 mL）で、図7Cのように一方の手でイモリの脇腹が見えるように保持し、他方の手で注射器を持って内臓に刺さらないように針を寝かせて皮下注射する。すぐに産卵することはないので、1〜2 cmの深さの水を入れた容器に入れて2回目の注射を待つ。

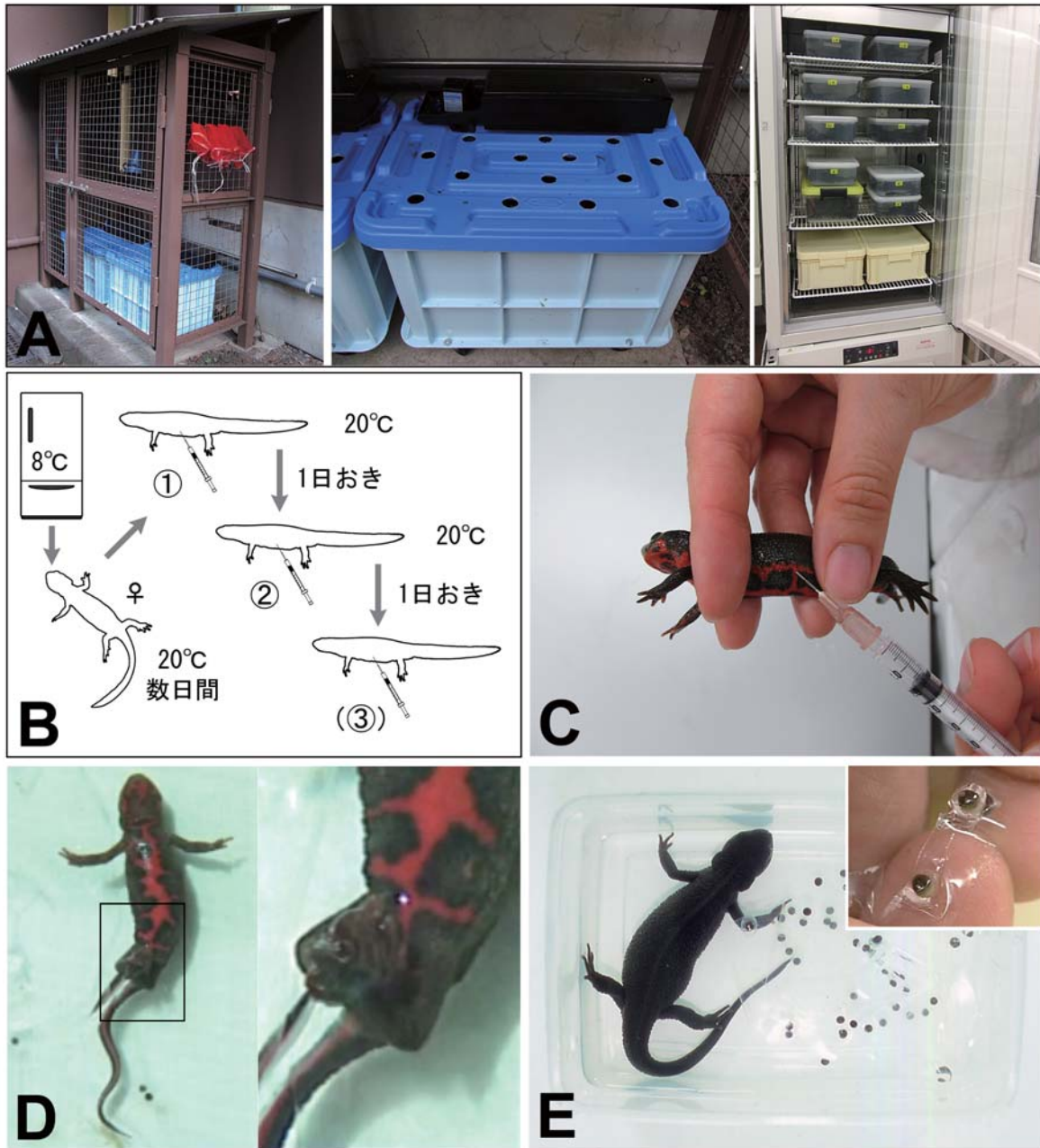


図7 アカハライモリの越冬方法と採卵方法

- A) イモリの越冬方法。北側に面した建物の裏など(写真左)にコンテナボックス(100L)を置き、半分位の深さまで落ち葉と水を入れる。60cm水槽用の上面ろ過装置を取り付けて、水を緩やかに循環する(写真中)。イモリは落ち葉の中に潜って越冬するので、春までは餌を与えず、水を換える必要もない。室内では冷蔵庫で保管する(写真右)。庫内の温度を8℃前後に設定する。飼育水には真水ではなく0.3~0.6%の塩水を用いると、イモリがやせ細るのを防げる。完全には冬眠していないので、週に一度は冷凍赤虫を与える。
- B) hCG注射による産卵誘発のスケジュール。屋外または冷蔵庫内(8℃)で保管していたイモリを注射の数日前から室温(20℃)で飼育する。1日おきに2回、50単位のhCGを皮下注射する。2回目の注射を終えたイモリは一匹ずつ小さな容器に入れる。翌日以降、毎日20~40個、合計60~200個の卵を産む。春から初夏に採集したイモリは1回の注射だけで産卵することが多い。
- C) hCGの注射方法。脇腹が見えるようにイモリを保持し、注射針を寝かせながら皮下注射する。1回に注射するhCGの量は50単位。
- D) 産卵の様子。雌のイモリは仰向けになって産卵を始める。左右の後肢で水草(写真ではビニール片)を折り曲げ、その間の部分にゼリーのカプセルに包まれた卵を一つずつ産み付けていく。
- E) 産卵用の容器と産み付けられた卵。容器にはイモリが完全に浸かる深さの水を入れ、卵を産み付けるための幅7~8mmに切ったビニール片を入れる。水とビニール片は毎日新しいものと取り換える。卵は一つずつ丈夫なゼリー質のカプセルに包まれているので、先曲りピンセットや指先を使ってビニール片から取り外す。

1日おいてから2回目の注射を行うと、早ければその翌日から産卵を始める。野外では水中の草などを折り曲げた中に後肢を使って1個ずつ受精卵を産み付ける(図7D)。2回目の注射を終えたイモリは1匹ずつ小さな容器に分けて入れ、水深は2.5~3 cm程度にする。水草の代わりに幅7~8 mmに切ったりボン状のビニール袋の切れ端を数本入れておくと、毎日20~40個の受精卵を数日間にわたって産み続ける。一匹のイモリが産む卵の総数は60~200個である。卵を産み付けたビニール片を別の容器に回収して、新しいものと取り換える。産卵しない場合には、さらに1日おいて3回目の注射を試みる。なお、春に採集したイモリはすぐに産卵できる状態にあるので、1回のhCGの注射だけで産卵が誘発されることが多い。

卵の直径は2.0~2.3 mmで、1個ずつ丈夫なゼリー質のカプセルに包まれている(図7E)。卵の入ったカプセルを指先や先曲ピンセット(内側に滑り止めの溝があるもの)を使ってビニール片から丁寧に取り外し、別の容器に移す。容器には十分な量のカルキ抜きした水を入れ、酸欠にならないように注意する。アカハライモリに限らず両生類の卵や胚の発生速度は温度によって変化するため、実験や観察の目的に合わせて水温を調節すればよい。ただし、アカハライモリの場合は適温18~24℃を大きく外れてはならない。

4. アホロートル *Ambystoma mexicanum*

アホロートル(Axolotl) *Ambystoma mexicanum*は幼形成熟(ネオテニー)をすることで有名なサンショウウオの一種である。原産地はメキシコシティ近郊の湖であり、メキシコサンショウウオあるいはメキシコサラマンダーというのが正式名称である(長坂・池田1996;山崎・松橋2005)。成長すると全長30 cmにもなる大型のサンショウウオだが、分厚い唇と大きな口、つぶらな瞳(眼)、ふさふさした大きな外鰓をもち、とても愛らしい姿をしている。今から30年ほど前には、カップ焼きそばのCMでキャラクター化され、「ウーパールーパー」の呼び名で一躍有名になった。

アホロートルは一度の産卵で200~400個の卵を産む。卵の直径は2 mm前後あるので、発生の様子を観察するにも、移植などの実験操作を加えるにも適している。受精から2週間ほどで孵化した幼生はそのままの姿で成長を続け、1年~1年半で性成熟して次の世代を残せるようになる。変態する能力は失われていないため、甲状腺

ホルモンを与えればトラフサンショウウオ科Ambystomatidaeの成体の姿に変態できる。また、多くの有尾目と同様に再生能力が高く、失われた肢や尾をもと通りに再生できる。このようにアホロートルは発生学や内分泌学の研究材料としての利用価値が極めて高く(Armstrong and Malacinski 1989)、100年以上も前から実験動物として飼育されてきたため、飼育方法や繁殖方法はほぼ確立されている(Scott 1995;林2004)。

(1) 入手方法と飼育方法

アホロートルは資料1に挙げた養殖業者から購入することができる。冬から春が産卵期であるため、夏頃には5~10 cm程度に育った個体がペットショップなどでも売られている。「ウーパールーパー」の商品名で売られているものは、眼が黒く、体が薄いピンク色をした白変種Leucistic(商品名:ホワイト)であることが多い。その他にも、緑と黒の斑模様をした野生型Wild-type(商品名:マープル)、体全体が黒っぽい黒変種Melanoid(商品名:ブラック)、白眼で体全体が白いアルビノAlbino(アルビノのうち黄色味がかかった体色ものはゴールデンと呼ばれる)などが入手できる(図1D-F)。さらに、学術的な価値の高いeyeless系統、cardiac系統、short-toes系統などもあり、これらはUniversity of KentuckyのAmbystoma Genetic Stock Center(AGSG)から購入できる(<http://www.ambystoma.org/>)。

アホロートルは幼形成熟の象徴でもある大きな3対の外鰓をもち、完全水棲の有尾両生類である。そのうえ、成長すれば全長が20~30 cmにも達するため、十分な量の水の中で飼育する必要がある。止水や緩やかな水流を好む反面、非常に水を汚すため、水質管理が飼育の最大のポイントとなる。また、有尾目に共通して言えることだが、高水温には弱いので夏場の水温管理にも細心の注意を払い、水温25℃を超えないようにしなければならない。餌となる冷凍赤虫(栄養価は低い)や底棲肉食性熱帯魚用の人工飼料、鶏や牛のレバーなどを旺盛に食べる。順調に育てば1年~1年半で性成熟して、次の世代を残せるようになる。

(2) 採卵方法

アホロートルは一度に数百個の卵を産み、成長すれば最大30 cmにもなる大型の両生類であることを十分に考えて繁殖させる必要がある。成熟したアホロートルの雌雄の見分け方は図2Bに示した。雄は体が細長く、全長に占める尾の割合が雌よりも大きい。また、総排出腔の

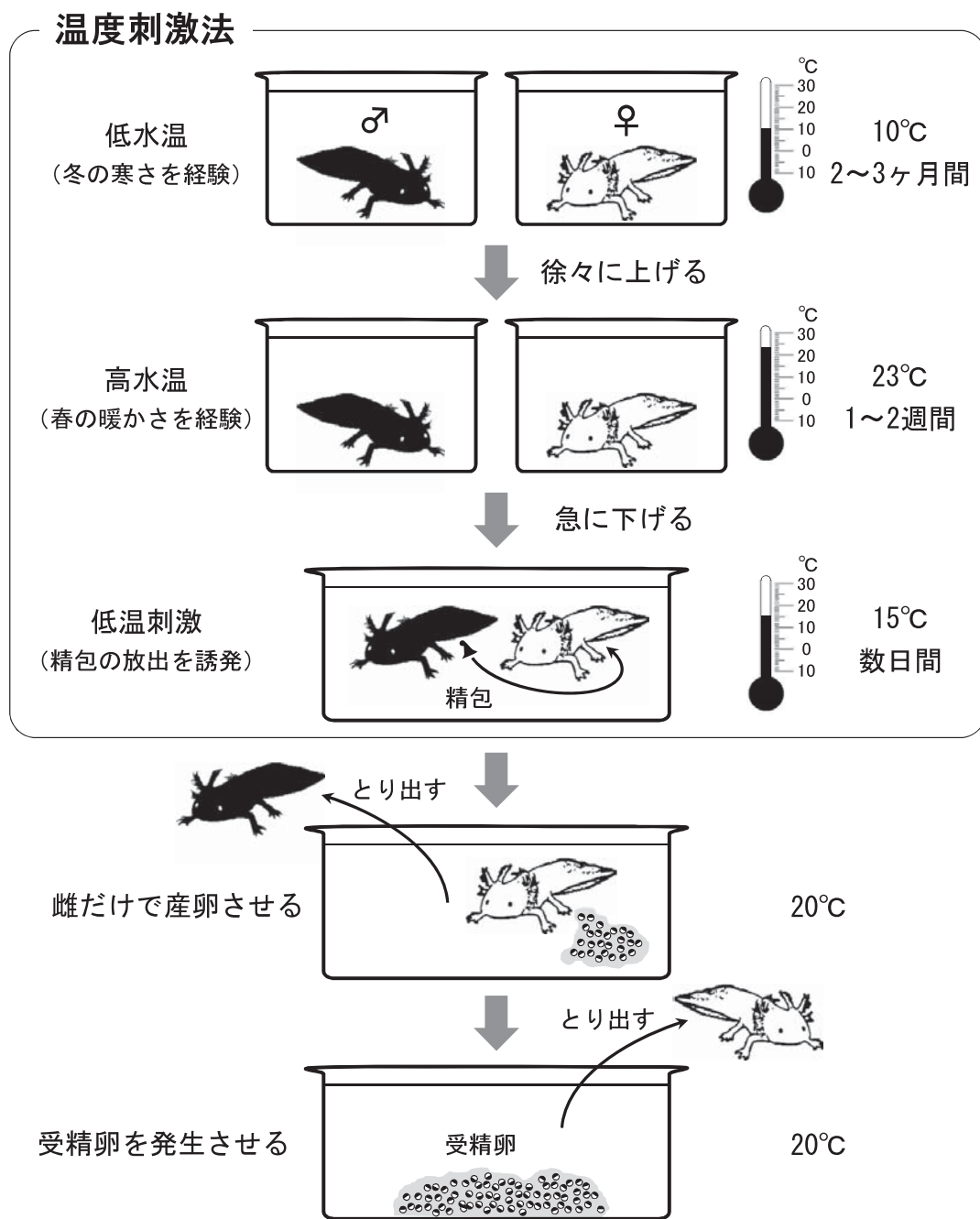


図8 温度刺激によるアホロートルの産卵誘発

はじめに、10°C前後の低温で2~3ヶ月飼育して冬の寒さを経験させる。次に、数日かけて水温を23°C前後まで徐々に上げ、その状態で1~2週間飼育して春の暖かさを経験させる。最後に、雄と雌を同居させて水温を15°C付近まで急激に下げる。水温の低下が引き金になって雄は精包を放出し、雌がそれを総排出腔から取り込む。水槽には卵が付着するための石や人工の水草などを入れておく。1~2日後に雌が産卵を始めるので、雄は取り出しておく。産卵を終えた雌を取り出し、卵を水槽に残して発生させる。

周囲が大きく膨らんでいるのが特徴である。一方、雌は総排出腔の周りの膨らみが小さく、全長に占める尾の割合も小さいが、胴は太くて丸みを帯びている。受精卵を得るには、雌雄のペアに対して温度刺激を与える方法が

有効である(図8;林2004)。アホロートルもアカハライモリと同様に、雄から雌への精包の受け渡しと雌の体内での受精を経て受精卵が産み落とされる。その際、求愛行動にはじまる一連の配偶行動が重要であるため、ツ

メガエル類などのようなhCGの注射では、雌雄が別々に発情してしまい受精卵を得るのは難しい。温度刺激法の第一段階では、10℃前後の低温下で2~3ヶ月間飼育して冬の寒さを経験させる。続いて、春の訪れを経験させて発情を促すが、これには数日かけて徐々に水温を上昇させ、その後1~2週間は23℃前後を保つ。最後に雌雄を一緒にして、水温を一気に15℃付近まで下げると、それが引き金となって雄が精包を放出する。総排出腔から精包を体内に取り込んだ雌は、1~2日経つと水槽内の水草、石、ろ過装置などに受精卵を産み付け始める。精包を放出した雄や産卵を終えた雌は水槽から取り出して、産み付けられた卵が食べられないようにする。一匹の雌が産む卵の総数は200~400個にもなり、透明で豊富なゼリー質に覆われているので非常に取扱いにくい。

(3) 幼生の飼育方法

幼形成熟を行うアホロートルであるが、孵化後の約1ヵ月間の小さな幼生の飼育方法と、それ以降の幼生の飼育方法は異なる。受精卵は発生を続けて、水温20℃では2~3週間で孵化する。孵化後の約1週間は卵黄の栄養で育つため、餌を与える必要はない。その後の約1ヵ月間がアホロートルの飼育の中で最も忙しい時期となる。アカハライモリの幼生を飼育する場合(3-(2)参照)と同様に、生きたブラインシュリンプを毎日与え、翌日には水換えをして再びブラインシュリンプを与える。つまり、毎日欠かさず給餌と水換えを行う必要があり、それを最低でも1ヵ月間は続けなくてはならない。なお、アカハライモリの幼生の飼育法でも述べたが、この時期の飼育水は真水ではなく0.3~0.6%の食塩水を用いた方が、餌のブラインシュリンプを長く生存させるとともに、アホロートルの幼生の死亡率を低く抑えることができる。

一ヵ月後には全長が3~4 cmになるので、餌をブラインシュリンプから冷凍赤虫に切り換えていく。この頃から食欲はさらに旺盛になり、顔の前で動くものには何でも食いつくようになる。そのため共食いで手足が喰いちぎられるものが多くなる。無傷のまま育てるには十分な餌を与えるのはもちろんだが、一匹ずつ個別の容器に入れて飼育するか、大きめの容器を区切って飼育するしかない。

5. イベリアトゲイモリ *Pleurodeles waltli*

イベリアトゲイモリ *Pleurodeles waltli* は、全長が最大30 cmにもなる世界最大のイモリで、イベリア半島南部

(スペインとポルトガルの南部)とモロッコ北西部に生息している(長坂・池田1996;山崎・松橋2005)。ヨーロッパでは以前から発生学の実験にも使われてきたが、日本では一部の愛好家を除いて馴染の少ないイモリである。しかし、研究材料としては日本のアカハライモリと同等かそれ以上の優れた特長を持っている。

イベリアトゲイモリの飼育は極めて容易である。アカハライモリと違って一生を水中で過ごす完全水棲のイモリであり、30℃を越えなければ比較的高い水温にも適応できる。そのため、多くの有尾目にとっては過酷な夏場の高水温にも耐えられる。食欲は極めて旺盛で、熱帯魚用の人工飼料を貪るようにして食べる。病気にかかることはほとんどなく、成体どうして共食することもないため、飼育中の死亡率は極めて低い。繁殖力の強さもこのイモリの特徴の一つである。決まった産卵期はなく、雌雄を一緒に水槽で飼育すれば雄から雌への求愛行動が頻繁に観察でき、ほぼ一年中採卵することができる。個体数が増え過ぎないように、雌雄を分けて飼育しなければならないほどである。

イベリアトゲイモリは、発生や再生の研究材料としての利用価値も高い。受精卵の直径は1.6~1.8 mmで、アカハライモリの卵(2.0~2.3 mm)と比べると小ぶりだが、実験や観察には問題なく使える。有尾目の両生類は体のいろいろな部分を再生できるため、古くから再生研究のモデル動物として利用されてきたが、イベリアトゲイモリも例外ではなく高い再生能力を持っている。

(1) 入手方法

幼生や成体は両生類を専門的に扱っているペットショップや動物商から購入できる。また、個人で飼育や繁殖を行っている愛好家からインターネットなどを通して購入することも可能である。現在は、CB個体(CBとは飼育下繁殖Captive breedの略)と呼ばれる日本国内で繁殖させたものが出回っており、野生型Wild-typeと白変種Leucisticが容易に入手できる(図1H、I)。

成熟したイベリアトゲイモリの雌雄の見分け方を図2Dに示した。雌は雄よりも体が大きく、卵を持っているため胴が太くて丸みを帯びている。雄は雌よりも体が細長く、全長に占める尾の割合が大きい。雄の最も顕著な特徴は前肢に見られる。雄の前肢は「いかり肩」ように立派で、上腕部には力こぶのような黒い突起(婚姻瘤)がある。白変種では体が白いので、黒い婚姻瘤がひときわ目立つ。

(2) 採卵方法

イベリアトゲイモリには決まった産卵期がないので、一年を通して採卵することができる。普段は雌雄を別々に飼育しておき、受精卵が必要なときにペアにする。アカハライモリやアホロートルと同様に、雄が放出した精包を雌が受け取って、雌の体内で受精した受精卵が産み落とされる。そのため、雄の求愛行動に始まって雌の産卵に至るまでの一連の生殖行動を確実に行わせるには、アホロートルと同様に温度刺激を与えるのが有効である(4-(2) 参照、図8)。

イベリアトゲイモリは完全水棲であるため、当然ながら求愛行動も水中で行われる (<http://amphibiaweb.org/>)。雄は雌の下に潜り込んで、左右の前肢で雌の左右の前肢を下から抱え込む。あたかも雌を背負っているかのような体勢をとり、この状態が数時間から、長い場合には数日間も続く。やがて、雄は組んでいた一方の肢をほどき、頭が雌の後方へ向くように体の向きを換える。雄は総排出腔から精包を放出するとともに、雌の総排出腔が放出した精包に近づくように雌の向きを換える。精包は総排出腔から雌の体内に取り込まれ、貯精のうに蓄えられて受精に用いられる。その後二日ほど経ってから、ゼリー質に包まれた受精卵が10~20個の小さな塊として水草などに産み付けられる。一匹の雌が数日かけて産む卵の総数は200~1000個にも及ぶ。水温18℃で発生させた場合には、幼生は約2週間で孵化を始め、その後は3~4ヶ月かけて全長5~10 cmの幼生へと成長する。変

態を終えた個体の全長は、1年目には15 cm程度、2年目には18 cm程度にまで達する。

6. 日本の両生類

大部分が温帯に属する日本列島には、熱帯には及ばないものの、数多くの種類の両生類が生息している(日高1996; 前田・松井, 1999; 奥山・松橋2002; 内山ほか2002)。例えばサンショウウオ科Hynobiidaeの多くは北半球の温帯域に分布しているが、日本には18種が生息している。しかしながら近年では、宅地開発や水田の圃場整備による乾田化などによって、彼らの生息地や産卵場所が失われてきている。さらに、酸性雨や地球温暖化、カエルツボカビ症などの要因もこれに加わり、野外で採集できる日本の両生類は減少の一途をたどっている。

(1) 産卵期と産卵場所

東日本(関東地方と東北地方)に生息しているアカハライモリ以外のおもな両生類の産卵期と産卵場所を表1に示した。この中には、トウキョウサンショウウオのように環境省レッドリスト絶滅危惧Ⅱ類(VU)に指定されているものもあり、卵のうや卵塊(図9)の採集は必要最小限に留めなくてはならない。産卵期はニホンアカガエルのように真冬の1月から始まるものもあれば、ウシガエルのように夏場にピークを迎えるものまでさまざまである。クロサンショウウオは山地の池や沼の水没し

表1 東日本に生息するおもな両生類の産卵期・産卵場所・卵の特徴

種名	産卵期	産卵場所	卵塊・卵のうの形状	卵の数	卵の直径(mm)	分布
〔有尾目〕						
トウキョウサンショウウオ <i>Hynobius nebulosus tokyoensis</i>	1~4月	丘陵地の湿地	透明なバナナ状の卵のう	20~50/卵のう	2.5~3.0	本州(群馬県を除く関東地方、福島県相馬地方、愛知県)
クロサンショウウオ <i>Hynobius nigrescens</i>	2~7月	山間の池や沼	乳白色のアケビ実状の卵のう	30~40/卵のう	2.5~3.0	本州(東北地方、北関東、北陸地方、佐渡)
トウホクサンショウウオ <i>Hynobius lichenatus</i>	3~6月	山間の細流	しわのある短い紐状の卵のう	20~40/卵のう	3.5~4.0	本州(東北地方、新潟県、群馬県、栃木県、茨城県)
〔無尾目〕						
ニホンアカガエル <i>Rana japonica</i>	1~3月	湿地、水田	球を押しつぶした形の卵塊	500~3,000	1.3~2.0	本州(隠岐を含む)、四国、九州(大隅諸島を含む)
アズマヒキガエル <i>Bufo japonicus formosus</i>	3~4月	池、水田	長い紐状の卵塊	1,500~8,000	2.1~2.7	本州(近畿以東、中国や紀伊半島の一部)、北海道(函館周辺)
トウキョウダルマガエル <i>Rana porosa porosa</i>	4~7月	湿地、水田	球形の大卵塊、不規則な小卵塊	800~2,000	1.3~1.9	本州(関東平野から仙台平野、信濃川流域)
ニホンアマガエル <i>Hyla japonica</i>	5~7月	湿地、水田	不規則な小卵塊(5~30卵ずつ)	250~800	1.2	日本全国
ウシガエル <i>Rana catesbeiana</i>	6~8月	池、沼	水面に広がる一層の大卵塊	6,000~40,000	1.2~1.5	北海道南部、本州(佐渡を含む)、四国、九州、南西諸島

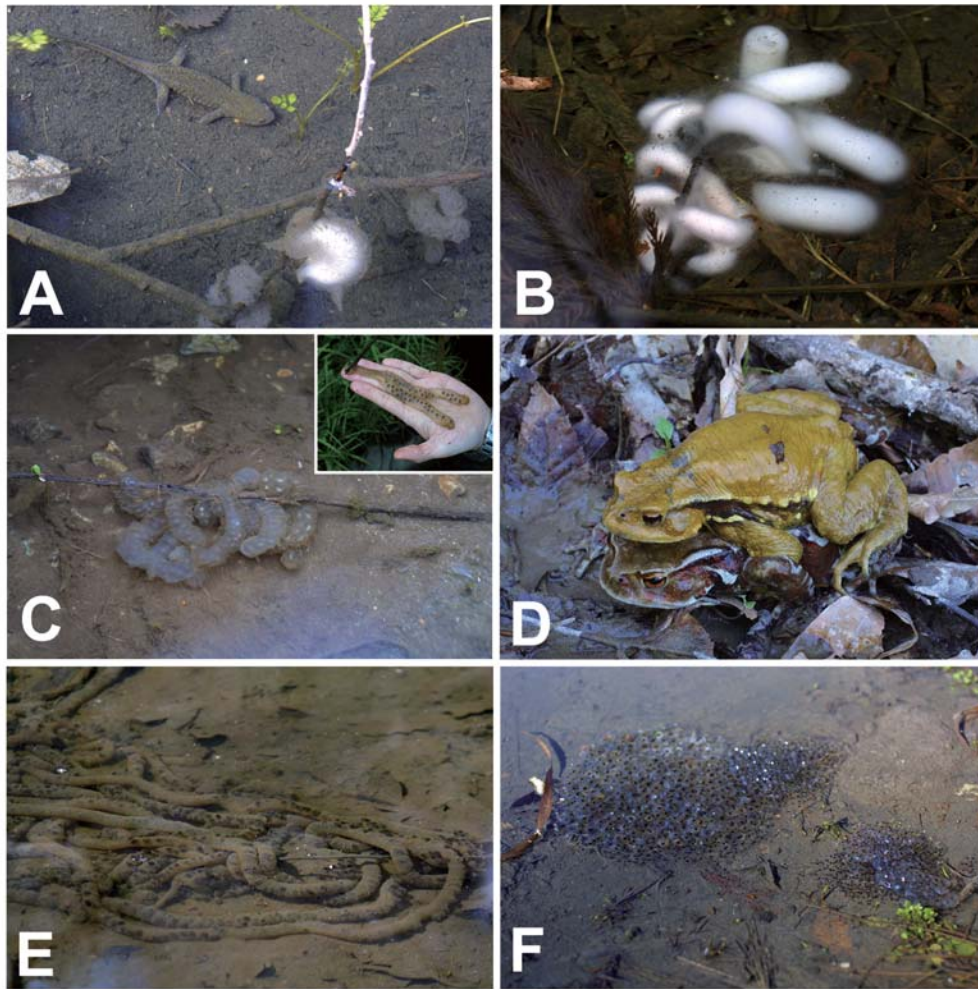


図9 両生類の卵のうと卵塊

- A) 産卵場所に留まって卵を守るクロサンショウウオの雄。白い卵のうはクロサンショウウオのものだが、この場所には、トウホクサンショウウオの透明な卵のうも産み付けられている。山形県西川町。
- B) クロサンショウウオの卵のう。一匹の雌は一对の卵のうを産むので、この枯れ枝には6~7匹の雌が産卵したことがわかる。白いアケビ実状の卵のうはクロサンショウウオ特有である。山形県大蔵村。
- C) トウホクサンショウウオの卵のう。透明で表面に縦横に走る細かな筋がある。一つの卵のうには平均16個(8~24個)の大きな卵があり、発生の様子を肉眼でも観察できる。山形県鶴岡市。
- D) 抱接するアズマヒキガエルの雄と雌。関東地方では、2~3月頃に冬眠から目覚めて産卵し、その後は再び春眠する。神奈川県鎌倉市。
- E) アズマヒキガエルの卵塊。ヒキガエルの仲間は紐状の卵塊を産むのが特徴で、その長さは5 mから時に20 mにも達することがある。神奈川県鎌倉市。
- F) ヤマアカガエルの卵塊。アカガエルの仲間の多くは、球状または円盤状の大きな卵塊を産む。ヤマアカガエルの産卵期はとても早く、氷が残っているような水溜りにも産卵する。山形県東根市。

た枯れ枝などに、とてもよく目立つ白いアケビ実状の卵のうを産みつける。産卵期はその地域の融雪期と重なるため、標高の高い山に登れば夏でも卵のうを見つかることができる。また、トウホクサンショウウオは3~5月頃、山間部の細流の石や枯れ枝に透明なしわのある卵のうを産みつける。卵のうの中にある卵は直径が4 mm近くもあり、胚はさらに大きくなるため、原口が卵黄栓になっ

ていく様子や神経板が閉じていく様子などが肉眼でも容易に観察できる(図10B)。

(2) 幼生の飼育方法

表1に示したカエル類の幼生、いわゆるオタマジャクシはいずれも雑食性であり、茹でたホウレンソウ、パンくず、煮干し、冷凍赤虫、金魚や熱帯魚用の人工飼料な

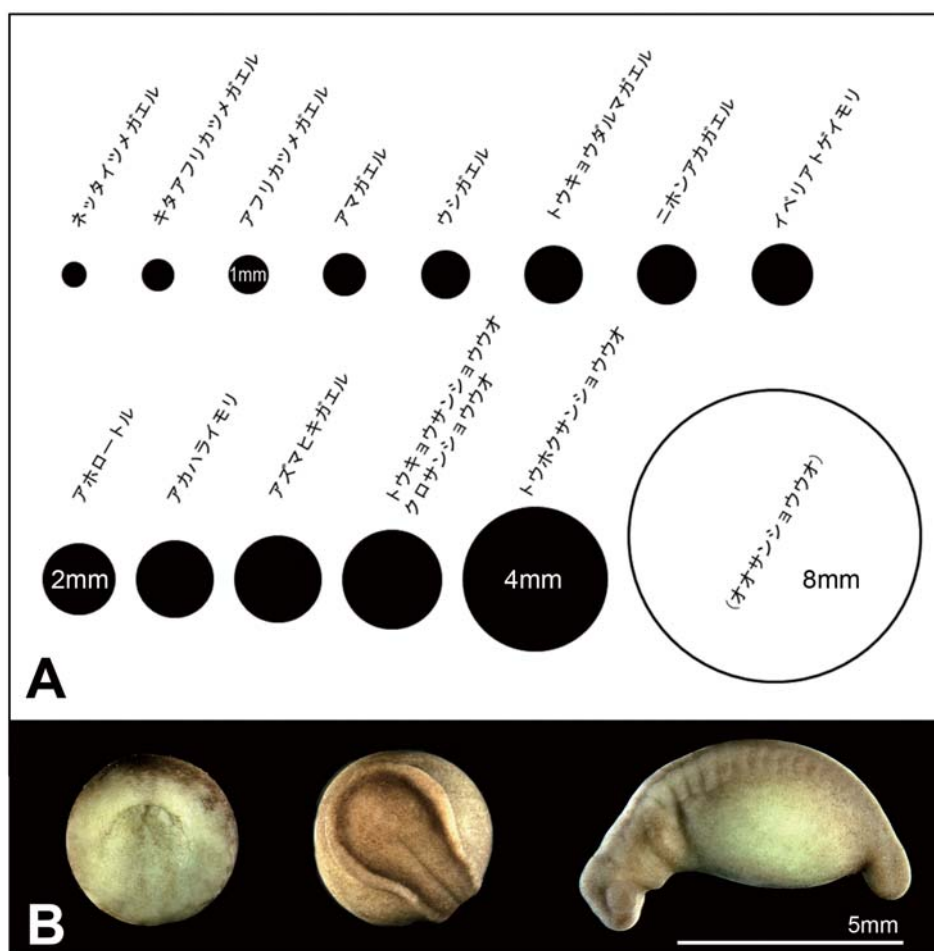


図10 両生類の卵の大きさの比較

- A) 本稿で扱った両生類の卵の相対的な大きさの比較。大まかに見ると、イモリやサンショウウオ（有尾目）の卵は、カエル類（無尾目）の卵よりも大きい。発生の観察には大きくてゆっくりと発生する前者が適しており、生化学的・分子生物学的な解析には、小さくても産卵数が多く、発生速度が速い後者が適している。ちなみにオオサンショウウオの卵は巨大で、大きいものでは直径が8mmもある。
- B) トウホクサンショウウオの胚。受精卵の直径が4mmもあるので、原腸陥入や神経形成の様子がとても観察しやすい。尾芽胚はさらに大きく、眼胞や耳胞、鰓、腎節などの原基の存在や、体節の数などが容易に観察できる。

ど何でも食べる。酸欠や水質の悪化、共食いに注意すれば飼育は至って簡単である。また、表1にあるサンショウウオ類の幼生はすべて肉食性である。幼生期には冷凍赤虫や肉食性熱帯魚の飼料をよく食べるが、変態して成体になると生餌しか食べなくなる。そのため、変態後も飼育を続ける場合には、ハエやコオロギなどの昆虫を別に飼育して与えるか、ピンセットを使って冷凍赤虫などを口先で揺らしながら根気よく餌付けしなければならない。このような手間を省くためには、人為的に幼生期を引き延ばして大きく育った時点で変態させるとよい。これには、甲状腺機能の阻害効果をもつチオ尿素を溶かした飼育水で幼生を育てる方法がある。チオ尿素(0.02%)が溶けた飼育水中では1年以上経っても変態することな

く、通常よりも大型の幼生に育てることができる。そのような幼生をチオ尿素を含まない飼育水（真水）に移すと間もなく変態を始めるが、変態後も引き続き冷凍赤虫などを食べるが多い。このようなチオ尿素による変態抑制の方法は、イモリを幼生から成体へ育てる場合にも有効である（3-(2) 参照、Chiba et al. 2012）。

実験や観察を終えた幼生や成体はいずれも貴重な両生類であるため、可能な限り採集した場所や生息地に戻す必要がある。ただし、ウシガエルはアメリカ原産の帰化動物であり、生態系を乱す恐れのある特定外来生物に指定されているため、採集した成体やオタマジャクシを再び野外に放してはならない。

7. おわりに

本稿では、世界中に約7100種 (<http://amphibiaweb.org/>) も生息している両生類の中から、発生や再生の実験と観察に適した数種について飼育方法と繁殖方法 (採卵方法) を解説した。本稿で取り上げた両生類は有尾目・無尾目の違いに関わらず、いずれも研究材料や学習教材としての優れた特長をもっている。多くのものが水棲または半水棲であるため、水質管理と水温管理には細心の注意を払わねばならない。また、アフリカツメガエルやアホロートルのように、十分な広さの飼育スペースを必要とする大型種も含まれる。しかしながら、丈夫で病気にかかることが少なく、人工飼料への食いつきが良いなど、日本の野外に生息する両生類などと比べれば飼育は遥かに容易である。受精卵を得る方法として、hCGを注射する方法と温度刺激を与える方法を解説した。前者はアフリカツメガエルのように雄が雌に抱接して放精し、体外受精によって受精卵を産む種類には有効である。精包の受渡しと体内受精を行うアホロートルやイベリアトゲイモリには後者の温度刺激法を用いる。その他にも、hCGで発情を促した個体を用いた人工授精法を活用すれば、比較的容易に受精卵を得ることができる。受精卵の直径はアフリカツメガエルで1 mm、イモリやアホロートルで2 mmほどあり、トウホクサンショウウオに至っては4 mm近くもある (図10A)。受精卵から発生した幼生が孵化するまで時間は、アフリカツメガエルが2日半~3日と最も早く、その他の両生類は10日~2週間かかる。このような卵の大きさや発生速度の違いも考慮して選べば、本稿で紹介した両生類は発生の研究材料や学習教材として非常に利用価値の高いものばかりである。今回は、卵や胚を包んでいるゼリー質や卵膜の除去方法、スーパーマンが行った胚の結紮実験や移植実験、誘導物質を用いた未分化細胞の分化誘導実験など、両生類の初期胚に実験操作を加えるための基本手技を解説する。

資料

1. ツメガエル類とアホロートルの入手方法

以下の業者などから性別や体重などを指定して注文することができる。いろいろな成長段階のオタマジャクシや変態直後の小さいカエルも購入できる。

・ワタナベ増殖

各種のツメガエルを販売している。

〒677-0131 兵庫県多可郡八千代町下三原174-1

Tel : 090-7103-0405

<http://www5d.biglobe.ne.jp/~zoushoku/>

・ゼノバス養殖教材

アフリカツメガエルを販売している。

〒306-0125 茨城県古河市仁連1293-3

Tel : 090-4910-3478

<http://www.geocities.co.jp/zenopus123/>

・浜松生物教材株式会社

アフリカツメガエルとアホロートルのほか、トノサマガエル、ウシガエル、アカハライモリなども販売している。

〒431-0211 静岡県浜松市西区舞阪町舞阪2370

Tel : 053-592-7822

<http://www.h-seibutsu.co.jp/>

・ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) 研究用のネッタイツメガエルを提供している。

http://home.hiroshima-u.ac.jp/~amphibia/xenobiores/iweb/XenoBiores_Top.html

・日本生物教材研究センター

各種アホロートルを販売している。

〒930-1305 富山県富山市下番101-14

Tel : 076-483-8410

2. hCGの購入および調製方法

hCGは、あすか製薬 (「動物用ゴナトロピン10000」など) や持田製薬 (「HCGモチダ筋注用1万単位」など) から販売されている。薬事法の関係から直接購入できない場合には、動物病院の獣医師に指示書の作成を依頼して入手する。付属の生理食塩水を用いて濃度が1000ないし2000単位/mLとなるように調製する。hCG溶液は冷蔵または冷凍保存するが、後者の場合は凍結と融解を繰り返してはならない。

3. 試薬類

・MS-222溶液 (麻酔用)

MS-222 (別名: Tricaine) を下記のスタインバーグ氏液に濃度0.1% (w/v) となるように溶かし、1~5 M NaOHでpH7.4に調整する。

・スタインバーグ氏液 (SS)

58.00 mM NaCl, 0.67 mM KCl, 0.34 mM Ca(NO₃)₂, 0.83 mM MgSO₄, 3.00 mM HEPES, 0.01% (w/v) kanamycin sulfate, 1 M NaOHでpH7.4に調整する。

・DeBoer液 (DB)

110.00 mM NaCl, 1.30 mM KCl, 0.44 mM CaCl₂,
3.00 mM HEPES, 1 M NaOHでpH 7.3に調整する。

引用文献

- Armstrong JB, Malacinski GM (1989) *Developmental Biology of the Axolotl*. Oxford University Press, New York
- Chiba C, Yamada S, Tanaka H, Inae-Chiba M, Miura T, Casco-Robles M. M, Yoshikawa T, Inami W, Mizuno A, Islam MR, Han W, Yasumuro H, Matsumoto M, Takayanagi M (2012) Metamorphosis inhibition: an alternative rearing protocol for the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Zoological Science*, 29: 293-298
- 海老沼剛, 川添宣広 (2006) カエル1 (爬虫・両生類ビジュアルガイド). 誠文堂新光社, 東京
- Green SL (2009) *The Laboratory Xenopus sp.* CRC Press, Boca Raton
- 林文俊 (2004) ProFile100別冊 ウーパールーパー. ピーシーズ, 東京
- 日高敏隆 (監修) (1996) 両生類・爬虫類・軟骨魚類 (日本動物大百科5). 平凡社, 東京
- 石原勝敏 (1980) 発生学実験. 共立出版, 東京
- 石原勝敏, 山上健次郎 (1983a) 図説 教材生物 上. 共立出版, 東京
- 石原勝敏, 山上健次郎 (1983b) 図説 教材生物 下. 共立出版, 東京
- 小針布実子, 枳内新, 若原正己 (1996) 実験マニュアル①飼育と採卵・人工媒精法. 遺伝, 50: 53-55
- 前田憲男, 松井正文 (1999) 改訂版 日本カエル図鑑. 文一総合出版, 東京
- Matsuda M, Oya T (1977) Induced oviposition in the newt *Cynops pyrrhogaster* by subcutaneous injection of human chorionic gonadotropin. *Zoological Magazine*, 86: 44-47
- 松井正文 (2005) これからの両棲類学. 裳華房, 東京
- Moriya M (1976) Required salt concentration for successful fertilization of *Xenopus laevis*. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University. Ser. 6, Zoology*, 20: 272-276
- 長坂拓也, 池田純 (1996) 爬虫類・両生類800種図鑑. ピーシーズ, 東京
- 奥山風太郎, 松橋利光 (2002) 日本のカエル (山溪ハンディ図鑑9). 山と溪谷社, 東京
- 斎藤貞美 (1983) カエルの動物実験 (グリーンブックス99). ニュー・サイエンス社, 東京
- Scott PW (1995) *Axolotls Care & Breeding in captivity*. T.F.H. Publications, Neptune
- 豊田ふみよ, 菊山榮 (2003) イモリのフェロモンと生殖行動. 遺伝 別冊, 16: 92-99
- 内山りゅう, 前田憲男, 沼田研児, 関慎太郎 (2002) 日本の両生爬虫類. 平凡社, 東京
- 山崎尚 (1989) 両生類の受精と発生 実験マニュアル 人工授精法. 遺伝, 43: 37-38
- 山崎利貞, 松橋利光 (2005) イモリ・サンショウウオの仲間 (爬虫・両生類ビジュアルガイド). 誠文堂新光社, 東京

Experimental Studies on Development and Regeneration Using Amphibians: I. Rearing and Egg Collection Methods

Takashi Ariizumi

Abstract

Amphibians were the first tetrapods to develop during the evolution of vertebrates. The developmental stages of an amphibian from an egg to an adult are similar to those seen during human development. In addition, amphibians with tails, such as newts and salamanders, have a very high capacity to regenerate and are able to recover the loss of a limb or tail within a few months. Thus, amphibians have long been used in the field of embryology as model animals to aid in understanding the mechanisms underlying vertebrate development and regeneration. Studies on development and regeneration capacity that use amphibians as animal models require that the amphibians be reared under appropriate conditions and their fertilized eggs be reliably obtained. This paper details the methods involved from procurement through rearing and breeding until egg collection for several representative species of the class Amphibia and includes the modifications made to these methods by the author. An understanding of the life history of amphibians and the selection of appropriate species for observation and experimentation will aid in designing the experimental protocols and learning materials on amphibians used as models in this study.

Keywords: amphibian, development, regeneration, rearing, egg collection