

【発生と形態形成】

有尾類の仲間 アカハライモリの教材化

——生命現象に感動を呼び起こす教材

秋山 繁治 *Shigeharu Akiyama*

南九州大学 教授

イモリやサンショウウオなどの有尾類の仲間は、実験材料として、生物学の発展に重要な役割を果たしてきた。イモリをつかって、フォークトは原基分布図を作成、シュペーマンも形成体を発見した。そして、サンショウウオをつかって、ニューコープは中胚葉誘導を発見した。古くから「再生力」を持つことが知られていた有尾類は、現在でも、再生に関わる研究にとって重要な実験材料である。

今回は、有尾類の仲間日本で固有種のアカハライモリ *Cynopus pyrrhogaster* を実験材料として、飼育に関わる基礎知識と教材としての具体的な実践例を紹介したい。

1 はじめに

「発生」は、生命の不思議を感じさせる現象である。発生のしくみを研究する「発生学」は、19世紀の終わりから20世紀の始めにかけて、「実験発生学」として出発した。その後、「実験発生学」は多くの分野に分かれ、新しい時代に突入していった。「発生学」そのものは発生現象があまりにも複雑すぎ、当時の研究レベルではより深く説明することができない状況だった。再び、注目されるのは、1980年代の生化学、分子生物学の発展があつてからである。

現在、「発生学」では、発生に関わる多くの遺伝子が見つかり、分子レベルで発生現象を研究することができるようになり、過去の研究と現在の

研究が融合した新しい分野として発展してきている。そして、「発生学」を含めた生物科学の技術が医療や農業などの幅広い分野に応用され、私たちの生活にも影響を与えている。このような状況を考えると、私たちが現代社会で生きるために必要なサイエンス・リテラシーを持つためには、生命科学の一翼を担う「発生学」を理解することは重要だと考えられる。

両生類を使った発生実験は、動物の維持・管理や準備に多くの労力と時間を要するので、学校の授業でおこなわれていることは少ないと考えられるが、実習する価値を再認識するべきである。

② アカハライモリの 実験材料としての利点

有尾類は、学校での教材実験ではあまり使われていないが、生物学史上重要な発見につながる実験材料として紹介されている。高等学校の教科書（啓林館『生物学』）では、イモリ胚を用いて2細胞期の胚を卵割面に沿って細い髪の毛でくくり、発生の様子を調べた結紮実験やスジイモリ（褐色の胚）とクシイモリ（白色の胚）を用いての交換移植実験、原口背唇部の胞胚腔への移植実験を扱っている。また、最近の生物科学の研究では、脊椎動物の中で再生力が大きい（カエルは四肢が再生しないが、イモリは再生するなど）ことが注目され、脱分化や再生に関わる遺伝子を解明する実験動物として、再認識されつつある。

学校での発生実験の教材としての生物を考えてみると、以下の条件を満たしていることが望まれる。

- ① 卵が大きくて、観察しやすい。
- ② 成体の飼育が容易である。
- ③ 採卵が容易である。
- ④ 受精率が高く、多数の卵を採取できる。
- ⑤ 季節を問わず、必要なときに採卵できる。
- ⑥ 捕獲により種の減少をきたさない。

これらを満たす生物として、アフリカツメガエル *Xenopus laevis* は、研究室レベルでの利用を考えると、1年間同一の個体から数千のレベルの卵数がえられる点で、飼育動物として有利かもしれない。最近利用が広がっているネッタイツメガエル *Xenops tropicalis* やイベリアイモリ *Pleurodeles waltl* はさらに魅力的な材料になるのかもしれない。しかしながら、今回の実験ではアカハライモリを採用した。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ている日本の固有種で、自然環境で生きる姿を観察できるがゆえに、発生教材としてだけでなく、生息環境の調査や生態観察で身近な環境問題を考える優れた教材になると考えられる。

アカハライモリの受精卵（直径約2 mm）は、アフリカツメガエル（直径約1 mm）より大きく、発生過程の観察や実験操作に向いている。冷凍アカムシや人工飼料で容易に飼育できる。採卵は、野外個体や健康に飼育されたメスであれば、ゴナトロピン（胎盤性生殖腺刺激ホルモン）注射で、自然産卵も人工授精も可能であり、受精率も高く、産卵数も多い。採卵については、繁殖期は春から初夏であるが、春に採取した成体を低温（5℃）で保持すれば秋までは採卵が可能であり、秋以降は野外で採取した個体で次の繁殖期まで採卵できるので、ほぼ1年間可能である。

③ 野外での採取と日常的な飼育管理

アカハライモリは、繁殖期であれば昼でも行動しているので見つけやすく、水田の水を落とす9～10月ごろにも水田の側溝や湿地の溜まり、小川の淀みなどで捕獲できる。また、一度に多くの個体を捕獲するには、水田から水を落とした後の11月ごろを選べば、側溝の枯れ葉などの吹きだまりに集団（イモリ玉）になって越冬しているのを見つかることができる。捕獲した個体は、100円ショップで売っている洗濯ネットに入れれば、逃げられることもなく、また、扱いやすい。ネットに入れたままの状態、大型プラスチック容器や蓋付きバケツに入れて持ち帰ることもできる（水は深く入れる必要はない）。ただし、日中に自動車の中に入れたままにすると、高温で死亡するので注意が必要である。

継続飼育するには、ホームセンターで入手できるプラスチックケースを使えば安価で大きな水槽になる。蓋がついているので逃走を防ぐこともできる。水深を5 cm くらいにして、発泡スチロールの板（浮島）を入れた状態で飼育できる。発泡スチロールの板はイモリが上陸する場所である。集団で飼育する場合は、餌やりは週2回（餌の与えすぎに注意）、餌をやってから1～2時間後の水換えと毎日の水換え（カルキを除いた水を使用）を日常的に



図1 アカハライモリのオスとメス

おこなう。ガラス水槽などで飼育する場合は、別のプラスチック容器に生体に移して、餌を与えて1～2時間後に生体だけを水槽に戻すようにした方がよい。水換えを怠れば大量死も起こる。もし死亡個体が出たら、早期に除去することが必要である。室温は常時20℃に設定し、冬季は室温で保持する。イモリの飼育で多い事故は、逃走・高温での死亡・死亡個体を放置したための大量死である。

生殖器官の季節変化から考えると、常温保持で受精卵の採取が可能なのは11月から5月である。ただし、低温保持で飼育した個体は産卵可能な期間を延ばすことができるが、生殖器官の季節変化に狂いが生じているので、使用後は自然条件で1年間休ませる必要がある。また、季節変化が起こらない室内で継続飼育している場合は、正常な受精卵を得られない状況になる可能性が高い。

アカハライモリを扱う際は、手がかぶれることがあるので、手洗いは励行した方がよい。

雌雄の特徴

メスは、全体的にオスより大きく、特に尾の割合が大きい。雌雄を区別する形態的な特徴はオスに顕著で、①頭部が角張っていること、②尾が短く、幅が広いが先端が急に細くなっていること、③総排出腔の周囲が大きく膨らんでいることがあげられる(図1)。

4 アカハライモリを教材にした授業を11月に計画

岡山県高等学校教育研究会理科部会の先生方から、研究授業の依頼があり、アカハライモリを教材にした授業を計画した。

公開授業は11月であった。アカハライモリを選んだのは、繁殖期は春から初夏と一般的には思われているが、実は11月以降も受精卵を得られるからである。授業内容は、アカハライモリの繁殖生態の紹介、発生過程の観察、シュペーマンが発生の機構を解明するためにおこなったイモリ胚の結紮実験を考えた。「発生を誘導する役割をになう特定の領域が胚に存在する」という推論にたどり着き、その後の実験発生学の「形成体による誘導の概念」の出発点となった実験である。実験操作は、生きた胚を細い糸でくくり、発生の様子を調べるといった簡単な実験だが、成長していく過程が動的な生命のイメージにつながると考えた。

5 発生過程の観察と結紮実験の手順

授業は、次の①～④の順に進めた。

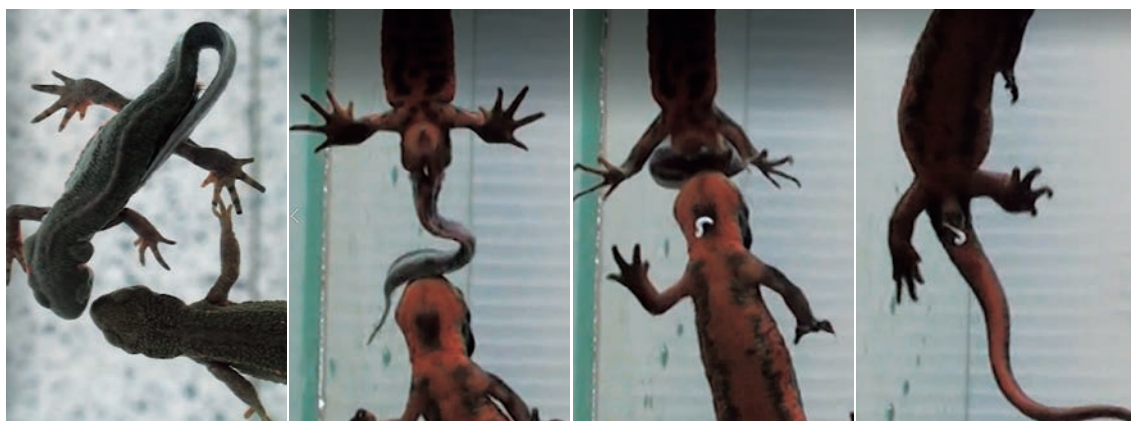


図2 アカハライモリの配偶行動

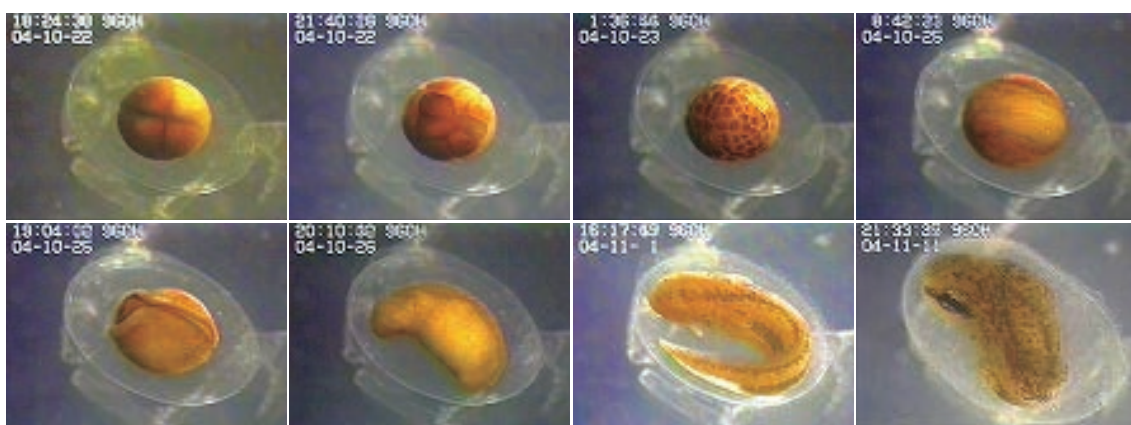


図3 タイムラプスビデオで見た発生段階

(1) アカハライモリの繁殖生態について紹介

雌雄の区別, 繁殖期 (春から初夏) と越冬期 (冬) の野外での様子と繁殖行動を紹介した。積雪下の溜まりで多数のイモリが群れて「イモリ玉」をつくっている様子, 配偶行動を自作ビデオ教材 (調査時に記録したビデオから編集) の放映を交えて説明した。

生徒は, 両生類は体外受精で, オスがメスに抱きついて, 産卵時に放精するイメージを持っていたので, 「オスがメスの鼻先で尾を振るようなディスプレイをしながら, 性フェロモンを出してメスを誘い, 反応したメスが追尾して, オスが放出した精包をメスが総排出腔に取り込む」という配偶行動 (図2) に特に興味を持っていた。

(2) 発生過程の全体像の把握 (映像教材を利用)

胚の動的变化の把握のため, タイムラプスビデオで記録した画像をデジタルに変換して, ソフト (Adobe Premiere) で編集して, 産卵から幼生になって孵化するまでの約20日間を“早まわし”映像に加工して, 15分のビデオ教材 (図3) を作成した。

作成したAviファイルをパソコンで再生すると, タイムスケールが表示されるので, 孵化までを全体時間に対してどの程度進行しているかわかる。桑実胚までの初期発生がいかに早く進んでいるかを理解することができる。また, 考察として, 映像に表示された時刻を目処に各発生段階 (2細胞期, 4細胞期, 神経胚) の所要時間を計算させることもできる。20℃で産卵から第一卵割開始ま

で6時間、第一卵割開始から胞胚初期まで1日を要する。21日目に孵化している。

ビデオ映像を見て、「教科書の図と同じだ」と声を上げる生徒もいたので、動きのある映像によって、発生過程のイメージを描くのに役立ったと考えられる。また、考察の計算については、動きのある映像から発生段階を判断する際にずれがあり、そのことが反映して数値的なばらつきはあったが、ほとんどの生徒は計算を完了し、初期の段階に要する時間が短いことは理解していた。

(3) 初期胚の観察およびスケッチ

排卵誘発で自然産卵させたいろいろな段階の生きた胚の観察をおこなった。発生初期の2細胞期や4細胞期は時間的に短いので、ちょうど授業時間内に観察できるようにする必要がある。

アカハライモリは、ゴナトロピン注射で産卵を誘発できる。アカハライモリではメスの貯精嚢内に保持している精子を排卵直前に体内で受精させる仕組みになっているので、産卵時を発生スタート（受精時）と考えて観察することができる。したがって、生徒に初期胚を観察させるには、第1卵割までに要する時間をさかのぼった時刻に産卵するようにゴナトロピン注射をすればよい。また、より正確な受精時間を設定したい場合は、メスに注射するゴナトロピンの量を多くし、体内に保持されている精子と受精しないように卵を絞り出してから、別に採取した精子を体外で受精させる。

ゴナトロピン注射の時間を設定して産卵時刻を授業に合わせる必要があるが、1匹が産卵すればクラス分は足りるので、予備として数匹準備すればばば間違いなく採卵できる。注射した後、メスは産卵場所となるテープ（荷づくりを使うPPテープを解いて細長く切ったもの）と小さな水槽に入れておけば、自然産卵する。手間はかからない（図4）。

授業の4日前にメスにゴナトロピン50単位（1,000単位を生理水に2 mL溶かした溶液0.1 mL）を注射をして室温約20℃で保持して、受精卵を準備する。注射後、イモリを入れた水槽にテ

プを入れておけば、それに卵を包む形で一つずつ産み付けるので、ピンセット（尖GGタイプ）でゼリーをしごくようにして、採取すれば卵を痛めることはない。また、卵を1個ずつ産むことから、1匹のメスが産む卵であっても、受精に時間的なずれが生じるので、異なった発生段階の胚を観察することができる。孵化までに要する日数は、飼育水温が上がるにつれて短くなる。15℃で約35日、20℃で約20日である。

透明なゼリーを通して、生きた胚の発生の様子ははっきり確認できる。ゴナトロピン注射による排卵誘発は、通常は50単位で十分であるとされるが、繁殖期以外の1～2月の時期には100単位2回の注射が有効である。通常は1～2回の注射後、数個から20個の受精卵を約1週間産み続け、総数で100個以上が採取できるが、1月から2月の時期ではやや産卵数が少ない。1匹のメスで1日置いて2回注射した場合の産卵数を表1に示す。



図4 アカハライモリの産卵行動

表1 1匹のメスで2回ゴナトロピン注射した場合の産卵数

	産卵数												総産卵数
	1/12	1/13	1/14	1/15	1/16	1/17	1/18	1/19	1/20	1/21	1/22		
A個体	1	15	11	7	4	3	2	2	0	2	0	47	
B個体	18	33	21	12	5	3	2	0	1	1	0	96	
C個体	0	1	8	7	6	11	3	2	1	0	0	39	
D個体	16	21	13	5	8	1	8	6	3	3	0	84	
	34	20	14	3	0	3	0	3	0	3	1	81	

※ゴナトロピン2回注射・23℃



図5 絹糸を使って結紮したアカハライモリの胚

(4) 胚の結紮実験

胚の結紮用に、最初は職場の同僚に無理をいって新生児の毛髪を提供してもらったが、結局うまくいかなかった。釣り用のテグスなどいろいろな素材を試したが、最後にたどりついたのが絹糸であった。絹糸は3本の糸をよっているのので、それを解いて、そのうちの1本を取り出して使う。最初に、糸で卵より少し大きめのループをつくり、その中央に卵をはめ込むように入れ、それから糸をピンセットで引っ張るようにしてしばる方法でなんとか成功した(図5)。

授業では15分しか時間が確保できなかったもので、成功した生徒は1割程度だった。放課後にもう一度試みたいという生徒も多くいたことから、生徒にとって好奇心をそそる実験になったと考えられる。

りの胚を実際に見て、映像や写真通りに卵割の形が見られて、とても面白かった」、「胚をしばる実験をおこなって、発生学というのは普段の生活の中からアイデアが浮かび、さまざまな角度から発生を見る学問なのかと思った」、「ビデオの時、集中力が切れそうだったけど何とか見ることができた。神経胚になってから孵化するまでの時間がかなりかかるのでびっくりした」、「歴史的な実験を体験できて、楽しかった」等の肯定的な意見も多くあり、多少、技術的には難しい実験でも、導入の仕方により、生徒にとって興味のある授業に展開していくことは可能だと実感した。

今考えると、何を使って胚をしばるかを生徒に考えさせたり、いろいろな発生段階の胚を使用したり、しばる方向を記録して実験すれば、体験するだけでなく、考察を深める実験にできたのではないかと反省している。

6 実験観察を通しての生徒の様子

生徒の自己評価をみると、意欲的に取り組めた生徒がほとんどで、前向きに取り組んだことがうかがえる。「卵割からいろいろな器官に分化する過程が理解できた」、「発生の仕組みに興味を持った」がともに86%であり、学習の動機づけにはなったようだ。一方、技術的には、「実体顕微鏡の操作が身についた」が81%、卵の結紮は、「うまくしばれた」が62%と少なかった。しかしながら、生徒の感想に「今まで映像で見てきたイモ

7 まとめ

アカハライモリは身近な存在であり、捕獲して教材に利用しても、野外の生息数に影響があつて生息数の減少を招くという心配は必要なかった。しかし、野生の両生類が、現在は、個体数を急速に減少している状況にある。両生類の「両生」とは、陸上でも水中でも生きることができるという意味ではなく、陸上と水中の両方がないと生きていけない、つまり陸上生活に移行したものの完全に適

応で、陸上と水中の両方の環境を必要とする仲間であることを意味する。「両生類」は、もともと水辺という不安定な場所に生息しているため、環境の変化や捕獲によるダメージを受けやすい生物である。実験終了後の成体をもとの場所に戻す配慮や、残った胚を育てて放すというような配慮も必要である。アカハライモリは関東を中心にほとんどの地域で保護しなければならない種に指定され、環境省レッドリストでも「準絶滅危惧 (NT)」の区分に入っている。ペットとして流通し、理科教材店でも入手できるが、積極的に保護しなければならない種でもある。その生態を理解することを推進し、個体数の減少につながらないような利用の仕方を考えることが大切だと考えている。アカハライモリは、再生力が強いことが有名だが、うまく管理すれば免疫力も強いので病気にもかかりにくく、30年以上飼育されたという記録もある。

これまでの動物実験に関する倫理委員会の規定は、爬虫類以上の脊椎動物の利用に制限がかけられてきたが、魚類や両生類についても準拠して扱うことを要求されるようになりつつある。生命倫理上の問題が出やすいので避けた方がいいとアドバイスをいただいたことがある。このような状況下で、高等学校の課題研究として脊椎動物をテーマにした発表が減っているように感じられる。生命の大切さを尊重し、自然保護の視点も勘案しながら、脊椎が完成していない時期の初期胚を扱うとか、個体追跡をして生態・行動を解析するなどのテーマを工夫して選べば、生命倫理規定をクリアして取り組めると考えている。生きている動物が好きで、発生する胚の美しさに感動したり、野外での生態調査を楽しみにしたりする生徒は多い。自分自身が生きている有尾類を観察し、実験することで、ワクワクする気持ちを得てきたのだから、その気持ちを生徒たちにも伝えたい。



8 ビデオ教材作成から 自分の研究テーマへ

授業で上映したビデオの撮影日は2004年10月22日から11月11日になっている。つまり、撮影したのは“秋”である。今まで両生類の繁殖期は春から初夏と考えていたのに、アカハライモリでは秋に正常な受精卵を産める状態にあることがわかった。なぜ、そのような状態にあるのかという疑問に残った。

2022年から高等学校で年次進行で実施される学習指導要領のキーワードは「探求」である。科学課題研究を教育活動として成功させるのは、教師が生徒の上位に座って一方的に指導することではなく、自分自身も研究を楽しむ立場で、生徒と同じ知識から出発してもいいと考え、テーマを共有して研究を進めることだと考えている。それが、真のアクティブラーニングを取り込んだ双方向的な教育につながるのではないだろうか。

「アカハライモリの秋から春をまたぐ多重交配」の謎を解く試みが自分自身の研究テーマにもつながっている。

【文献】

- 1) 山崎尚. 生物の科学 遺伝 43-9, 37-38 (1989).
- 2) 岡田節人・編. 脊椎動物の発生 (培風館, 1989).
- 3) 環境省・編. Red Data Book 2014—日本の絶滅のおそれのある野生動物—3 爬虫類・両生類 (2014).
- 4) 岡山県生物の実習 (岡山県高等学校理科協議会)
- 5) 生物学実習 指導資料 (岡山県高等学校理科協議会)
- 6) Akiyama, S., Iwao, Y., Miura, I. *Zoological Science* **28**, 758-763 (2011).



秋山 繁治 Shigeharu Akiyama

南九州大学 教授

1984年、ノートルダム清心学園清心女子高等学校教諭。2011年、広島大学大学院理学研究科生物科学専攻後期博士課程修了、博士 (理学) 取得。2016年より現職。専門分野は、理科教育、生殖生物学。

岡山県教育弘済会野崎教育賞 (1997年)、福武教育文化財団谷口澄夫教育奨励賞 (2007年)、平成基礎科学財団小柴昌俊科学教育賞奨励賞 (2014年)、読売教育賞理科教育部門優秀賞 (2015年)、日本動物学会動物学教育賞 (2017年)、読売教育賞カリキュラム・学校づくり部門最優秀賞 (2017年) を受賞。