

オオイタサンショウウオの完全飼育下での繁殖方法の開発を目指した科学課題研究

秋 山 繁 治

Scientific research aimed at developing methods in complete captivity of the Japanese Salamander *Hynobius dunni*

Shigeharu AKIYAMA

Abstract

Scientific research aimed at developing breeding methods for salamanders under complete captivity began in 2006 with the commencement of the Life Science Course, a Super Science High school (SSH) research-based project under the auspices of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology. The starting point of the research at our school was salamander breeding. Previous to the SSH project.

This research was conducted to determine the factors for successful breeding and growth of salamanders, in particular, *Hynobius dunni*. Human activity and its environmental impacts have led *H. dunni* to be classified as endangered according to the Ministry of Environment. Our research focuses on establishing more effective breeding methods in order to preserve endangered species such as *H. dunni*. We experimented to consider the following factors critical to preservation: environmental stimuli's effect on their maturation and survival rate, breeding habit observation, developmental stage charting and artificial insemination methods. The results of this research will give others a more effective approach for preserving currently endangered salamander species and species at risk of becoming endangered.

In addition, in this report we introduce a part of the transformation of female students who entered the Life Science Course along with the specific research methods and the significance of the results of breeding *H. dunni*, the subject of one focus of research.

<キーワード> 科学課題研究, 有尾類, 動物飼育, 人工繁殖, オオイタサンショウウオ

はじめに

有尾類の飼育は、1989年に一対のセトウチサンショウウオ *Hynobius setouchi* の卵囊が生物教室に持ち込まれたことから始まった。その後、生物部の活動としていろいろな種類の有尾類の飼育に受け継がれた。そして、「女子生徒の理系進学支援」を掲げて2006年に文部科学省スーパーサイエンスハイスクール事業（SSH）の指定を受けた。サンショウウオの世話はSSH主対象の生命科学コース1年生の放課後の日常的な活動となった。

本校のSSHの出発点は、生物部のサンショウウオの研究から始まったと言っても過言ではない。SSH事業では、学校設定科目「生命科学課題研究」を中心

に据えた教育プログラムを構築して実践してきたが、指定から10年を経過した今もサンショウウオを含む有尾類の研究は継続している。生徒たちは、生物は世話を怠ると死んでしまうということを肌で感じ、日常的に世話をする過程で研究テーマを見つけ、課題に取り組み、完成させることで研究の喜びを発見した。その延長線上に、いろいろな分野に展開していった今の課題研究の成果がある。

有尾類の飼育を始めて26年が経過した今、生徒たちが過ごす社会は、ますます日常的に自然に触れる機会を奪われ、野生生物に触れることが少なくなってきた。

研究への経緯

サンショウウオの仲間（有尾類）は、変態して成体になっても尾が残る両生類で、カエルの仲間（無尾類）ほどその存在について一般的には知られていない。その要因は、カエルのように活発に動くことも、声を出すこともなく、朽木の下や石の下、山奥の湿地や水溜まりといったあまり人目につかない場所でひっそりと生活しているからだと考えられる。水路工事や休耕など人為的な自然環境の改変によって、現在有尾類の仲間の生息数は急激に減少し、多くの種が絶滅の恐れがある状況にある¹⁾。

九州の両生類の調査や保全に関ったことがきっかけで、オオイタサンショウウオ *Hynobius dunni* の飼育に着手した。大規模な住宅造成工事などで生息環境を失い、限られた場所にかろうじて生き残った個体を保護する手だてがなく、移植して別の場所で生きる可能性にかけるしかないような状況を目の当たりして、「希少野生生物であるオオイタサンショウウオの保護には、生息する自然環境の保全だけでなく、その繁殖生態をよく知り、絶滅に瀕した際の手段として人工的な飼育下での繁殖方法も確立しておく必要がある」と考えたからだ。

本校生物部は、地元で生息するセトウチサンショウウオについての生息分布、繁殖環境の復元作業、飼育下での繁殖に取り組んできた経験をもっていたので、これまでの飼育経験を生かせば、環境省編『レッドデータブック2014』²⁾で「絶滅危惧Ⅱ類（VU）」に指定されているオオイタサンショウウオの飼育及び繁殖について有益な成果を期待できると考え、生徒の研究対象にすることを決めた。

目的

本研究は、サンショウウオという野生動物の繁殖方法の確立という長い年月を要する研究に取り組み、それを「女子生徒理系進学支援」に結び付けて教育プログラムを構築し、さらに研究で得た知見を希少野生動物保護に結び付けることを目指した。

人為的な環境の改変で激減している希少野生生物に指定されているオオイタサンショウウオの完全な飼育下での繁殖（受精卵から育てた個体での繁殖）方法を確立するという長期的に取り組まなければ到達できない目標を設定して、生徒の日常的な教育活動と学校設定科目「生命科学課題研究」をリンクさせた形で取り

組んだ。

高校生の課題研究であっても、オリジナリティがあり、将来科学分野に進む生徒にとって研究の基礎になるテーマを設定したいと考えた。また、本校は女子校であり、女子生徒の自然体験の少なさには驚くことがあるので、サンショウウオの研究をきっかけに、いろいろな動植物に抵抗なく触れ、手間をいとわず課題に取り組むことができる生徒に育って欲しいと考えた。サンショウウオの繁殖の研究については、以下のことが期待できる。

1. サンショウウオの飼育下での繁殖は、これまで困難とされており、飼育下の繁殖例が極めて少ない。繁殖方法の開発は、この種だけでなく近縁の種（*Hynobius*属：日本に38種が生息）の繁殖にも活かせる可能性が高い。
2. 生徒の研究において、発生段階図表の作成、幼生の成長に伴う生存率の変化、幼生の共食い、性成熟、飼育下の配偶行動の観察、人工受精の方法の開発など、多くの研究テーマを設定できる。
3. 環境省自然保護局『レッドデータブック2014 日本』の絶滅のおそれのある野生生物』に「絶滅危惧Ⅱ類（VU）」に指定されている種を扱うことで、他の多くの絶滅危惧種に目を向け、身近な環境に棲む生物を大切にしたい気持ちを育むことができる。
4. 今の社会では生命倫理的な視点で、脊椎動物を傷つけるような研究テーマを設定することは難しい。本研究が目指す繁殖方法は、動物を傷つけない範囲で考えており、動物の保護の観点でも教材開発になる。

方法

サンショウウオの仲間については、その生態の解明がほとんど進んでおらず、完全な飼育下での繁殖方法を確立するためには、克服しなければならない多くの問題があり、それをその時々を生徒の科学研究のテーマとして取り組んできた。「何を餌にするのか」、「どんな容器で飼育するのか」、「餌はどのくらい与えるのか」、「性成熟するまでどのくらいかかるのか」等の疑問のすべてが研究テーマになった。研究対象としたオオイタサンショウウオについても、レッドデータブック2014に「繁殖個体の平均年齢は不明であるが、飼育下では3年で性成熟した例がある」と記載されているだけである²⁾。

飼育下での繁殖方法を開発するためには、(1)成熟個

体になるまで安全に飼育する方法と(2)受精させる方法を確立する必要がある。飼育する方法を確立するために、(i)発生段階、(ii)幼生の飼育条件、(iii)性成熟に要する年数を調べた。また、受精方法については、希少野生動物なので、親個体を殺さないで行える(i)飼育ケース内での自然産卵、(ii)人工授精の2つの方法を試みた。

(1) 成熟個体になるまで安全に飼育する方法の検討

(i) 受精卵からの胚の発生段階を観察して記録する。

受精卵から成長していく過程を細部まで観察するためには、ゼリーの除去、いろいろな角度から観察、温度設定（発生の進行が温度によって変化する）、幼生を麻酔する方法などを検討して、卵を受精直後から胚が発生し変態して背鰭がなくなるまで観察し、クロサンショウウオの発生段階（岩澤）³⁾と比較した。

【方法】

- ① ゼリー層を除去した卵を水温18℃生理水10倍希釈液中で発生させ、孵化まで観察した。
- ② 幼生が餌を食べるようになると、集団飼育で共食いがおこり、手足が欠損する個体や異常に大きい共食い個体が出現して、時系列での成長の記録が取れないため、幼生5匹を個別に深皿シャーレに入れて水温18℃の温度で飼育し、観察した。
- ③ 幼生の背面と腹面からの観察は、麻酔をかけて観察した。
- ④ 上陸の判断は、飼育容器に少量の水と濡らした紙タオルを入れ、紙タオル（陸地）に上がった時を陸上生活の始まりとした。
- ⑤ 背鰭が完全になくなったときに観察を終了した。



写真左上の数字は発生段階（ステージ）を示す。ステージナンバーは、岩澤・山下（1991）に合わせている。

【結果】

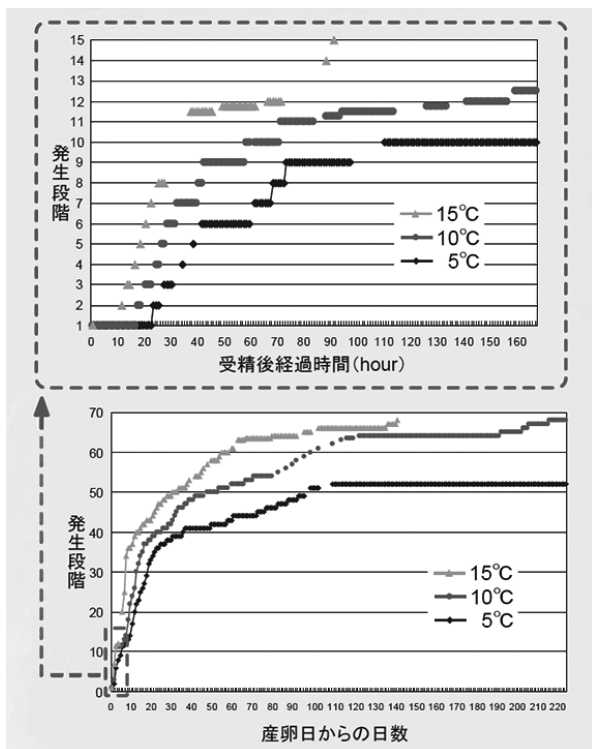
写真での発生段階表を完成することができた。

Stage41で孵化, Stage46で摂食を開始した。18℃で飼育して, 上陸するのに約80日を要した。

クロサンショウウオの発生段階図表³⁾との違いを確認した。

- ・クロサンショウウオはStage44で後肢原基が出現するのに対し, オオイタサンショウウオではStage47で出現した。
- ・Stage67でクロサンショウウオでは鰓と背鰭の縮小が同時に始まるが, オオイタサンショウウオでは背鰭の縮小が先で, 一週間遅れて鰓の縮小が始まった。そこで鰓の縮小前をstage67-1, 縮小後をStage67-2とした。
- ・クロサンショウウオではStage68に達した際に背鰭, 尾鰭, 鰓が全て退化していたのに対し, オオイタサンショウウオでは背鰭, 尾鰭は退化していたが, 鰓はまだ残っていた。

※下図は, 時間経過とともにどのように発生段階(stage)が進むかを示す)。



(ii) 幼生が変態するまで安全に飼育する条件を調べる。

【方法】

孵化後の幼生の時期の共食いが個体数を減らす大きな原因になっているので, 密度と餌のやり方で飼育条件(実験A～E)を変えて, 孵化直後から変態(最初に上陸する個体が出現する)まで飼育し, 個体数の

変化を記録した。最適な幼生の飼育条件を調べた。

〔実験A〕一定の大きさの容器532cm³ (19cm×28cm)で個体密度を変えて飼育

〔実験B〕1匹あたりの餌量が同じ条件で飼育

〔実験C〕餌の処理の仕方を変えて飼育

餌の処理の仕方による影響を調べるため, 次の3つの条件「無処理(通常どおり餌を与えたもの)」、「きざみ(餌を刻んで与えたもの)」、「飢餓(餌を与えないもの)」で, 開始時に60匹, 80匹, 100匹の設定で飼育した。

〔実験D〕実験Cの条件で頭胴長を測定

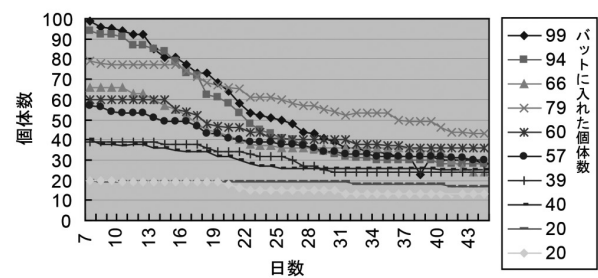
実験Cで, 孵化後63日目の幼生(無処理とキザミ)と, 孵化して31日目の幼生(飢餓)の頭胴長を測定した。

〔実験E〕飼育密度と四肢欠損状況固体の出現率

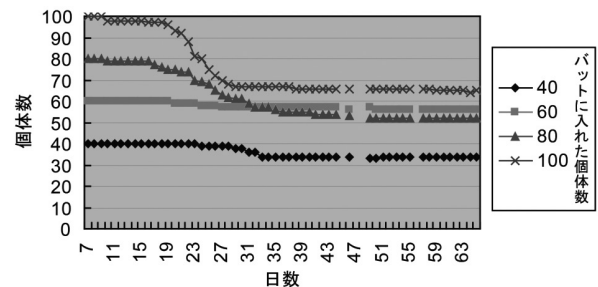
飼育密度を変えたバットごとに, 最初の上陸個体が出現したときの四肢欠損状況個体の出現率を調べた。

【結果】

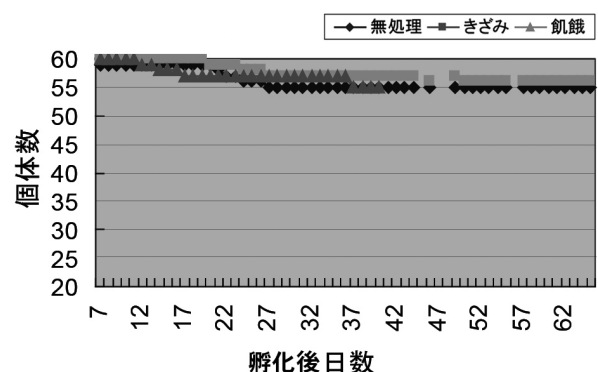
〔実験A〕

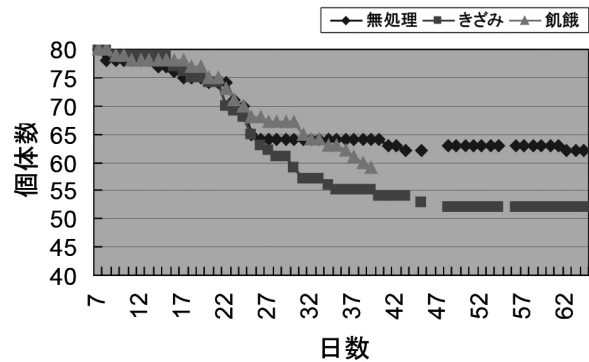
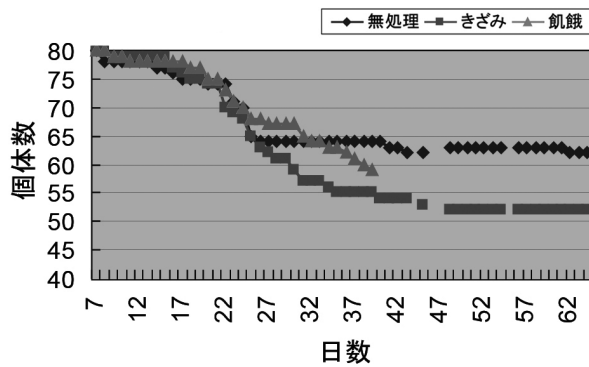


〔実験B〕

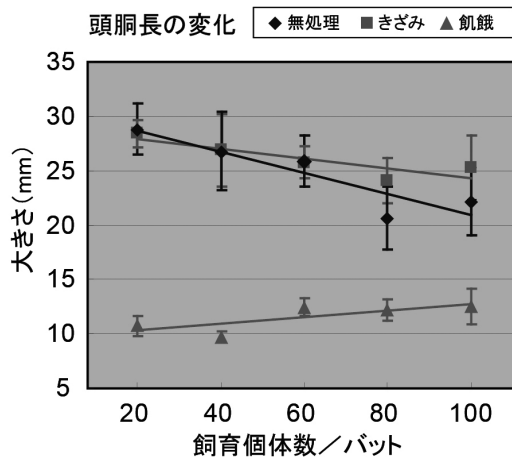


〔実験C〕

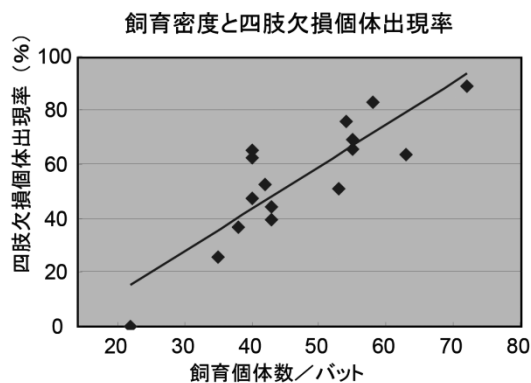




[実験D]



[実験E]



今回使用した容器では、幼生40匹の飼育条件が好ましいことが判った。高密度であると死亡率が高くなる

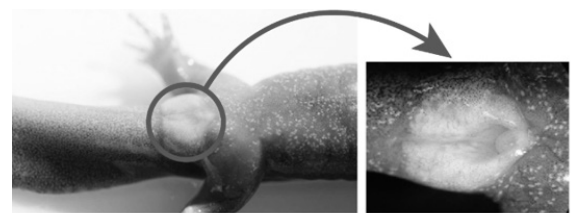
が、適切な量の餌を与え、水質の良い環境を保つことができれば個体数の減少を抑えられる。また、成長段階によって適切な餌のやり方があることや、高密度では、共食いの機会が多くなることもわかった。

(iii) 性成熟するのに何年かかるかを解明する。

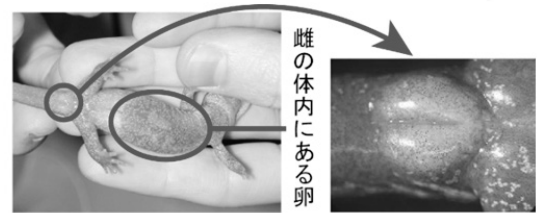
【方法】

何年で性成熟するかをつきとめるために、飼育してきた個体（2年目59匹、3年目32匹、4年目37匹、5年目41匹）にゴナトロピン注射をして、排卵するか、精子を出すかで雌雄の性成熟を確認した。

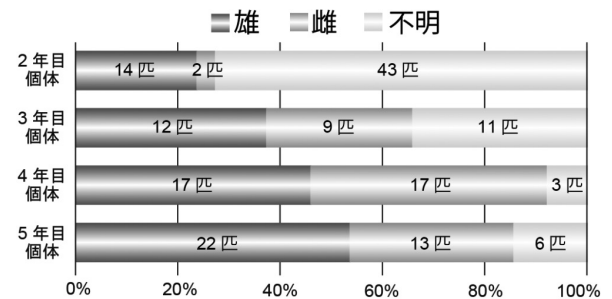
【雄雌の性成熟を判断するポイント】



繁殖期の雄



繁殖期の雌



・雌雄の判断は、ゴナトロピンを注射して、産卵すれば雌、精子を放出すれば雄とした。

【結果】

成熟にこれまで3年を要するとされていたが、飼育下では雌雄ともに2年で成熟する個体が出現することを確認した。逆に5年を経ても卵または精子を持っていない個体も存在することから、毎年すべての個体が繁殖に関わるわけではないことがわかった。

(2) 受精させる方法の検討

(i) 水槽内で自然産卵する条件をみつける。

【方法】

ゴナトロピンの雌への注射は、排卵してしまう量ではなく、性成熟した雌を興奮させ自然産卵に到らせるレベルの少量を入れる。そして、野外の繁殖環境を模した水槽で、あらかじめ入れておいた性成熟した雄と遭遇させて観察する。

- ① 雌の性成熟を判断し、ゴナトロピン50単位を注射する。
- ② 3本の竹ひごを打ち込んだ15cm × 10cm の合板を水槽に設置し、雄を入れる。
- ③ ゴナトロピン注射1日後、雌を水槽に入れる。
- ④ 高感度カメラを市販のHDレコーダーに取り付けて、産卵終了まで長時間継続して撮影する。夜間撮影できるように水槽に向けて赤外線灯光器も設置する。
- ⑤ 撮影した画像から配偶行動を分析する。

【結果】

産卵行動（単独産卵と連続産卵）を水槽で再現することに成功した。野外観察で、雄の枝にしがみ付く行

動を観察していたが、今回の観察から、雄が竹ひごにしがみ付く行動が、雌の産卵が近いことを判断する指標になることが判った。また、野外で卵囊の下に雄が隠れている場面に遭遇するが、繁殖行動に参加した雄が、そのまま卵囊の近くに縄張りを形成することもあった。

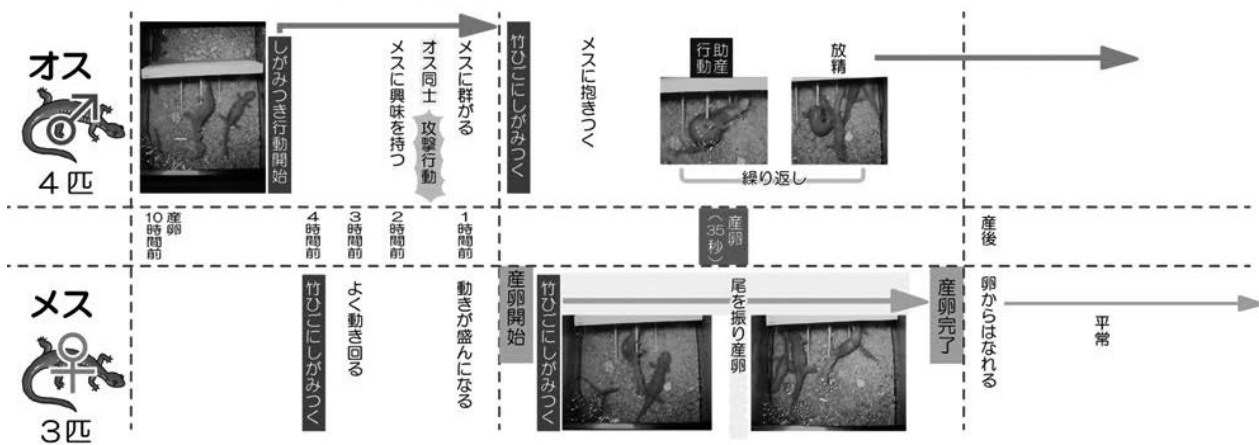
(ii) 人工授精で受精卵を得る方法を確立する。

雌にゴナトロピンを注射して排卵を誘発して、採取した卵囊の表面に雄から採取した精子を塗ることで受精させる。

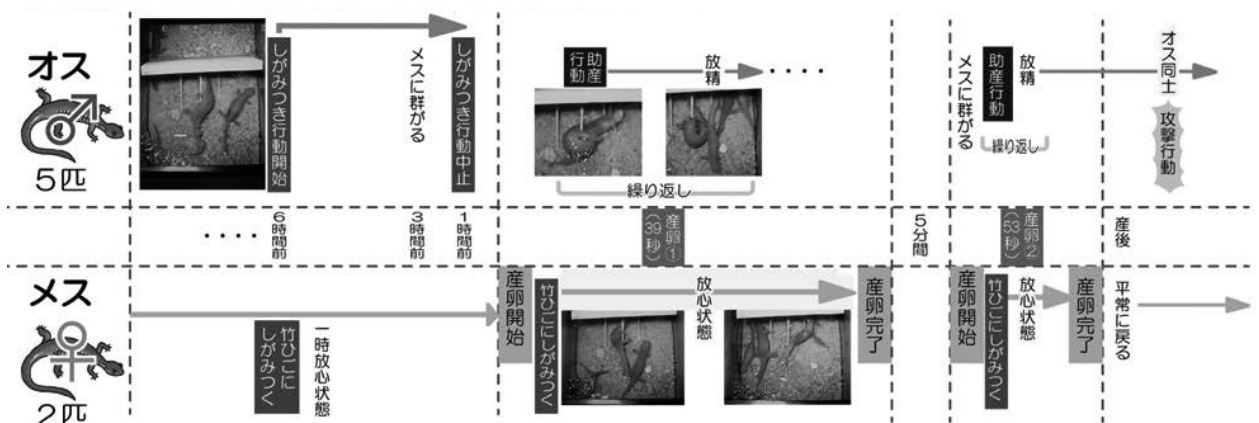
【方法】

- ① 性成熟した雌にゴナトロピン100単位を注射し、産卵を誘発する。
- ② 数日後、産卵間際になると、総排出腔に卵囊のゼリーの端が見えるので卵囊を引っ張り出して採取する。
- ③ 雄にも同様にゴナトロピン100単位を注射する。腹部から総排出腔に向かってしごくようにして精子を採取する。
- ④ 雄から採取したばかりの精子をガラス棒で卵囊に塗って受精させる。

【単独産卵】（雄と雌を遭遇させて13時間後に産卵）



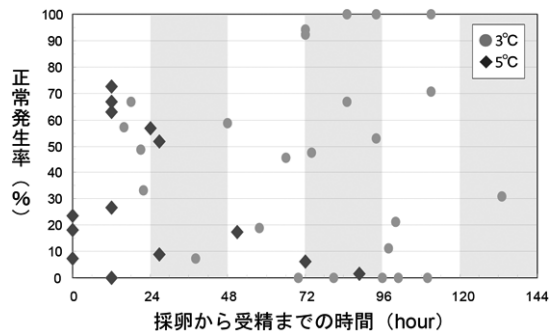
【連続産卵】（雄と雌を遭遇させて6時間後に産卵）



- ⑤ 採卵からの経過時間を変えた条件で受精させ、正常発生するかどうかを確認する。

【結果】

ゴナトロピン注射で、雌を殺さなくても人工授精できることを確認した。カエル目（アフリカツメガエルなど）では、排卵後の卵は数時間で受精能を失うが、最長で排卵後100時間以上経過しても正常に発生する場合があることがわかった。このことは、条件を整えて保管すれば、卵の受精能を低温条件で長時間保持できる可能性があることを示している。



研究成果のまとめ

1. オオイタサンショウウオの発生段階表は作成されていないが、写真版で完成させることができた。他種との違いも発見した。
2. 幼生の飼育では、適切な密度条件を設定すれば、赤虫のみで、幼生から産卵できる成体にまで成熟させることができることを確認した。
3. 性成熟に関しては3年を要するという定説に対して、雌雄とも2年で繁殖可能になる個体が出現することを確認した。
4. 卵からの完全な飼育個体で、水槽内で自然産卵させることに成功した。
5. 卵からの完全な飼育個体で、ホルモン誘発で摘出した卵嚢と採取した精子で人工授精に成功した。
6. カエルでは排卵後の卵は数時間で受精能を失うが、サンショウウオでは、低温条件で保持すれば、排卵後100時間以上経過しても受精できることを確認した。

オオイタサンショウウオの繁殖方法は、この種だけでなく近縁の種（同じHynobius属だけで日本に38種が生息）、日本爬虫両棲類学会標準和名リスト2022年3月29日版の繁殖にも活かせる可能性が高いと考えている。発生段階表の新規作成も含めて、基礎研究としての意義は大きいと考えている。

継続した研究が成り立つ条件

科学の世界では大きな発想の転換があるような研究が評価される傾向があるが、動物生態など野生動物を対象とする研究は、気の遠くなるような長い期間を要する。本研究でも卵から成熟個体になるまでに3年間の飼育を要した。また、繁殖に関わる研究は1月下旬から3月上旬しかできない。それ以外の期間は、個体を維持するために毎日の給餌作業が必要となる。それゆえに短期間で成果が要求される大学などの研究機関では扱われることは少ない。オオイタサンショウウオは、レッドデータブック2014の特記事項に「生物地理や地史を考えていく上で特に重要な種」とされながら、手間の割には成果が上がらない研究対象なのである。

また、研究には再現性のあるデータが必要で、そのためには多くの個体を維持することが必要になる。今回の性成熟の有無を確認する実験に使った個体数だけでも、成体169匹（総飼育個体数は倍以上）を使っている。高温や汚れた水が原因で大量死（容器内のすべての個体が一度に死亡）を起こすので、一度のミスが取り返しのつかない結果になるため、長い年月をかけて培われた飼育に関する細かい配慮が必要である。

また、結果の至るまでには、その背後に多くの試行錯誤が山積している。例えば、人工授精では、体外受精を「卵を水に浸して、精子をその水に溶かす」という方法をまずは思いつく。しかしながら、水で濡れた卵嚢では何回試みても受精しなかった。卵嚢に直接雄から搾り取った精子を薄めないで直接塗ることによってやっと人工授精を成功させていることができた。人工授精の結果を示すグラフ上の1つ1つのドットは、雌から自身で排卵する前に水に濡らさないように注意深く卵嚢を採取し、授精させるときにちょうど精子が出る状態にしておいた雄から採集した精子を水に濡らさない状態で受精させているのである。38回の人工授精を試みた結果と考えれば、どれだけの飼育個体数と手間がかかっているかを推測していただけたと思う。

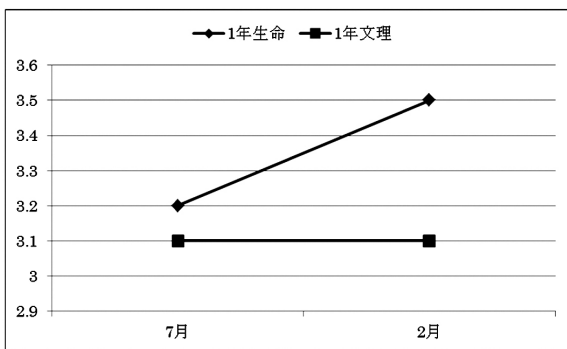
現在、生物教室で多くのオオイタサンショウウオを飼育しているが、すべて受精卵から育てたもので野外で採取した成体はいない。現在まで研究を続けることができたのは「継続的な飼育によって必要な個体数を保持してきた」からである。野生生物の飼育は「餌として何を与えるか」から始まって、試行錯誤の連続であった。受精卵から成体まで育てることができるという経験を生徒同士で先輩から後輩へと受け継いだことが、飼育下の繁殖方法を確立できた理由である。

課題研究の教育的効果

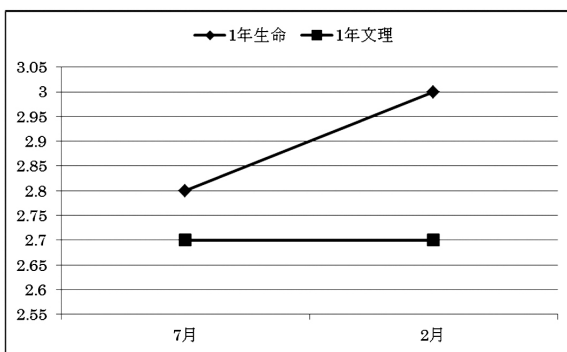
サンショウウオの研究は、生命科学コース2年生の学校設定科目「生命科学課題研究（2単位）」を履修する生徒を中心に取り組んでいるが、1年生では全員が日常的な活動として飼育（餌やり）を担当し、3年生では希望者が部活動として2年生で取り組んだデータで継続して研究できる形にしている。

生命科学コースに入学以来、毎日のようにサンショウウオに関わって学校生活を送ってきた1年生が、1年間でその意識がどのように変わったのだろうか。飼育をしていない文理コースの生徒と比較して、7月と2月の2回のアンケートを見てみたい。意識のレベルを1～4で答える問いで、「学習で新しい興味を持った」、「答えだけでなく考え方が大切」の結果を平均値で示した。

問. 「学習で新しい興味をもった」



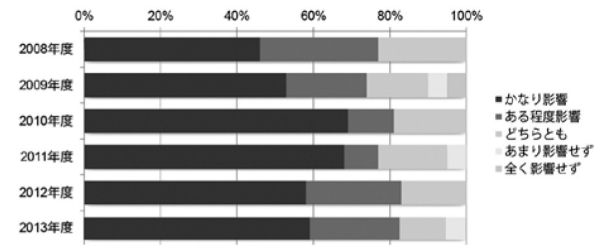
問. 「答えだけでなく考え方が大切」



課題研究の指導をすると、生徒が科学研究を本当に好きかどうかがよくわかる。そして、前向きに真面目に取り組んだ生徒は、本人が納得した進路に進んでいく。課題研究の指導でもっとも大切なのは、本当に好きなことを見つける機会を与え、実感させることだと考えている。高校3年の段階で、課題研究に取り組んだことが進路に役立ったかどうかを問うたアンケート結果である。約8割の生徒が進路に影響したと肯定し

ている。

「課題研究活動」の進路への影響（高3対象・12月）



課題研究は、生命科学コースの設置（2006年）以来継続して取り組んでいるので、研究にストーリーが生まれ、先輩から後輩に研究が継承されていく形になり、技術が進歩し、研究内容を深化させることができていると実感している。

生命科学コースを設定する前は、科学研究の成果を学校外で発表することなど全く考えられなかったが、設定後3年目でSSH生徒研究発表会（科学技術振興機構理事長賞を受賞）という大きな舞台を経験した後、研究レベルが急激に上がり、成果がでるようになった。これまでに、SSH生徒研究発表会で科学技術振興機構理事長賞2回、日本学生科学賞入賞3回、JSEC入賞3回、化学グランドコンテスト入賞1回等の全国レベル大会で入賞できるようになり、英語教育センターの女子校でも、課題研究を柱にした教育プログラムの開発によって、10年間でここまで科学研究で成果を出せる学校に変容することが可能だということを証明できたと考えている^{4) 5)}。

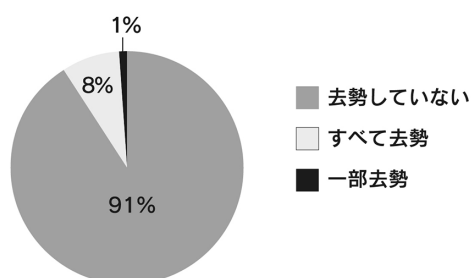
動物飼育生徒への影響

生命科学コースの生徒全員を飼育に関わらせていて感じることは、ペットを可愛がることはあっても、自分で責任をもって飼育した経験がある生徒は非常に少ないということである。動物との関わりから生命の尊さを学ぶということで小学校に動物が飼われているという話は耳にするが、現状はどうなっているのだろうか。

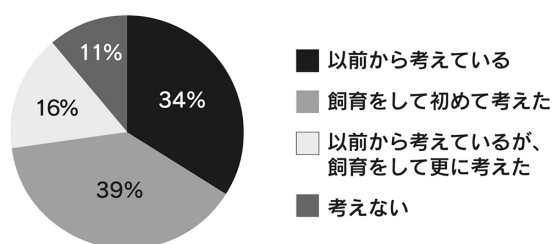
小学校の理科の教科目標には、「問題解決の能力と自然を愛する心情を育てる」という記載がある。また、生活科には、動物飼育が設定されている。そこで、本校1年生に総合的な学習の時間の宿題として、出身小学校を訪問して調査レポートを作成することを課してみた。そのレポートから「生徒たちに飼育動物との思い出が非常に少ないことを実感した。次の段階として、生徒と協力して、「学校飼育動物」についての現状を知るために、岡山県内の小学校にアンケート調査を実施した。この調査で、飼育状況が明らかになって

きた。一例として一番多く飼われているウサギの飼育状況を取り上げると、ウサギの雌雄を区別できない学校が54%、雌雄混合飼育が65%、雄の非去勢手術率が91%であった。飼育数が40羽の学校もあった。ウサギは繁殖力が旺盛で、雄はなわばりをもつという特徴に配慮する必要があるが、現状は、雌雄を区別できない学校が多く、避妊しないで雌雄を混在させて飼っているのがわかった。教師でさえ理解が十分でない状態で飼っているので、動物たちを有効な教材として生かし切れていないことが理解できる⁶⁾。

【質問】 ウサギのオスは去勢しているか。



【質問】 貴重種の重要さや環境保護について考えるようになったか。



本校の生命科学コースでは、全員が入学して1年間は放課後日常的に両生類の世話をすることになっている。両生類の飼育に関わってからの変化をアンケートから分析すると、飼育を経験することによって、「気持ち悪い」という気持ちが減り(80%→16%),「可愛い」と思うようになり(31%→77%),貴重種の重要さや、環境保護について考えることについては、上のグラフのような結果を得ている。

2013年度版『子ども・若者白書』で「近年、子どもの体験活動の場や機会の減少が指摘されている。例えば自然体験活動についてみると、学校以外の公的機関や民間団体が行う自然体験活動への小学生の参加率は、どの学年でもおおむね低下しており、小中学生の中で自然体験をほとんどしたことがない者が1998年と比較して2009年は全般的に増加している」とある。

『理科離れしているのは誰か』(松村泰子編)では、理科実験で男子が中心的役割をすることが多く、女子

に積極性が低下していく傾向が強いことが報告されている。直接実験に参加する機会の少なさが理科嫌いをつくっているとしたら、女子の理科好きを増やすためには、より多くの実験・実習を盛り込んだ課題研究のような教育プログラムが必要になっていると確信している⁷⁾。

参考文献

- 1) 秋山繁治. 有尾類の保護を考える. 岡山県自然保護センターだより (岡山県自然保護センター). Vol. 14(3). p1-6 (2005).
- 2) 『レッドデータブック 2014・日本の絶滅のおそれのある野生生物3 爬虫類・両生類』自然環境研究センター. 環境庁自然保護局野生生物課希少種保全推進室 (2014)
- 3) 岩澤久彰・山下香. 「クロサンショウウオの発生段階図表」爬虫両棲類学雑誌, 14(2):39-62(1991).
- 4) 秋山繁治. S S H指定から7年, その成果と課題. 大学時報(私立大学連盟) No. 352. p44-51. (2013)
- 5) 清心女子高等学校. 『平成23年度指定 S S H 研究開発実施報告書第4年次』(2015)
- 6) 鈴木美有紀・秋山繁治 (2010). 岡山県下の小学校での学校飼育動物の現状. 動物飼育と教育第12号 (全国学校飼育動物研究会) vol. 12. p3-10 (2010).
- 7) 村松泰子編『全国中学生調査のジェンダー分析・理科離れしているのは誰か』(2004)