

有鱗目の多様化機構解明に向けた  
トカゲ類の発生学的基盤研究

2021 年

奥山 健太郎

目次

**第1章 序論**

I. 有鱗目の多様性 .....	3
II. 形態的多様化と進化発生学的研究 .....	5
III. 有鱗目の鋤鼻器官について .....	6
IV. 本研究の内容 .....	7
図表 .....	8

**第2章 有鱗目トカゲ類2種を用いた発生学的基盤研究**

I. 序論 .....	10
II. 材料と方法 .....	14
1. ニホンカナヘビ胚試料の収集 .....	14
2. ヒガシニホントカゲ胚試料の収集 .....	15
3. 胚試料の形態観察 .....	16
III. 結果 .....	17
1. ニホンカナヘビの産卵後発生段階 .....	17
2. ヒガシニホントカゲの産卵後発生段階 .....	17
IV. 考察 .....	18
図表 .....	23

**第3章 有鱗目の鋤鼻器官とその関連構造の関係性の進化史**

I. 序論 .....	37
-------------	----

II. 材料と方法 .....	39
1. 組織切片標本の作製および形態観察 .....	39
2. 祖先形質状態推定 .....	41
III. 結果 .....	42
1. ニホンカナヘビの鋤鼻器官および関連構造の形態的特徴 .....	42
2. ニホンカナヘビの鋤鼻器官および関連構造の胚発生過程 .....	42
3. 有鱗目の鋤鼻器官と関連構造の関係性の祖先形質状態 .....	43
IV. 考察 .....	51
1. カナヘビ科の鋤鼻器官関連構造の形態的特徴 .....	51
2. ニホンカナヘビの鋤鼻器官関連構造の胚発生過程 .....	52
3. 有鱗目の鋤鼻器官関連構造の進化史 .....	53
図表 .....	58
<b>第4章 総論</b>	
I. 有鱗目トカゲ類の多様化機構解明に向けて .....	72
II. バイオセラピー学の理念における本研究の位置づけ .....	75
謝辞 .....	78
引用文献 .....	79
摘要 .....	103
Summary .....	109

# 第1章 序論

## I. 有鱗目の多様性

生物多様性とその創出機構の理解は、生物学の主要な命題の一つである。有鱗目 (Squamata) はトカゲ類、ヘビ類、ミミズトカゲ類を含む分類群であり、共通祖先が三疊紀後期からジュラ紀に誕生した後、現在までに現生爬虫類の 95 % 以上を占める総計約 11,000 種にまで多様化しており、四肢動物の中で最も多様化した分類群の一つである [図 1, (Jones et al., 2013; Simões et al., 2018; Uetz et al., 2020)]。南極大陸を除く地球上の全ての大陸と大部分の島嶼に分布し、あらゆる環境に適応した著しい生態的、生理的、形態的多様性を有する (Vitt et al., 2003; Vitt and Caldwell, 2014)。また、生態系の構成要素としての食性の幅広さも注目に値する。大部分の種は肉食性であり、無脊椎動物から小型、中型脊椎動物まで多様な餌資源を捕食するが、中には餌資源を特定の動物群のみに依存する種も存在する。一方で草食性や雑食性の種も存在するなど、動物群全体としての食性は多岐にわたる。これらのことから、有鱗目の適応進化機構は地球上の生物多様性の成立、特に我々ヒト *Homo sapiens* を含む羊膜類が如何にして陸上環境へ適応放散してきたかを理解するために非常に重要であり、形態学、生態学、分子生物学など様々な研究分野がその解明に取り組んできた。

有鱗目の系統進化については、Camp (1923) が提案したトカゲ類の分類体系を基盤とし、長年にわたって形態形質情報に基づく系統解析が行われてきた (Estes et al., 1988; Conrad, 2008; Gauthier et al., 2012)。近年の大規模な分子系統解析の結果は、かつてそれぞれ単系統群であると考えられていたトカゲ亜目 (Lacertilia)、ヘビ亜目 (Serpentes)、ミミズトカゲ亜目 (Amphisbaenia) のうち、ヘビ亜目とミミズトカゲ亜目それぞれの単系統群がトカゲ類の一部から発生したことを共通して示すなど、形態形質による系統分類が伝統的に認めてきた系統関係の不確実性を指摘している

(Townsend et al., 2004; Vidal and Hedges, 2005; Pyron et al., 2013; Burbrink et al., 2020)。有鱗目はその多様化の進化史において様々な特徴の平行進化を経てきたことが知られており、それらの代表的な例には四肢の喪失 (Raynaud, 1990; Greer, 1991)、卵胎生あるいは胎生の繁殖機構の獲得 (de Fraipont et al., 1996; Pyron and Burbrink, 2014; Watson et al., 2014) などがある。

日本国内の有鱗目は計 10 科 33 属 76 種の在来種が知られており、その内訳はトカゲ類 5 科 15 属 37 種 (および 8 亜種) とヘビ類 5 科 6 亜科 18 属 39 種 (および 13 亜種) である (日本爬虫両棲類学会, 2020)。これらのうちトカゲ類 29 種・亜種とヘビ類 33 種・亜種は日本列島や琉球諸島のみで生息する固有種であり、さらにトカゲ類 28 種・亜種およびヘビ類 19 種・亜種は国際自然保護連合の発行する IUCN レッドリストで何らかの絶滅の危険性があるとされている。世界的に見ると、爬虫類を利用した人間の経済活動には、ワニ類や大型ヘビ類の皮革製品への利用や、様々な種の食用資源としての利用がある。また、ペットとしても利用されており、様々な国や地域の爬虫類が比較的大きな産業規模のもと国際的に取引されている。国内では、スッポン *Pelodiscus sinensis* の食用あるいは薬用資源としての利用や、マムシ *Gloydius blomhoffii* やハブ *Protobothrops flavoviridis* などの薬用資源としての利用例がある。国内のマムシやハブを除く有鱗目もまたペットとして流通する例があり、複数の種が国内外の市場で売買されている。特に琉球列島のトカゲ類では、ペットとしての需要から野生個体群に高い採集圧がかかり、生息地の破壊による個体数の減少に追い打ちをかけている現状がある (若尾, 2018)。

なお、上述の通りトカゲ亜目 (Lacertilia) という分類群は、分岐分類学的にはミミズトカゲ亜目 (Amphisbaenia) およびヘビ亜目 (Serpentes) を内包する側系統群である。そこで本稿ではヘビ類およびミミズトカゲ類を除く有鱗目を総じてトカゲ類と呼称し、

ミミズトカゲ類およびヘビ類はそれぞれ亜目と呼称した。また、爬虫綱 (**Reptilia**) は分岐分類学的には側系統群であるが、本稿ではカメ目、ワニ目、ムカシトカゲ目、有鱗目を含む単系統群を爬虫類と呼称した。

## II. 形態的多様化と進化発生学的研究

脊椎動物の形態的多様性は、発生過程における形態形成メカニズムの差異に基づき生じてきた。それゆえ形態的多様化の過程を理解するためには、種間や動物群間で発生過程を比較し、その共通性と特殊性の両面を明らかにする必要がある。魚類、両生類、哺乳類、鳥類などの動物群では、発生過程に関する知見が十分に蓄積されている上、全ゲノムや全トランスクリプトーム情報など分子生物学的知見が整備されたモデル動物が確立されており、それらを用いた形態形成機構解明を目的とする進化発生学的研究が盛んに行われている。進化発生学的視点に基づき種あるいは動物群間で胚の比較解析を行うにあたり、まず重要になるのは、胚発生過程を対象動物間で標準化することである。爬虫類や鳥類の胚発生は温度などの外的要因の影響を大きく受けるため、同種であっても同じ速度で進行しない場合がしばしば観察される (Billett et al., 1985)。それゆえに個体発生に要する期間は種間で大きく異なり (Birchard and Marcellini, 1996)、受精あるいは産卵後の期間を種間で共通した胚発生の進行度の指標とすることはできない。そこで、鳥類や爬虫類の各分類群では分類群内および分類群間の発生過程の比較を可能にするために胚の外部形態的特徴を基準とした発生段階が定義され、それら定義に基づいて様々な種の発生段階における形態的特徴が観察されてきた。発生段階定義の代表的なものには、鳥類では Hamburger and Hamilton (1951)、ワニ目では Ferguson (1985)、カメ目のうち潜頸亜目ウミガメ上科では Miller (1985)、ウミガメ亜目を除く同亜目のカメ類では Yntema (1968) などがある。また、有鱗目を

対象とした発生学研究では、Dufaure and Hubert (1961) によるトカゲ類の発生段階定義や、Zehr (1962) によるヘビ類の発生段階定義が広く用いられている。しかし、依然として有鱗目を対象とした発生学的研究は他の脊椎動物群と比較して少なく、同分類群内の特異な形態的特徴の形成機構や種の多様性をもたらした発生機構の大部分は未解明である。

### III. 有鱗目の鋤鼻器官について

あらゆる動物は種々の感覚器官により外界の刺激を受容して環境を認識し、その生命活動を営んでいる。それゆえ感覚器官の進化は適応的な生存戦略の構築にも重要な役割を担ってきたと考えられる。中でも嗅覚器は、遠隔化学刺激を受容することにより環境認知を司る。四肢動物の嗅覚系は、互いに解剖学的に独立した主嗅覚系と鋤鼻系の二つに大別される。主嗅覚系の感覚器である嗅上皮が嗅覚神経を主嗅球へ投射する一方、鋤鼻系の感覚器である鋤鼻器官は鋤鼻神経を副嗅球へ投射する (Parsons, 1970; Bertmar, 1981; Trinh and Storm, 2003; Taniguchi et al., 2011)。鋤鼻器官の感覚上皮は、同種他個体に生理的な反応を引き起こす化学物質であるフェロモンなどを受容し、繁殖行動をはじめとする種内個体間コミュニケーションに重要な役割を担う (Brennan and Zufall, 2006; Woodley, 2010)。そのため、同器官は種の分化や維持に重要な役割を担うと考えられている。

多くの有鱗目は四肢動物の中でも特に発達した鋤鼻器官を持つ。フェロモン受容による種内コミュニケーション行動のみならず、採餌行動や外敵の回避行動などその生態の様々な側面で同器官に依る化学受容に大きく頼っていることから、鋤鼻器官の進化は有鱗目の多様化や適応進化に非常に重要な役割を担ってきたと考えられている (Kubie and Halpern, 1979; Graves and Halpern, 1990; Cooper, 1994; Huang et al., 2006)。有

鱗目の鋤鼻器官の進化史は、同器官を用いた化学受容行動の指標となる *tongue-flicking* 行動の頻度 (Baeckens et al., 2017a) 、同器官およびその関連構造と生態的特徴の関連性 (Schwenk, 1993; Filoramo and Schwenk, 2009) 、鋤鼻受容体配列の多様性 (Brykczynska et al., 2013; Kishida et al., 2019) など様々な視点から研究されてきた。

#### IV. 本研究の内容

本研究は有鱗目の多様性に注目し、以下の二つの視点からその多様化機構の解明に貢献する新たな知見を与えることを目的とした。本稿第 2 章では、有鱗目トカゲ類のうち発生過程に関する基礎的知見が未だ充実していない二科の種について、産卵後の一連の発生段階を定義した。また、それらトカゲ類の産卵後胚発生過程で観察された特徴を他のトカゲ類と比較して、今後の進化発生学的研究におけるモデル動物としての活用の可能性について述べた。第 3 章では、有鱗目の生態の様々な側面で重要な役割を担う鋤鼻器官の機能的関連構造の形態的多様性に着目した。まず、トカゲ類 1 種のこれら器官構造の形態的特徴を組織学的に観察した。次に、同種のこれら器官構造の胚発生過程を観察した。さらに、先行研究で観察された形態的特徴に関する知見の混乱を網羅的に整理統合し、これら器官構造間の関係性の多様化の進化史を明らかにした。

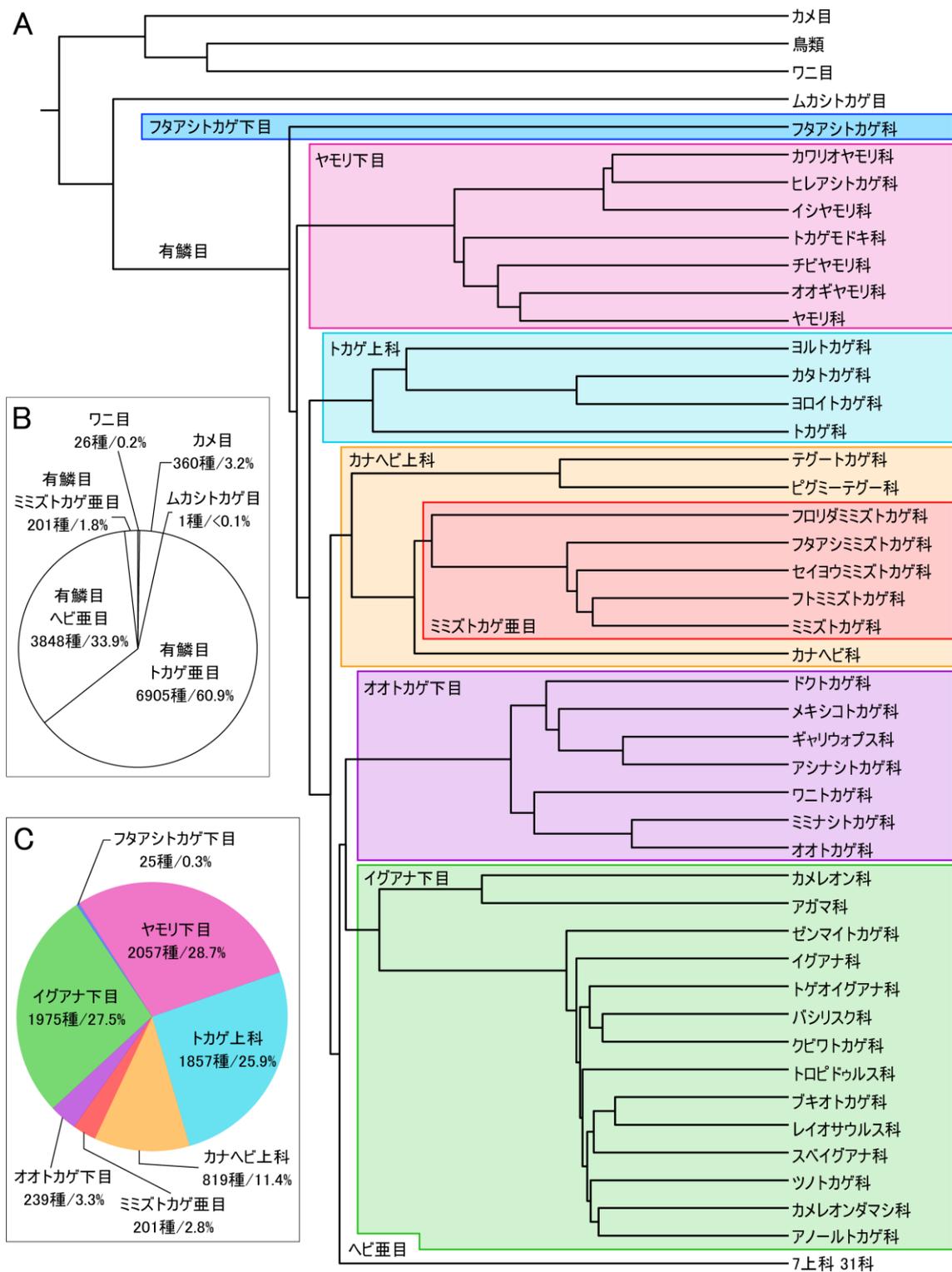


図 1-1. 爬虫類の系統関係と有鱗目の種多様性. A: 爬虫類の分子系統樹. Zheng and Wiens (2016) より改変し, トカゲ類のみ科名を示した. B: 爬虫類内の各目と有鱗目の各亜目に含まれる種数およびその全体に占める割合. 種数は The reptile database (Uetz et al., 2020) に従った. C: トカゲ類内の上科以上の各分類単位に含まれる種数とその全体に占める割合. 種数は The reptile database で提供されている “Reptile species checklist 14 Dec 2020” に従った.

表 1-1. 本研究で用いた有鱗目の分類体系と、トカゲ類およびミミズトカゲ類の各分類群の和名.

Squamata 有鱗目	
Lacertilia トカゲ亜目 (トカゲ類)	Lacertilia トカゲ亜目 (トカゲ類)
Dibamia フタアシトカゲ下目	Iguania イグアナ下目
Dibamidae フタアシトカゲ科*1	Chamaeleonidae カメレオン科*1
Gekkota ヤモリ下目	Agamidae アガマ科*1
Carphodactylidae カワリオヤモリ科	Leiocephalidae ゼンマイトカゲ科
Pygopodidae ヒレアシトカゲ科*1	Iguanidae イグアナ科*2
Diplodactylidae イシヤモリ科*3	Ioplocercinae トゲオイグアナ科*2
Eublepharidae トカゲモドキ科*1	Corytophanidae バシリスク科*2
Sphaerodactylidae チビヤモリ科*3	Crotaphytidae クビワトカゲ科*2
Phyllodactylidae オオギヤモリ科*4	Tropiduridae トロピドウルス科*2
Gekkodae ヤモリ科*1	Opuluridae ブキオトカゲ科*2
Scincoidea トカゲ上科	Leiosauridae レイオサウルス科
Xantusiidae ヨルトカゲ科*1	Liolaemidae スベイグアナ科*4
Gerrhosauridae カタトカゲ科*1	Phrynosomatidae ツノトカゲ科*2
Cordylidae ヨロイトカゲ科*1	Polychrotidae カメレオンダマシ科*4
Scincidae トカゲ科*1	Dactyloidae アノールトカゲ科*4
Lacertoidea カナヘビ上科	Amphisbaenia ミミズトカゲ亜目
Teiidae テグートカゲ科*1	Rhineuridae フロリダミミズトカゲ科*1
Gymnophthalmidae ピグミーテグー科*1	Bipedidae フタアシミミズトカゲ科*1
Lacertidae カナヘビ科*1	Blanidae セイヨウミミズトカゲ科*4
Anguimorpha オオトカゲ下目	Trogonophidae フトミミズトカゲ科*1
Ielodermatidae ドクトカゲ科*1	Amphisbaenidae ミミズトカゲ科*1
Xenosauridae メキシコトカゲ科*3	Serpentes ヘビ亜目
Diploglossidae ギャリウオプス科*1	
Anguidae アシナシトカゲ科*1	
Shinisauridae ワニトカゲ科*3	
Lanthanotidae ミミナシトカゲ科*1	
Varanidae オオトカゲ科*1	

分類単位は Zhang and Wiens (2016) に従った. \*1: 爬虫類の進化第 2 版 (疋田, 2012) より和名を引用; \*2: 爬虫類の進化第 2 版 (疋田, 2012) の亜科名を参考に和名を決定; \*3: 動物系統分類学第 9 巻下 B<sub>2</sub> (松井, 1992) の亜科名を参考に和名を決定; \*4: 動物系統分類学第 9 巻下 B<sub>2</sub> (松井, 1992) の属名を参考に和名を決定.

## 第2章 有鱗目トカゲ類2種を用いた発生学的基盤研究

### I. 序論

有鱗目トカゲ類の産卵種では、様々な分類群において母個体が自身の生理状態や周辺の環境条件により受精卵を卵管内に留めて産卵を遅らせる卵保持という繁殖戦略をとるため、産卵のタイミングが種内で異なる (Shine, 1983; Braña et al., 1991; Rodríguez-Díaz and Braña, 2011)。それゆえに、産卵から孵化までの孵卵期間が種内で容易に変動する。表 2-1 に示した通り、トカゲ類を対象とした発生学的研究では、Dufaure and Hubert (1961) による発生段階定義 (DH ステージ) が広く用いられてきた。一方、近年の研究の一部は Werneburg (2009) により提案された Standard Event System を用いている。また、Billy (1988)、Sanger et al. (2008)、および Kuriyama and Hasegawa (2017) はそれぞれ独自の発生段階基準を用いて発生段階を記述した。さらに Noro et al. (2009) および Gregorovicova et al. (2012) は、各孵卵日数における胚の外部形態を記述している。近年、進化発生学的研究における不可欠かつ強力なツールである全ゲノム情報と発生過程の情報を整備するプロジェクトがアノール *Anolis carolinensis* (Sanger et al., 2008; Eckalbar et al., 2013)、ソメワケササクレヤモリ *Paroedura picta* (Noro et al., 2009; Hara et al., 2015; 2018)、フトアゴヒゲトカゲ *Pogona vitticeps* (Georges et al., 2015; Whiteley et al., 2017; Ollonen et al., 2018) を用いて行われており、これらの知見は将来的に有鱗目を用いた四肢動物の進化発生学的研究に大きく貢献すると期待される。このような状況においても、以下に述べる理由からトカゲ類を対象とした発生学的研究の基礎的知見は未だ十分とは言えない。

トカゲ類では、発生段階の定義に用いられる外部形態的特徴の発生順序が科レベルの各クレイド内では保存される傾向にある一方で、クレイド間では一様に進行しな

い場合がある (Andrews et al., 2013)。それら発生順序の差異は、形態形質による系統解析および分子系統解析に基づく系統関係を反映していない (Skawiński and Borczyk, 2017)。そのため、発生過程の比較解析を行うために DH ステージなど共通の発生段階定義を適用するには、分類群の違いによる発生順序の差異を理解しておかなければならない。これらのことから、トカゲ類を研究材料に用いた進化発生学的研究の基盤を整備するにあたっては、各科を網羅した発生段階の観察、定義が行われることが望ましい。しかし、現在 40 科以上に分類されているトカゲ類のうち、発生過程の観察が十分に行われているのは 14 科に留まる (表 2-1)。

本研究では、ニホンカナヘビ *Takydromus tachydromoides* (有鱗目カナヘビ上科カナヘビ科) およびヒガシニホントカゲ *Plestiodon finitimus* (同目トカゲ上科トカゲ科) の産卵後胚発生を観察し、一連の発生段階を定義することを目的とした。また、有鱗目を用いた発生学的研究が活発に行われない原因の一つに、多くの種で繁殖に季節性があり年間に得られる産卵数あるいは産子数が少ないために、十分な個体数の胚試料が入手し難いことも挙げられる (Noro et al., 2009)。この問題は確かに研究計画上の障害となり得るが、飼育繁殖上の工夫により解決できる場合も多い。そこで、これらトカゲ類 2 種の産卵後胚発生の特徴を明らかにし、それらのモデル動物としての活用の可能性についても議論した。

ニホンカナヘビは日本固有種であり、北海道、本州、四国、九州および周辺の島々に生息する (疋田, 2012)。その繁殖生態は様々な側面から研究されており、雌の卵管内における卵生成 (Inukai, 1930)、産卵および孵化 (Ishihara, 1964)、個体の体サイズおよび年齢と繁殖能力との関係性 (Telford, 1969)、雌個体の体サイズの増加と性成熟との関係性 (Takenaka, 1980)、異なる体サイズ、年齢、個体群の個体間における繁殖戦略の差異 (Takenaka, 1981a)、雌個体の体サイズや個体年齢と繁殖特性の関係性

(Takenaka, 1981b)、温度性決定の有無 (Oka, 1996) などについての報告がある。さらに Oka (1971) は、特に咽頭弓の発生に注目して本種の産卵後の初期-中期咽頭胚期 (DH ステージ 25-30) を観察した。本種を除くカナヘビ科の種を対象として、Dufaure and Hubert (1961) は卵胎生種であるコモチカナヘビ *Zootoca vivipara* の初期から後期までの一連の発生過程を観察して発生段階を定義した。また、Inukai (1927) はコモチカナヘビの神経胚期までの初期発生を観察した。同科の卵生種を対象としたものでは、*Lacerta agilis* の発生初期から孵化直前の発生後期までの発生過程 (Peter, 1904)、*Podarcis muralis* および *Lacerta viridis* の産卵直後から孵化までの発生過程 (Dhouailly and Saxod, 1974) が観察されてきた。しかし、カナヘビ科の卵生種における一連の DH ステージの観察、定義は行われていない。

ヒガシニホントカゲは国内では伊豆半島および伊豆諸島を除く本州北東部、本州中央部、北海道および周辺の島々に、国外ではロシア連邦の沿海地方およびハバロフスク地方の沿岸部に生息し、近年の研究により本州西部、四国、九州に生息するニホントカゲ *Plestiodon japonicus* および伊豆半島や伊豆諸島に生息するオカダトカゲ *Plestiodon latiscutatus* とは別種であることが判明した (Okamoto and Hikida, 2012)。これら 3 種の繁殖生態についてはニホントカゲ京都個体群 (Hikida, 1981) およびオカダトカゲ三宅島個体群 (Hasegawa, 1984; 1985; 1990) についての報告があり、ヒガシニホントカゲを含むこれら 3 種では母個体が自身の卵を孵化まで保護し世話をする生態を持つ。これら先行研究のうち Hasegawa (1984) は、母個体の世話の有無による孵化率の差異を野外で調査した。また、Kuriyama and Hasegawa (2017) はオカダトカゲの産卵後胚発生を観察し、外部形態的特徴からステージ 1-12 の 12 発生段階を定義した。これら 3 種を除くトカゲ科の種を対象とした発生学的研究としては、近縁種シナトカゲ *Plestiodon chinensis* を研究材料に用い、孵卵条件が胚発生および幼体の表現型などに及

ぼす影響が盛んに調査されている (Qu et al., 2014; Shen et al., 2017; Ma et al., 2018; 2019) 。さらに、*Trachylepis megalura* の原腸胚期までの初期発生 (Pasteels, 1956) 、*Trachylepis capensis* の頭蓋形成過程 (Skinner, 1973) 、*Liopholis whitii* の骨格形成過程 (Hugi et al., 2010) 、*Hemiergis* 属の四肢形成過程 (Shapiro, 2002; Shapiro et al., 2003) などが観察されてきた。しかしトカゲ科がトカゲ類の中で最も多くの種を含む科にも関わらず、同科の種の一連の産卵後発生過程の観察は Kuriyama and Hasegawa (2017) におけるオカダトカゲの観察に限られている。

## II. 材料と方法

### 1. ニホンカナヘビ胚試料の収集

神奈川県厚木市の東京農業大学農学部厚木キャンパス内で野生個体を採集し、同キャンパスの野生動物学研究室動物飼育舎で飼育繁殖して受精卵を収集した。オス1-2個体とメス3-5個体を同一のガラスケース (幅 × 奥行 × 高さ = 60cm × 30cm × 26cm) で混合飼育した。各飼育ケースの底には赤玉土と水苔を混合したものを約 3 cm の深さになるように敷き、飲水用の皿や身を隠すためのシェルターを配置した。産卵床として、湿らせた水苔を敷き詰めた皿に植木鉢を被せたものを 2 個ずつ設置した。飼育室の温度は  $27.0 \pm 2.0$  °C に保ち、照明条件は 12 時間明期: 12 時間暗期に設定して、飼育ケースの約半分の面積に 1 日あたり 8 時間、UV-B 100 ライト (GEX 26W) を照射した。

飼育環境の乾燥を防ぐため、1 日 1 回以上、ケース内に霧吹きで水を散布した。また、本種は飼育下で皿などに満たした水よりも壁面に付着した水滴を好んで飲む傾向にあるため、霧吹きを用いて水滴を壁面に付着させた。2019 年度以前は養殖業者から購入した体長 1.0 cm 前後のヨーロッパイエコオロギを冷凍保存しておいたものを解凍し、栄養補助剤としてカルシウム+ビタミン D3 パウダー (GEX, PT1856) およびマルチビタミンパウダー (GEX, PT1860) をまぶして与えた。冷凍保存しておいた餌のみを与えた場合にも、約 3 か月間の繁殖期間中に個体の衰弱や繁殖行動の異常などが起こることは稀であった。しかし同様の餌を約半年間程度与え続けた場合、くる病あるいは甲状腺異常によく似た症状を呈す個体がしばしば観察された。そのため、2020 年度は養殖業者から購入したコオロギを飼育し、それらに栄養補助剤をまぶして与えた。

研究期間において、交尾は 4 月上旬から 7 月下旬まで、産卵は 4 月下旬から 8 月上旬まで観察された。本種の交尾はオスがメスの胴体部分に噛みついた状態で行われるため、交尾後の雌の腹部や背部には V 字型の噛み跡が残った。繁殖期間中は 1 日 2

回、V字型の噛み跡の有無を確認し、交尾が行われたと判断した日付を記録した。毎日午前中と午後に飼育ケース内を確認し、受精卵が確認された場合には回収して、Ishihara (1964) において最も高い孵化率を導いた孵卵温度条件である 28.0 °C に設定したインキュベータ (和研薬 Model-9200) 内で孵卵した。産卵後経過日数 0–33 日間の胚試料合計 247 個体を収集し、形態観察に用いた。

## 2. ヒガシニホントカゲ胚試料の収集

2020 年 5 月下旬から 6 月中旬にヒガシニホントカゲ雌個体 5 個体を採集した (表 2-2)。全ての雌個体は採集時点で交尾していた。“1. ニホンカナヘビ胚試料の収集”と同様の飼育環境条件、給餌条件および照明条件で各個体を単独飼育し、飼育室の温度は  $27.9 \pm 0.8$  °C に、湿度は 60–70 % に保った。雌個体は同年 6 月初旬から 7 月中旬に合計 57 個の受精卵を産卵した。母個体の卵の世話が胚発生に与える影響を調査するため、受精卵を約半数ずつ二つの孵卵条件下で発生させた (表 2-2)。受精卵は本種と同属のシナトカゲ *Plestiodon chinensis* において高い孵化率を導く孵卵温度条件である約 28 °C (Shen et al., 2013) で孵卵した。受精卵計 30 個は発見後すぐに回収し、胚試料の回収直前まで  $28.0 \pm 0.2$  °C のインキュベータ内で発生させた。一方、残る受精卵 27 個は  $27.9 \pm 0.8$  °C の飼育ケース内において母個体の世話の下で発生させ、回収時以外は飼育者が手を触れないよう注意した。産卵後経過日数 0–25 日間の胚試料計 57 個体を形態観察し、発生中止胚および奇形胚を除いた計 53 個体の胚試料を発生段階定義に用いた (表 2-2)。

二つの孵卵条件間の胚の正常発生率の差異は Fisher の正確検定により調査した。また、二つの異なる孵卵条件が胚発生の進行度に影響を与えるかどうか、すなわち孵卵条件間で各産卵後経過日数の胚試料の DH ステージが異なるかどうかを、共分散分

析により調査した。これら統計解析は統計ソフト EZR (Kanda, 2013) を用いて行った。

### 3. 胚試料の形態観察

受精卵をリン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline: PBS) で満たしたシャーレ内に置き、実体顕微鏡 (Leica MZ6) 下で胚試料を取り出した。胚試料の周囲の羊膜、漿膜、卵黄囊などを取り除き、PBS で 10 % に希釈したホルマリン液中で固定した。続いて各胚試料の外部形態的特徴を実体顕微鏡下で観察し、Dufaure and Hubert (1961) の定義に従い発生段階 (DH ステージ) を決定した。発生段階の決定にあたっては、発生段階の種間比較を行った Wise et al. (2009) および各発生段階の決定基準となる外部形態形成過程の種間比較を行った Lima et al. (2019) を参照した。ヒガシニホントカゲの DH ステージは、Kuriyama and Hasegawa (2017) の発生段階 (KH ステージ) 1-12 と対応付けた。各器官形態の解剖学的名称は獣医発生学用語 (改定・2 版) に従った。

DH ステージ 26-34 のニホンカナヘビ胚の顕微鏡写真は、実体顕微鏡 (Leica M205FA) に取り付けられたデジタルカメラ (Leica DFC450 C) を用いて撮影した。DH ステージ 35-38 のニホンカナヘビ胚および DH ステージ 32-38 のヒガシニホントカゲ胚の顕微鏡写真は、デジタル顕微鏡 (Keyence VHX-S550) を用いて撮影した。DH ステージ 39-42 のニホンカナヘビおよびヒガシニホントカゲ胚の写真は、一眼レフカメラ (Nikon D7100) を用いて撮影した。

実験動物の飼育および個体試料の取り扱いは、東京農業大学動物実験委員会の承認を受けた研究計画に準拠し、同委員会の策定する動物実験に関する指針に従って実施された (承認番号: 280121; 290137; 300104) 。

### III. 結果

#### 1. ニホンカナヘビの産卵後発生段階

産卵後経過日数 0–33 日間の胚試料の外部形態を観察した結果、DH ステージ 26–42 の一連の発生段階が同定された。産卵後経過日数と DH ステージの進行の関係を図 2-1 に示した。また、各発生段階の胚試料の外部形態的特徴を図 2-2 から図 2-4 および表 2-3 に示した。本研究で観察されたクラッチサイズは 1–7 卵、平均 2.82 卵であった。孵化までの孵卵日数は 26–33 日間であり、平均 28.7 日間 (標準偏差 = 2.36) であった。

#### 2. ヒガシニホントカゲの産卵後発生段階

本研究で得た計 57 個の卵は全て受精卵であった。クラッチサイズは 10–13 卵であり、平均 11.4 卵 (標準偏差 = 1.14) であった。全ての雌個体が、湿らせた水苔を敷き詰めた産卵床ではなく、シェルターの下側の床材を掘って巣を作り、産卵した。インキュベータ内で孵卵した卵から得られた計 30 個体の胚試料のうち、4 個体は発生が中止していたか奇形であった一方、飼育ケース内で母個体の世話の下で孵卵した卵から得られた計 27 個体の胚試料は全て正常に発生した (表 2-2)。しかし、Fisher の正確検定の結果、これら胚の正常発生率に孵卵条件間での有意な差は認められなかった ( $p = 0.114$ )。

産卵後経過日数 0–25 日間の胚試料計 53 個体の外部形態を観察した結果、DH ステージ 32–42 の一連の発生段階が同定された。産卵後経過日数と DH ステージの進行の関係を図 2-5 に示した。また、各 DH ステージの胚試料の外部形態的特徴を図 2-6 および表 2-4 に示した。孵化までの孵卵日数は 24–25 日間であり、平均 24.25 日間 (標準偏差 = 0.43) であった。共分散分析の結果、孵卵条件間で各産卵後経過日数の胚試料の DH ステージに有意な差異は認められなかった ( $p = 0.440$ )。

#### IV. 考察

ニホンカナヘビ、ヒガシニホントカゲの両種で、同一の孵卵期間を経た胚であっても、発生段階はクラッチ間で異なっていた (図 2-1 および図 2-5)。一方、同一クラッチの受精卵から得られた胚の発生段階は孵卵期間に関わらず一定であった。この特徴は Muthukkaruppan et al. (1970) において示されたアガマ科 *Calotes versicolor* の結果と同様であり、発生学的研究において同一の発生進行度の胚試料を複数収集するために有用である。

両種の外部形態的特徴の発生順序の大部分は DH ステージの定義に用いられたコモチカナヘビおよび他の多くのトカゲ類と類似していた。しかし、コモチカナヘビの色素形成は体鱗形成開始以前の DH ステージ 35 に開始するのに対し (Dufaure and Hubert, 1961)、ニホンカナヘビの色素形成開始時期は体鱗形成の開始以降の DH ステージ 38 であった (図 2-4)。多くのトカゲ類において、体表面の色素形成は体鱗や爪の形成が開始して指間組織が完全に退行する DH ステージ 38 前後に開始する (Lima et al., 2019)。そのため、コモチカナヘビにおける色素形成開始時期はトカゲ類の中で特徴的に早く、一方でニホンカナヘビの同開始時期はトカゲ類の中では一般的であると考えられるが、同じくカナヘビ科の *Lacerta agilis* の色素形成開始時期は体鱗の形成開始以前である (Peter, 1904)。そのため、カナヘビ科の種における同開始時期がトカゲ類の中では比較的早い傾向にある可能性も残されている。また、ヒガシニホントカゲの色素形成は、コモチカナヘビと同様に体鱗形成開始以前の DH ステージ 36 に後肢の外背側面から開始した。オカダトカゲでも色素形成は体鱗形成以前に開始するが、同種では指間組織が完全に退行する KH ステージ 6 (DH ステージ 37 に相当) 以前に胴体の外背側部から開始する (Kuriyama and Hasegawa, 2017)。Py-Daniel et al. (2017) はイグアナ下目の近縁な科間で色素形成開始時期が異なることを指摘したが、少なくとも

カナヘビ科およびトカゲ科では同開始時期が科内の種間で異なる。特にヒガシニホントカゲとオカダトカゲは非常に近縁であり一部地域では側所的に分布するにも関わらず、2種間で色素形成の開始時期および開始領域が異なることは興味深い。本研究で観察したヒガシニホントカゲの胚試料は2地点で採集した計5個体の雌個体から得られたもののみであり、Kuriyama and Hasegawa (2017) で観察されたオカダトカゲの胚試料は伊豆諸島の神津島および八丈島の個体である。両種の近縁性を踏まえると、今後これらの種の様々な地域個体群の胚試料を比較することで発生過程の地域変異が観察され、そのうちいずれかの地域個体群の胚試料で互いに類似した発生過程が観察される可能性がある。

本研究では Ishihara (1964) および Shen et al. (2017) を参考にニホンカナヘビおよびシナトカゲで孵化率が最大になる 28 °C の温度条件下で受精卵を孵卵し、平均孵卵期間はそれぞれ約 28 日間と約 24 日間であった。トカゲ類の孵化率が最も高くなる孵卵温度条件は種間で異なるが、一般に好適な孵卵温度域は 25–30 °C である。孵卵期間は高温条件下では短く、低温条件下では長くなり、各研究で孵卵温度条件が異なるために直接的に比較することはできないものの、多くの先行研究で示されたトカゲ類の孵卵期間は 60 日間前後である (Birchard and Marcellini, 1996) 。孵卵期間が 30 日間以内のトカゲ類は複数の系統に散見されるが、現在知られているトカゲ類の中では *Anolis* 属トカゲ類の孵卵期間が特徴的に短く、22–27 日間である (Sanger et al., 2008) 。本研究で観察した2種の孵卵期間はこの *Anolis* 属トカゲ類に匹敵する長さであった。ヒガシニホントカゲを含む *Plestiodon* 属に注目すると、シナトカゲの孵卵期間は 28 °C の温度条件下で約 24 日間であり (Shen et al., 2017) 、アオスジトカゲ *Plestiodon elegans* の孵卵期間は 27 °C の温度条件下で約 28 日間である (Du et al., 2003) 。このことは、同属の種では共通して孵卵期間が短いことを示唆する。このように、本研究で観察し

た 2 種のトカゲ類は産卵後の胚発生の進行が速く孵卵期間が短いため、目的の発生段階の胚試料を短期間に入手することができる利点を持つ。

多くのトカゲ類において、産卵時点の発生段階は中期咽頭胚期にあたる DH ステージ 28–30 に相当する (Shine, 1983; Wise et al., 2009)。DH ステージ 27 以前で産卵するトカゲ類としては、ヤモリ科ソメワケササクレヤモリ *Parodeura picta* (Noro et al., 2009)、テグー科 *Salvator merinae* (Iungman et al., 2019)、*Aspidoscelis uniparens* (Billy, 1988)、イグアナ下目アガマ科 *Calotes versicolor* (Muthukkaruppan et al., 1970)、アノールトカゲ科 *Anolis spp.* (Sanger et al., 2008)、カメレオン科 *Chamaeleo lateralis* (Blanc, 1974)、および後述する複数のカナヘビ科の種などが知られている。本研究では 10 クラッチの産卵後経過日数 0 日のニホンカナヘビ胚試料 26 個体を観察し、それらのうち 18 個体の発生段階が DH ステージ 27、6 個体の発生段階が DH ステージ 26、2 個体の発生段階が DH ステージ 28 であった。DH ステージ 28 である胚試料は単一のクラッチからのみ得られたため、これは卵保持により産卵が遅れたことで観察されたものと考えられた。そのため、本種は良好な環境条件下では比較的初期の咽頭胚期にあたる DH ステージ 26 あるいは 27 で産卵すると考えられた。また、他のカナヘビ科の種のうち、*Lacerta viridis* と *Podarcis muralis* の産卵当日の発生段階は DH ステージ 26 である (Dhouailly and Saxod, 1974)。また、*P. bocagei*、*P. hispanicus*、*P. muralis*、*L. viridis*、*L. schreiberi* は DH ステージ 27 以前で産卵し、中でも *P. muralis*、*P. bocagei*、*P. hispanica* は DH ステージ 22–25 で産卵した例が報告されている (Braña et al., 1991)。このようにカナヘビ科には初期–比較的初期の咽頭胚期に産卵する種が複数知られており、同科の産卵のタイミングは他のトカゲ類と比較してやや早い傾向にあると考えられる。トカゲ類の胚発生において肢芽形成が開始するのは DH ステージ 27 であり、多くのカナヘビ科の種は同ステージ以前に産卵する。そのため、同科の種では産卵後胚発生にお

いて一連の四肢形成過程を観察できる可能性が高く、トカゲ類の四肢の発生研究の好適な研究材料となり得る。

Oka (1971) で観察されたニホンカナヘビ胚の産卵後の発生段階のうち、最も早い発生段階は DH ステージ 25 であった。Oka (1971) の個体採集地は明記されていないが、同研究では野外で既に交尾した雌個体を採集して飼育し、それらが産下した受精卵のみを用いている。そのため、本研究と Oka (1971) の結果が異なったのは、本研究で母個体が卵保持を行ったためであると考えられる。一方で、ニホンカナヘビの異なる個体群の雌個体では繁殖期間内の産卵回数、クラッチサイズや卵重量などが異なる場合があるため (Takenaka, 1981a)、本種では個体群により産卵のタイミングが異なる可能性も考えられる。本種の胚発生過程の特徴として、地域差の有無は現時点で不明であり、今後、繁殖戦略の地域差と関連付けながら検証していく必要がある。

本研究で観察した 5 クラッチのヒガシニホントカゲの産卵後経過日数 0 日の胚試料は、全て DH ステージ 32 であった。この結果は、オカダトカゲの産卵後経過日数 1 日の胚試料の発生段階が DH ステージ 32 (KH ステージ 1) であることや、シナトカゲの産卵時点の胚試料の平均 DH ステージが 32 であること (Qu et al., 2014; Shen et al., 2017; Ma et al., 2018) と類似している。このことから、*Plestiodon* 属では後期咽頭胚期の DH ステージ 32 前後で産卵が起きると考えられる。本研究ではヒガシニホントカゲ胚を二つの孵卵温度条件下で発生させたが、条件間で胚の正常発生率に有意な差は認められなかった。しかし、Hasegawa (1985) はオカダトカゲの母個体の世話が卵の孵化率に与える影響を野外で調査し、母個体が保護し世話をした卵の孵化率が約 91.5% であった一方、母個体を取り除いて発生させた卵の孵化率が約 4% であったと報告している。同研究は、野外で母個体による保護および世話を欠いた卵の孵化率が著しく減少する要因として、土壌動物などを含む捕食者や天候条件の影響を挙げている。ヒガ

シニホントカゲ (表 2-2) およびシナトカゲ (Ji and Zhang, 2001; Du et al., 2003; Shen et al., 2017; Ma et al., 2018) で母個体と隔離してインキュベータ内で発生させた胚の正常発生率および孵化率が 80 % 以上であることは、Hasegawa (1985) の指摘を裏付けている。また、野外でオカダトカゲ母個体の保護下で発生した卵の孵化率 (91.5 %) は、他の様々なトカゲ類と比較しても顕著に高い (Turner, 1977; Hasegawa, 1985)。加えて、本研究で母個体から隔離して発生させたヒガシニホントカゲ胚の正常発生率 (86.7 %) が同様に発生させたシナトカゲの孵化率 (約 80–90 %) と類似していたのに対し、飼育ケース内で母個体の世話の下で発生した胚の正常発生率は 100 % であった。これらのことは、少なくともヒガシニホントカゲおよびオカダトカゲで母個体の何れかの行動に胚の正常発生率を向上させる効果があることを示唆する。本研究の飼育期間中、ヒガシニホントカゲの母個体が覆いかぶさるように卵を保護し、時折それらを舐めたり、啜って数センチほど移動させたりする行動が産卵直後から孵卵期間を通じて観察された。これら行動は胚の正常発生率の向上に関与する可能性があり、今後母個体の詳細な行動観察を行う必要がある。本研究で比較観察に用いた胚試料数は十分に多いとは言えず、ここで示した結果の信頼性を高めるためには、さらに多くの胚試料を用いた比較観察が必要である。これら種はトカゲ類の中では比較的クラッチサイズが大きいいため、母個体の卵の世話という行動が真に胚の正常発生率を 100 % 付近まで向上させるとすれば、発生学的研究にとって非常に有用な研究材料となり得るだろう。

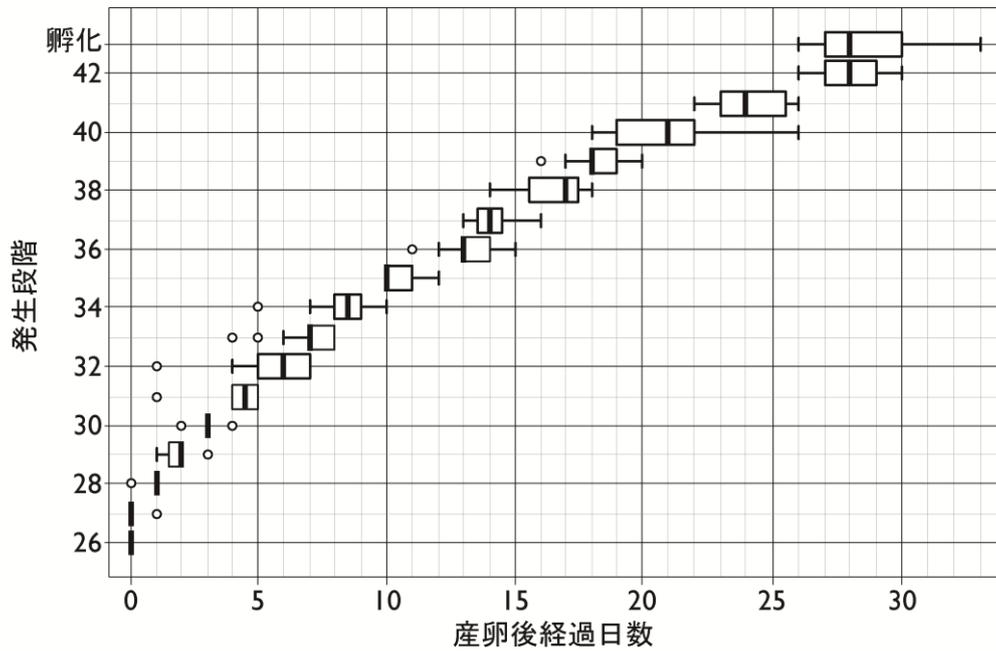


図 2-1. ニホンカナヘビの産卵後経過日数と発生段階 (DH ステージ) の関係. 箱ひげ図の垂線は中央値を, 箱の左端と右端はそれぞれ第一四分位と第三四分位を, ひげは外れ値を除く最大値から最小値の範囲を, 丸は外れ値を示す.

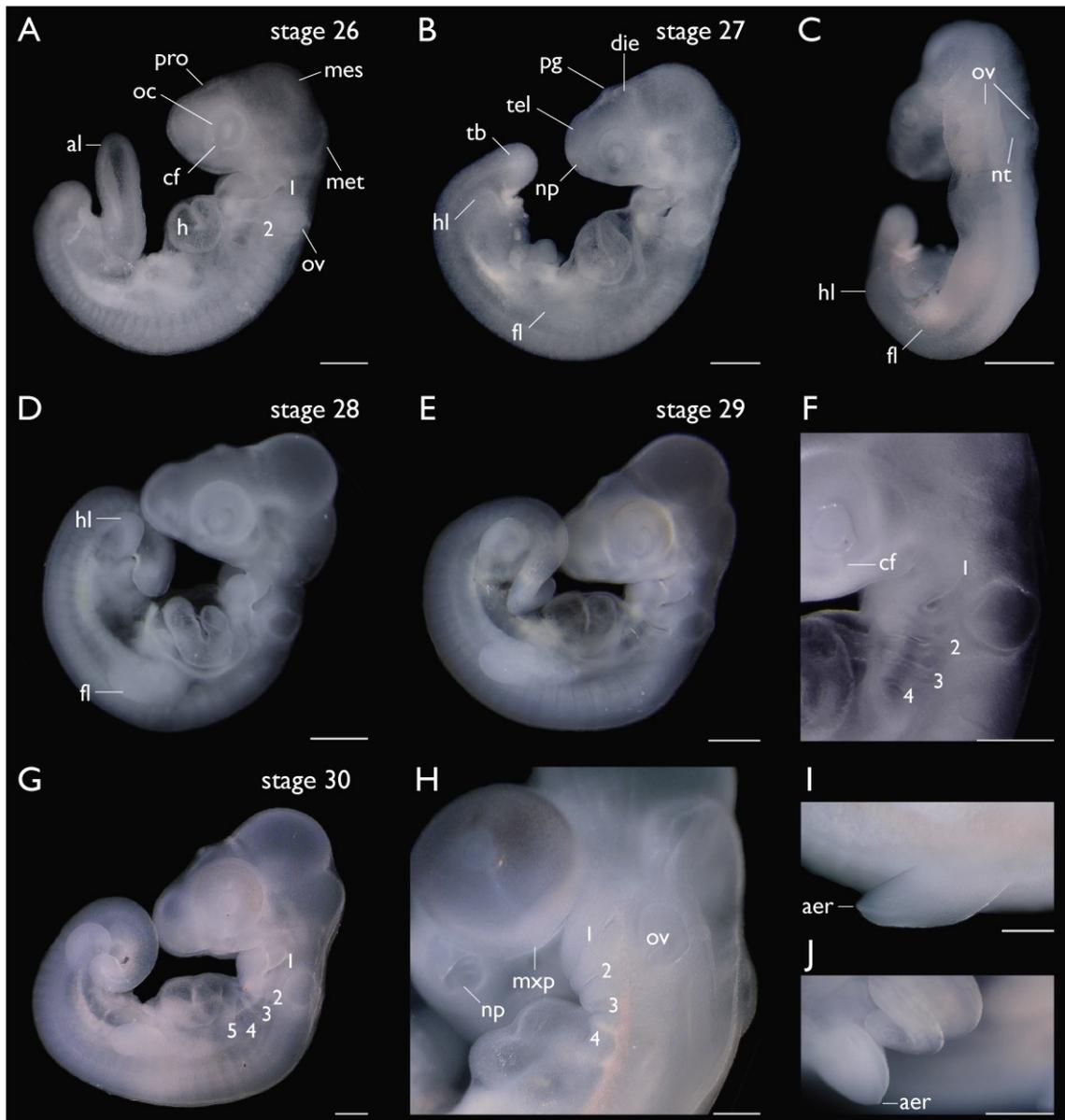


図 2-2. DH ステージ 26-30 のニホンカナヘビ胚。A: ステージ 26。B, C: ステージ 27。D: ステージ 28。E, F: ステージ 29。G-J: ステージ 30。スケールバー = 0.5 mm。略号: aer, 外胚葉性頂堤; al, 尿膜; cf, 脈絡膜裂; die, 間脳胞; fl, 前肢芽; h, 心臓; hl, 後肢芽; mes, 中脳; met, 後脳; mxp, 上顎突起; np, 鼻孔; nt, 神経管; oc, 眼胞; ov, 耳胞; pg, 松果体; pro, 前脳; tb, 尾芽; tel, 終脳胞; 1-5, 第 1-5 咽頭裂。

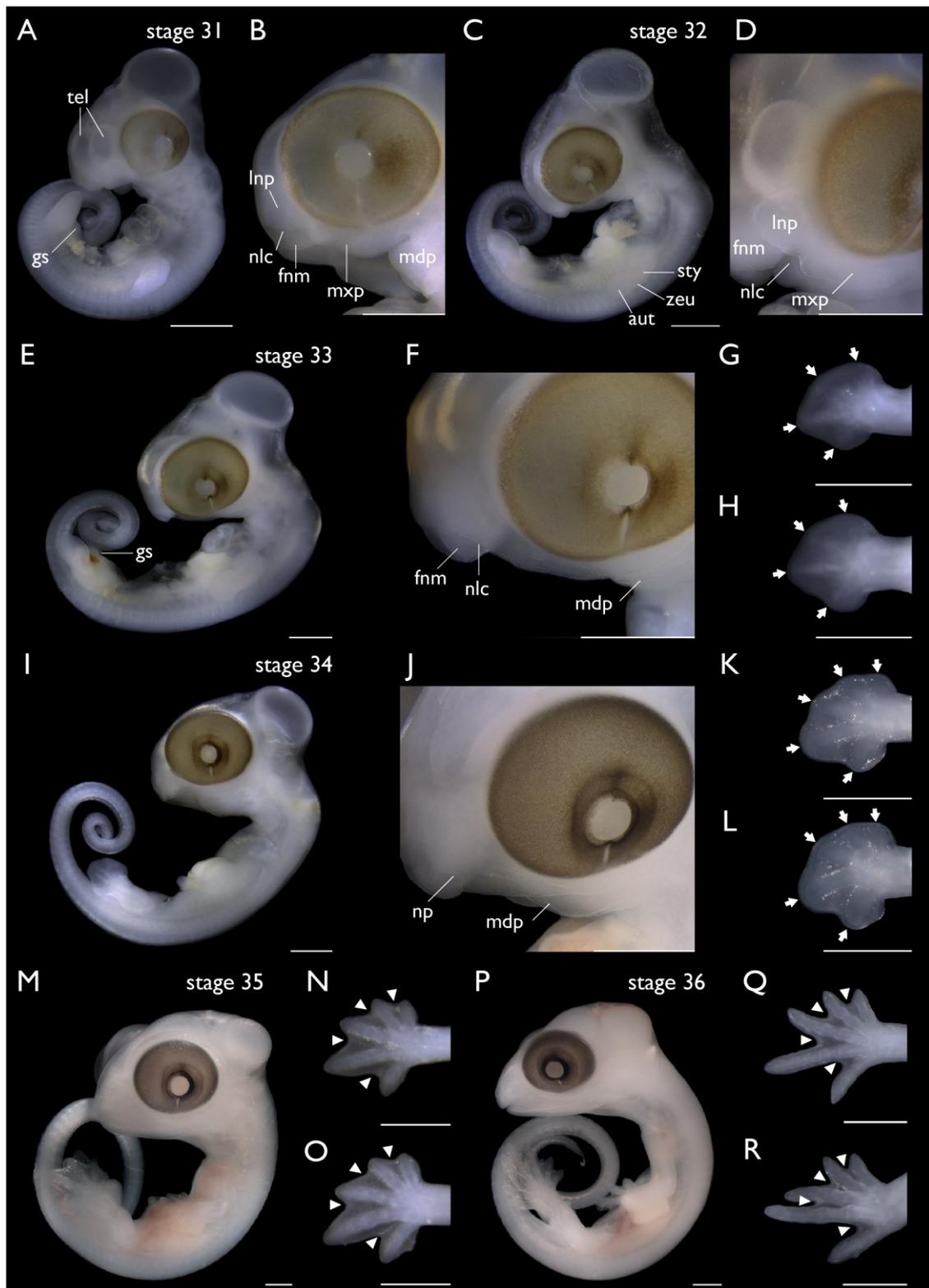


図2-3. DHステージ31-36のニホンカナヘビ胚. A, B: ステージ31. C, D: ステージ32. E-H: ステージ33. I-L: ステージ34. M-O: ステージ35. P-R: ステージ36. スケールバー = 1.0 mm. 略号: aut, 自脚; fnm, 内側鼻隆起; gs, 性器突起; lnp, 外側鼻隆起; mdp, 下顎突起; mxp, 上顎突起; nlc, 鼻唇溝; np, 鼻孔; sty, 柱脚; tel, 終脳胞; zeu, 軛脚; 矢印, 指放線; 矢頭, 指間組織.

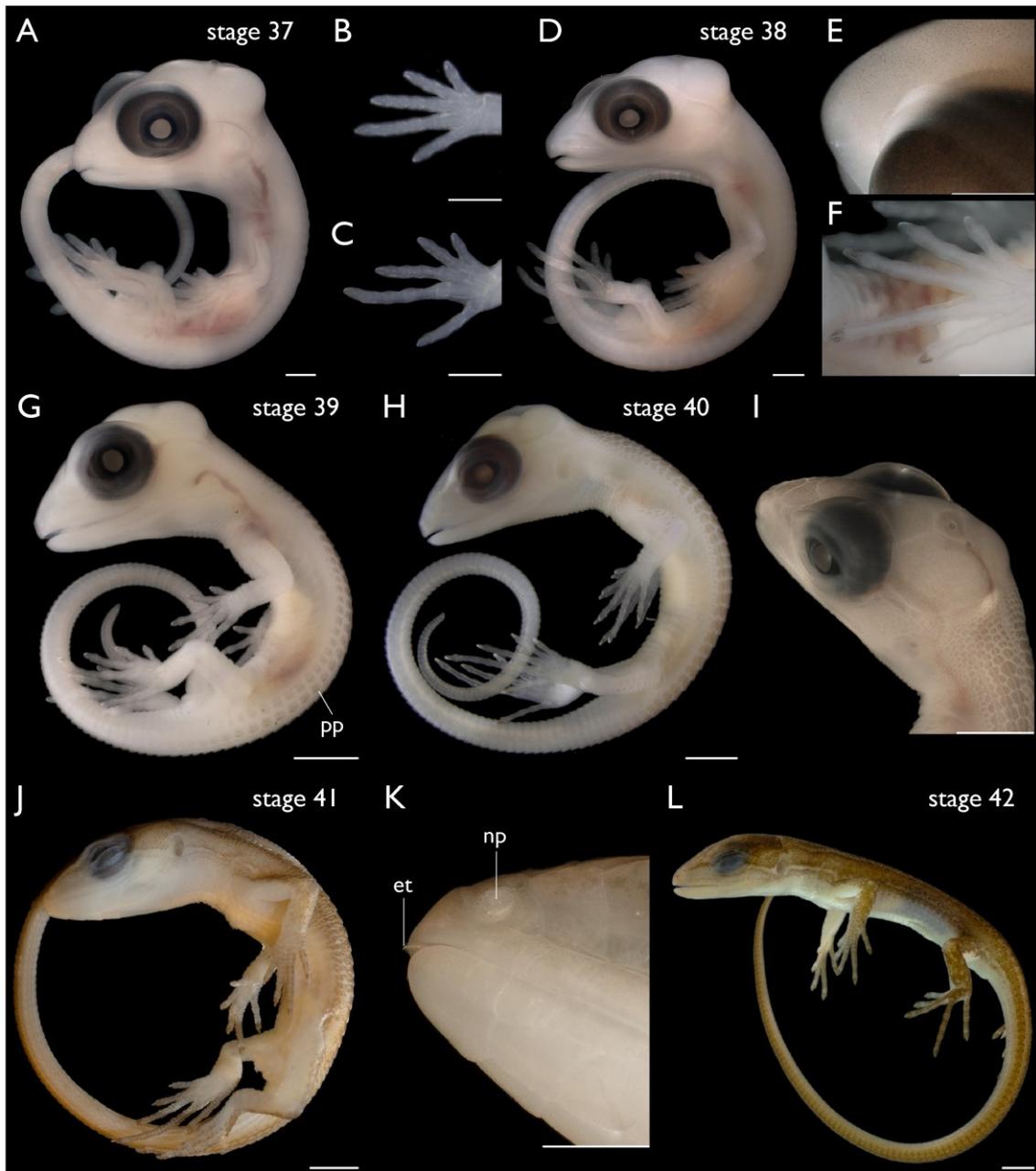


図 2-4. DH ステージ 37-42 のニホンカナヘビ胚. A-C: ステージ 37. D-F: ステージ 38. G: ステージ 39. H, I: ステージ 40. J, K: ステージ 41. L: ステージ 42. A-F のスケールバー = 1.0 mm. G-L のスケールバー = 2.0 mm. 略号: et, 卵歯; np, 鼻孔; pp, 色素形成パターン.

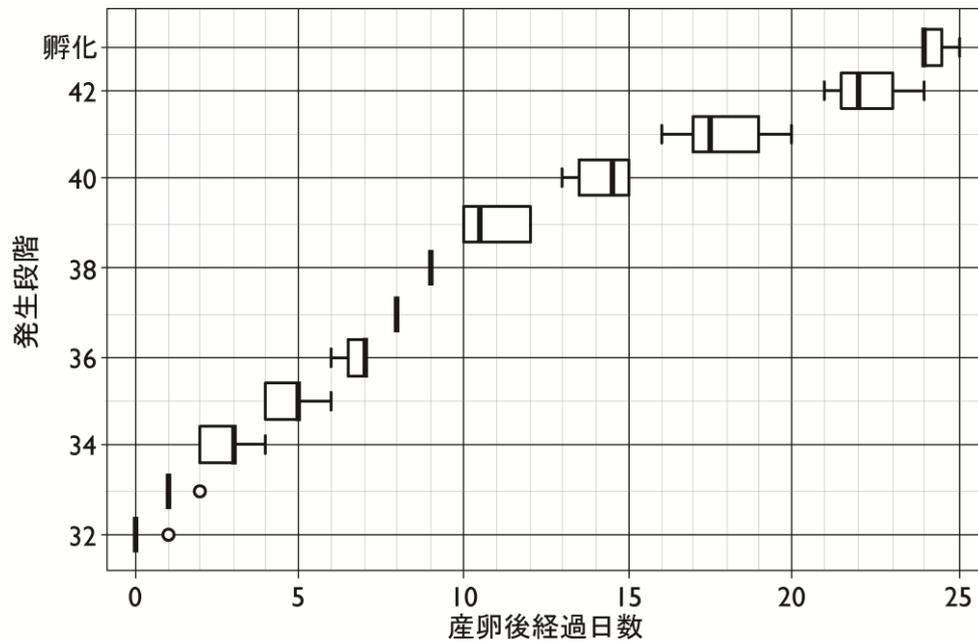


図 2-5. ヒガシニホントカゲの産卵後経過日数と発生段階 (DH ステージ) の関係. 箱ひげ図の垂線は中央値を, 箱の左端と右端はそれぞれ第一四分位と第三四分位を, ひげは外れ値を除く最大値から最小値の範囲を, 丸は外れ値を示す.



図 2-6. ヒガシニホントカゲの胚発生過程. A: ステージ 32. B: ステージ 33. C: ステージ 34. D: ステージ 35. E: ステージ 36. F: ステージ 37. G: ステージ 38. H: ステージ 39. I: ステージ 40. J: ステージ 41. K: ステージ 42. スケールバー = 1.0 mm. 略号: aut, 自脚; fnm, 内側鼻隆起; gs, 性器突起; lnp, 外側鼻隆起; mxp, 上顎突起; pgm, 色素形成; pp, 色素形成パターン; sty, 柱脚; zeu, 軛脚; 矢印, 指放線; 矢頭, 指間組織.

表 2-1. 有鱗目トカゲ類の胚発生段階に関する先行研究.

下目/上科	科	種	参考文献* <sup>1</sup>	発生段階基準* <sup>2</sup>	
ヤモリ下目	ヤモリ科	<i>Paroedura picta</i>	<b>Noro et al. (2009)</b>	DPO	
		<i>Gekko japonicus</i>	<b>Zhao et al. (2017)</b>	DH	
	オオギヤモリ科	<i>Tarentola annularis</i>	<b>Khannoon (2015)</b>	DH	
		<i>Tarentola mauritanica</i>	<b>Alturk and Khannoon (2020)</b>	DH	
	トカゲモドキ科	<i>Eublepharis macularius</i>	<b>Wise et al. (2009)</b>	DH	
トカゲ上科	トカゲ科	<i>Plestiodon laticutatus</i>	<b>Kuriyama and Hasegawa (2017)</b>	original staging criteria	
		<i>Trapylepis megalura</i>	<u>Pasteels (1956)</u>	-	
カナヘビ上科	カナヘビ科	<i>Zootoca vivipara</i>	<u>Inukai (1927)</u> ; <b>Dufaure and Hubert (1961)</b>	DH	
		<i>Lacerta agilis</i>	<b>Peter (1904)</b>	-	
		<i>Podarcis muralis</i>	<b>Dhouailly and Saxod (1974)</b>	DPO, DH	
		<i>Lacerta viridis</i>	Dhouailly and Saxod (1974)	DPO, DH	
		<i>Takydromus tachydromoides</i>	Oka (1971)	DH	
		テグートカゲ科	<i>Cnemidophorus uniparens</i>	<b>Billy (1988)</b>	original staging criteria
			<i>Calyptommatus sinebrachiatus</i>	<b>Roscito and Rodrigues (2012)</b>	SES
			<i>Nothobachia ablephara</i>	<b>Roscito and Rodrigues (2012)</b>	SES
オオトカゲ下目	オオトカゲ科	<i>Varanus indicus</i>	<b>Gregorovicova et al. (2012)</b>	DPO	
		<i>Varanus panoptes</i>	<b>Werneburg et al. (2015)</b>	SES	
	アシナシトカゲ科	<i>Anguis fragilis</i>	<u>Nicolas (1904)</u> ; <u>Ballowitz (1905)</u> ; <u>Meyer (1910)</u>	-	

表 2-1. 有鱗目トカゲ類の胚発生段階に関する先行研究 (続き).

上位分類単位	科	種	参考文献* <sup>1</sup>	発生段階基準* <sup>2</sup>
イグアナ下目	アガマ科	<i>Agama impalearis</i>	<b><u>El Mouden et al. (2000)</u></b>	DH
		<i>Calotes versicolor</i>	<b><u>Muthukkaruppan et al. (1970); Thapliyal et al. (1973)</u></b>	DH; DH
		<i>Pogona vitticeps</i>	<b>Whiteley et al. (2017); Ollonen et al. (2018)</b>	Sanger stage; SES
	カメレオン科	<i>Chamaeleo lateralis</i>	<b><u>Blanc (1974)</u></b>	DH
		<i>Trioceros bitaeniatus</i>	<u>Pasteels (1956)</u>	-
	イグアナ科	<i>Iguana iguana</i>	<b>Lima et al. (2019)</b>	DH
	スベイグアナ科	<i>Liolaemus tenuis</i>	<b><u>Lemus and Duvauchelle (1966); Lemus et al. (1981)</u></b>	DH; DH
		<i>Liolaemus gravenhorstii</i>	<b><u>Lemus (1967)</u></b>	DH
	トロピドウルス科	<i>Tropidurus torquatus</i>	<b>Py-Daniel et al. (2017)</b>	DH
	アノールトカゲ科	<i>Anolis spp.</i>	<b><u>Sanger et al. (2008)</u></b>	Sanger stage

\*1: 産卵後の DH ステージの全てもしくは大部分, あるいはそれらに相当する発生段階を観察した先行研究を太字で示した. 産卵以前の胚発生過程の観察を含む先行研究には下線を引いて示した. \*2: 略号: DH, Dufaure and Hubert (1961) による発生段階; DPO, 産卵後経過日数 (days post oviposition); Sanger stage, Sanger et al. (2008) による発生段階; SES, Werneburg (2009) による発生段階 (standard event system).

表 2-2. 本研究に用いたヒガシニホントカゲの雌個体, クラッチサイズ, 胚試料数および正常発生率.

雌個体	採集地	産卵日	クラッチサイズ	各孵卵条件の正常発生胚数/卵数*		胚試料数
				飼育ケージ	インキュベータ	
1	神奈川県厚木市	2020年6月6日	10	10/10 (100%)		10
2	神奈川県厚木市	2020年6月8日	11	11/11 (100%)		11
3	神奈川県厚木市	2020年6月26日	11	6/6 (100%)	4/5 (80%)	10
4	神奈川県厚木市	2020年7月13日	13		11/13 (84.6%)	11
5	三重県津市芸濃	2020年6月25日	12		11/12 (91.7%)	11
合計			57	27/27 (100%)	26/30 (86.7%)	53

\*正常発生率を括弧内に示した.

表 2-3. ニホンカナヘビ胚の各 DH ステージにおける外部形態的特徴.

発生段階	外部形態的特徴
DH ステージ 26 (図 2-2A)	<p>咽頭弓: 第 1-2 咽頭裂が観察される.</p> <p>脳神経系: 前脳, 中脳および後脳が分化している. 神経管が後脳から第 2 咽頭裂の背側にかけて開口している.</p> <p>眼: 馬蹄形の眼杯, 水晶体プラコードが分化しており, 脈絡膜裂が開口している.</p> <p>耳: 耳胞が第 2 咽頭裂の背側に観察される.</p>
DH ステージ 27 (図 2-2B, C)	<p>脳神経系: 前脳が終脳と間脳に分化し始める. 間脳背側に松果体領域が突出し始める.</p> <p>鼻: 鼻窩が陥入する.</p> <p>四肢: 前肢芽, 後肢芽領域が外側にわずかに突出する.</p> <p>その他の特徴: 未分化な尾芽が伸長し始める.</p>
DH ステージ 28 (図 2-2D)	<p>咽頭弓: 第 1-3 咽頭裂が観察される.</p> <p>脳神経系: 脳の各領域が肥大し始める.</p> <p>眼: 眼杯が拡張する.</p> <p>四肢: 前肢芽および後肢芽が明瞭に観察される.</p> <p>その他の特徴: 未分化な尾芽がらせん状に屈曲し始める.</p>
DH ステージ 29 (図 2-2E, F)	<p>咽頭弓: 第 1-4 咽頭裂が観察される.</p> <p>眼: 脈絡膜裂の端部が接触する. 網膜の色素形成が開始し, 背側部が薄く着色する.</p> <p>四肢: 各肢芽が半円状に突出する.</p>
DH ステージ 30 (図 2-2G-J)	<p>咽頭弓: 第 1-4 咽頭裂, あるいは第 1-5 咽頭裂が観察される. 第 5 咽頭裂は本発生段階の間に出現し, 融合する. 上顎突起が前方に向かって伸長し始める.</p> <p>眼: 脈絡膜裂が融合して消失する.</p> <p>鼻: 鼻窩が内側鼻隆起の腹側表面に移動する.</p> <p>四肢: 各肢芽の先端に外胚葉性頂堤が形成される.</p>
DH ステージ 31 (図 2-3A, B)	<p>咽頭弓: 第 4 咽頭裂が融合する.</p> <p>頭部・顔面: 上顎突起の前端が外側鼻隆起に接触する. 内側鼻隆起, 外側鼻隆起および上顎突起の間にスリット上の鼻孔が形成される.</p> <p>脳神経系: 終脳が左右一対に分化する.</p> <p>眼: 網膜全体が着色する.</p> <p>四肢: 前肢芽および後肢芽がわずかに屈曲し, 手板および足板の形成が始まる.</p> <p>その他の特徴: 後肢芽の間に生殖隆起が形成される.</p>

表 2-3. ニホンカナヘビ胚の各 DH ステージにおける外部形態的特徴 (続き).

発生段階	外部形態的特徴
DH ステージ 32 (図 2-3C, D)	<p>咽頭弓: 全ての咽頭裂が融合する.</p> <p>頭部・顔面: 上顎突起がさらに前方に伸長し, その前端が眼球最前部の腹側に達する. 下顎突起が前方に向かって伸長し始める. スリット上の鼻孔の背側領域で内側鼻隆起と外側鼻隆起が融合し始める.</p> <p>眼: 虹彩領域が周辺の網膜と比較して暗く着色し始める.</p> <p>四肢: 前肢および後肢で柱脚, 軛脚, 自脚が分化し, 手板および足板の近位—遠位軸の幅が大きくなる.</p>
DH ステージ 33 (図 2-3E-H)	<p>脳神経系: 神経管は前端部の開口部を除いて閉じる.</p> <p>頭部・顔面: 上顎突起が外側鼻隆起と融合する.</p> <p>四肢: 手板, 足板にそれぞれ 3-4 本の指放線が形成される.</p> <p>その他の特徴: 生殖隆起が左右一対に分化する.</p>
DH ステージ 34 (図 2-3I-L)	<p>脳神経系: 神経管が閉じる.</p> <p>眼: 虹彩領域の着色が進み, 明瞭に観察される.</p> <p>頭部・顔面: 顔面突起はスリット上の鼻窩を残して融合する. 下顎突起は眼球前端の腹側まで伸長する. 上眼瞼の形成が開始する.</p> <p>四肢: 手板, 足板にそれぞれ 5 本の指放線が形成される.</p>
DH ステージ 35 (図 2-3M-O)	<p>頭部・顔面: 下眼瞼の形成が開始する. 下顎が上顎前端と同じ長さには達する. 頭頂眼の円形の縁が明瞭に着色する.</p> <p>四肢: 指放線から指原基が形成され, 各指原基の長さが分化し始める. 指間組織の退縮が開始する.</p>
DH ステージ 36 (図 2-3P-R)	<p>頭部・顔面: 上下眼瞼が外側に向かって伸長し, 眼球の縁を覆う. 耳窩がわずかに陥入する.</p> <p>四肢: 指間組織は各指原基の半分の長さまで退縮する.</p> <p>鱗・色素形成: 頭部および四肢を除く全身の背側表面に透明な体鱗が形成される.</p> <p>その他の特徴: 胴体の外側面に肋骨が観察される.</p>
DH ステージ 37 (図 2-4A-C)	<p>頭部・顔面: 上下眼瞼がさらに伸長し, それらに囲まれた眼球の露出面が楕円形になる.</p> <p>四肢: 指間組織は完全に退縮し, 各指の先端に爪原基が形成される. 各指が伸長し, 関節が明瞭に観察される.</p> <p>鱗・色素形成: 胴体の腹側表面および四肢の背側表面に透明な鱗が形成される.</p>

表 2-3. ニホンカナヘビ胚の各 DH ステージにおける外部形態的特徴 (続き).

発生段階	外部形態的特徴
DH ステージ 38 (図 2-4D-F)	<p>頭部・顔面: 陥入した耳窩内に鼓膜が明瞭に観察される.</p> <p>鱗・色素形成: 各指先端の爪原基に色素斑が観察される. 頭部背側に微少な色素斑が散在する.</p>
DH ステージ 39 (図 2-4G)	<p>鱗・色素形成: 頭部背側面を除く全身の体鱗が形成される. 首から尾の背側面の鱗が着色し, 斑点模様が観察される. 頭部背側に多数の微小な色素斑が観察される.</p>
DH ステージ 40 (図 2-4H, I)	<p>鱗・色素形成: 頭部の大きな鱗板が形成される. 手足を除く体鱗の着色が進み, 全身に幼体と類似した模様が観察され始める.</p>
DH ステージ 41 (図 2-4J, K)	<p>頭部・顔面: 眼瞼は完全に閉じることができる大きさまで形成される. 上顎の先端に卵歯が形成される. 鼻孔は未だ開口していない.</p> <p>鱗・色素形成: 体表面の着色が幼体と遜色ない程度まで進む.</p> <p>その他の特徴: 半陰茎が総排泄孔内に収納される.</p>
DH ステージ 42 (図 2-4L)	<p>頭部・顔面: 鼻孔が開口する.</p> <p>その他の特徴: 胚の外部形態に幼体と異なる箇所は観察されない. 卵黄はこの発生段階中に完全に吸収される. 胚は非常に活発であり, 卵から取り出された後に歩くことが可能である.</p>

表 2-4. ヒガシニホントカゲ胚の各 DH ステージにおける外部形態的特徴.

発生段階*	外部形態的特徴
DH ステージ 32 /KH ステージ 1 (図 2-6A)	<p>咽頭弓: 全ての咽頭裂が融合している.</p> <p>頭部・顔面: 上顎突起の前端は外側鼻隆起と接触している. 内側鼻隆起と外側鼻隆起の間にスリット上の鼻腔が観察される. 下顎突起が前方に向かって伸長し始める.</p> <p>眼: 虹彩領域は周辺の網膜と比較してわずかに暗く着色している.</p> <p>四肢: 前肢および後肢で柱脚, 軛脚, 自脚が分化している.</p> <p>その他の特徴: 後肢の間に生殖突起が観察される.</p>
DH ステージ 33 /KH ステージ 2 (図 2-6B)	<p>頭部・顔面: 上顎突起が外側鼻隆起と融合し, スリット上の鼻孔はほとんど閉じている.</p> <p>眼: 網膜および虹彩領域は前ステージと比較して一層暗く着色している.</p> <p>四肢: 手板, 足板にそれぞれ 3-4 本の指放線が形成される.</p> <p>その他の特徴: 生殖隆起が左右一対に分化する.</p>
DH ステージ 34 /KH ステージ 3 (図 2-6C)	<p>脳神経系: 神経管が閉じる.</p> <p>頭部・顔面: 顔面突起はスリット上の鼻窩を残して融合する. 下顎突起は眼球の前端と同じ前方位置まで伸長する. 上眼瞼が外側に向かって伸長し始める.</p> <p>四肢: 手板, 足板にそれぞれ 5 本の指放線が形成される.</p>
DH ステージ 35 /KH ステージ 4 (図 2-6D)	<p>頭部・顔面: 下眼瞼が外側に向かって伸長し始める. 下顎が上顎前端と同じ長さに達する.</p> <p>四肢: 指放線から指原基が形成される. 指原基の長さが分化し始める. 指間組織の退縮が開始し, 内側と比較して外側で退縮が早い.</p>
DH ステージ 36 /KH ステージ 5 (図 2-6E)	<p>頭部・顔面: 上下眼瞼が外側に向かって伸長し, 眼球の縁を覆う. 耳窩がわずかに陥入する.</p> <p>四肢: 指間組織の退縮が進み, 各指原基の先端が独立する.</p> <p>鱗・色素形成: 頸部から尾までの背側表面に透明な体鱗が形成される. 後肢の外背側面で色素形成が開始する.</p>
DH ステージ 37 /KH ステージ 6 (図 2-6F)	<p>頭部・顔面: 上下眼瞼がさらに伸長し, それらに囲まれた眼球の露出面が楕円形になる.</p> <p>四肢: 指間組織はほぼ完全に退縮し, 各指の先端に爪原基が形成される.</p> <p>鱗・色素形成: 前肢の外背側面で色素形成が開始する. 頸部から胴体の背側面および外側面に色素形成が起り, 幼体に観察される縦帯が形成され始める.</p>

表 2-4. ヒガシニホントカゲ胚の各 DH ステージにおける外部形態的特徴 (続き).

発生段階*	外部形態的特徴
DH ステージ 38 /KH ステージ 7, 8 (図 2-6G)	<p>頭部・顔面: 陥入した耳窩中に鼓膜が観察される.</p> <p>鱗・色素形成: 各指先端の爪原基に色素斑が観察される. 頸部から尾の基部の外背側面の色素形成が進み, これら領域で明瞭な体鱗が観察される. 頭部背側面に微少な色素斑が散在する.</p>
DH ステージ 39 /KH ステージ 9 (図 2-6H)	<p>頭部・顔面: 上下眼瞼がよく発達し, 瞳孔領域を除く眼の全体を覆う.</p> <p>鱗・色素形成: 頭部背側面を除く全身の体鱗が形成される. 頭部背側面に多数の微小な色素斑が観察される. 四肢の外背側面の色素形成が進み, 爪原基が明瞭に着色する.</p>
DH ステージ 40 /KH ステージ 10 (図 2-6I)	<p>鱗・色素形成: 頭部に明瞭に着色した大小の鱗板が形成される. 全身の体鱗が暗く着色するが, 腹側面では着色が進んでいない. 色素形成は趾の先端まで進む.</p>
DH ステージ 41 /KH ステージ 11 (図 2-6J)	<p>頭部・顔面: 眼瞼は完全に閉じることができる大きさまで形成される. 上顎の先端に卵歯が形成される. 鼻孔は未だ開口していない.</p> <p>鱗・色素形成: 腹側面を除く全身の体鱗が暗く着色する. 尾の青色の色素形成はこの発生段階の間に開始する.</p> <p>その他の特徴: 半陰茎が総排泄孔内に収納される.</p>
DH ステージ 42 /KH ステージ 12 (図 2-6K)	<p>頭部・顔面: 鼻孔が開く.</p> <p>その他の特徴: この発生段階の開始時点で体表面の色素形成が幼体と遜色ない程度まで進んでいる. 尾の青色の色素形成はこの発生段階の間に完了し, これにより胚の外部形態に幼体と異なる箇所は観察されなくなる. 卵黄はこの発生段階中に完全に吸収される. 本発生段階の胚は初期, 後期に関わらず卵から取り出された後に歩くことが可能である.</p>

\*: KH ステージは Kuriyama and Hasegawa (2017) によるオカダトカゲの発生段階である. 同研究で示された KH ステージ 1-12 の胚試料の写真および外部形態的特徴に関する記述から, それらに対応する DH ステージを同定した.

### 第3章 有鱗目の鋤鼻器官とその関連構造の関係性の進化史

#### I. 序論

有鱗目の鋤鼻器官は他の四肢動物と異なる複数の形態的特徴を持つ。多くの四肢動物では鋤鼻器官が鼻腔に開口する一方、有鱗目では *cupola jacobsoni* と称されるカプセル状の構造に内包され鼻腔と完全に隔絶しており、鋤鼻管により口蓋に開口する (Parsons, 1970; Graves and Halpern, 1989)。*cupola jacobsoni* はヘビ類では鋤骨、上顎骨、中隔上顎骨の三つの硬骨要素から構成される一方、トカゲ類ではこれら硬骨要素および鼻殻 (nasal capsule) の一部である *lamina transversalis anterior* から構成される (Groombridge, 1979; Bellairs and Kamal, 1981; Rieppel et al., 2008)。また、非感覚上皮に覆われるマッシュルームボディ構造が器官内腔に突出する。

有鱗目の鋤鼻器官は内部に分泌腺構造を持たず、器官内腔は眼窩のハーダー腺で分泌される内腔液 (luminal fluid) で満たされるという特徴を持つ (Pratt, 1948; Bellairs and Boyd, 1950; Rehorek et al., 2000b; Souza et al., 2015)。内腔液は眼窩のハーダー腺で分泌され、鼻涙管を通過して鋤鼻器官内腔へ流れ込む。ヘビ類およびトカゲ類の一部では、鼻涙管が鋤鼻器官にのみ開口する (図 3-1D, H)。一方、多くのトカゲ類の鼻涙管は、鋤鼻器官に加えて、内鼻孔から前方に伸長する口蓋の溝状構造である内鼻溝 (choanal groove) にも開口する (図 3-1B, C, E-G, I)。これらのことから、鼻涙管と内鼻溝という二つの構造は、内腔液を鋤鼻器官内に運ぶ機能を担う、鋤鼻器官関連構造であると考えられている (Pratt, 1948; Bellairs and Boyd, 1950; Rehorek et al., 2000b; c)。これら鋤鼻器官関連構造は、有鱗目内で形態的に多様化していることが示されている (Born, 1879; Fuchs, 1908; Malan, 1946; Bellairs and Boyd, 1950; Gabe and Saint Girons, 1976; Lemire, 1985)。しかし、これら先行研究では各分類群における形態的特徴が整理されておらず、形態的多様性の進化史はこれまで示されてこなかった。そこで本研究は、有鱗目の進化

史におけるこれら構造間の関係性の進化史を明らかにすることを目的の一つとした。

有鱗目の鋤鼻器官および関連構造の胚発生過程は、ヘビ類では Born (1883) 、Parsons (1959) 、El-din and Dakrory (2015) 、Kaczmarek, Hermyt, and Rupik (2017) において、トカゲ類では Born (1879) 、Fuchs (1908) 、Malan (1946) 、Bellairs and Boyd (1950) 、Shrivastava (1963) において詳細に観察された。また、Slabý (1979a; b; c; 1981; 1982a; b; c) はトカゲ類のこれら器官構造の形態を一部の発生過程の胚試料で観察した。しかし、これら先行研究における知見は未だ有鱗目の多様な分類群を網羅していない。また、これら研究の多くは形態形成過程の差異をその進化に関する議論と結び付けてこなかった。それゆえ、先行研究において示されてきた有鱗目の鋤鼻器官およびその機能的関連構造の発生過程に関する知見は、種間の形態的多様性をもたらした形態形成過程を解明とするには不十分である。

有鱗目は鋤鼻系に依存的な生態を持ち高度に多様化した分類群である。そのため、鋤鼻器官およびその関連構造の進化は、有鱗目の進化史において重要な役割を担ってきたと考えられる。そこで本章では、新たにニホンカナヘビの鋤鼻器官およびその関連構造の形態的特徴および発生過程を調査した。ニホンカナヘビの鋤鼻器官については、Saito et al. (2010) による鋤鼻感覚上皮の詳細な特徴の報告がある。しかし、ニホンカナヘビを含むカナヘビ科 *Takydromus* 属の種の鋤鼻器官と機能的関連構造の形態的特徴はこれまでに評価されていない。

## II. 材料と方法

### 1. 組織切片標本の作製および形態観察

ニホンカナヘビの成体、幼体および DH ステージ 30–38 の胚試料の連続組織切片を作製し、鋤鼻器官およびその関連構造や周辺構造の形態的特徴を観察した。成体 2 個体、幼体 3 個体および各発生段階の胚試料 3 個体以上を観察に供試した。全ての個体試料を取り扱う実験工程は、東京農業大学動物実験委員会の承認を受けた研究計画に準拠し、同委員会の策定する動物実験に関する指針に従って実施された (承認番号: 300104)。

成体の頭部試料はリン酸緩衝液 (Phosphate-buffered saline) で希釈した 10 % ホルマリンに浸漬して 3–4 日間おだやかに振盪して固定した後、モールス液 (Morse solution: 22.5 % ギ酸, 10 % クエン酸ナトリウム) 中に浸漬して 7 日間おだやかに振盪し、脱灰処理を行った。幼体の頭部試料および DH ステージ 37、38 胚の全身試料はブアン固定液中に浸漬して 5–7 日間おだやかに振盪し、固定および脱灰処理を行った。また、DH ステージ 30–36 胚の全身試料はリン酸緩衝液で希釈した 10 % ホルマリンに浸漬して 24 時間おだやかに浸透し、固定した。

固定後あるいは脱灰処理後の組織サンプルは 70 %、80 %、90 %、95 %、99.5 % エタノールに順に浸漬して脱水処理を行った。胚試料は、包埋後に位置や角度を認識しやすくする目的で、上述の脱水処理過程中的 90 % エタノールに 1 % エオシン Y 溶液 (エオシン Y 5.0 g, 蒸留水 500 ml, 酢酸 15  $\mu$ l) を全体の 1/10 量になるよう加え、試料の表面を染色した。次に、各組織試料を順に安息香酸メチル、ベンゼンに置換した。その後、53–54 °C に保温したハイブリオープン内で、事前に融解しておいた軟パラフィン (Paraplast X-TRA, Sigma-Aldrich, P3808) に 2 回置換した。さらに、56–57 °C に保温したハイブリオープン内で事前に融解しておいた硬パラフィン (Paraplast plus, Sigma-Aldrich, P3683) に 3 回置換した。最後に、組織試料を新たに融解させた硬パラフィン中で氷上にて固化させ、パラフィンブロックを作製した。

パラフィンブロックは成型後、融解させたパラフィンにより木製の試料台に固定した。試料台を回転式マイクローム (RX-860, 大和光機) に取り付け、試料の大きさに応じて 3–12 $\mu$ m 厚の連続切片を作製した。次に、連続切片をホットプレート式パラフィン伸展機で 40 °C 前後に保温したスライドグラス上の 1 % 酢酸に浮かべ、伸展した。切片が十分に伸展された後に過剰な 1 % 酢酸を取り除き、スライドグラスを完全に乾燥させた。これにより、切片をスライドグラスに貼りつけた。

組織切片を染色するために、まず一連の連続切片が張り付けられたスライドグラスを染色用カゴに入れ、3 槽のキシレンに 15 分間以上ずつ浸漬して、パラフィンを取り除いた。このスライドグラスを 3 槽の 99.5 % エタノールに 2 分間以上ずつ浸漬し、その後 3 槽の蒸留水で各 3 分間以上洗浄した。次に、DH ステージ 34 以降の胚試料では、スライドグラスを 3 % 酢酸に 5 分間、1 % アルシアンブルー溶液に 5 分間、3 % 酢酸に 5 分間浸漬した後に 3 槽の蒸留水で各 3 分間以上洗浄した。これにより、組織中の軟骨組織などを染色した。DH ステージ 30–33 の胚試料ではこの工程は行わなかった。次いでスライドグラスをヘマトキシリン溶液 (Mayer's Hematoxylin Solution, 富士フィルム和光純薬, 131-09665) に 3–8 分間浸漬した後、38 °C の水道水中で 10 分間静置してヘマトキシリンの色出しおよび定着を行い、組織中の細胞核を染色した。その後、スライドグラスを 1 % エオシン Y 溶液に 30 秒間から 2 分間浸漬して組織中の細胞質を染色した後、蒸留水で 4–7 回洗浄し、さらに 95 % エタノールに 1 分間、2 槽の 99.5 % エタノールに 1 分間ずつ、2 槽の無水エタノールに 1 分間ずつ浸漬してエオシンの脱色分別および組織切片の脱水を行った。次いで組織切片の脱水および透徹を行うために、スライドグラスを 3 槽のキシレンに 5 分間以上ずつ浸漬した。最後に、スライドグラス上に適量の非水溶性封入剤マウントクイック (マウントクイックチューブ, 大道産業) を塗布し、カバーグラスを被せて組織切片を封入した。

各組織切片を生物顕微鏡 (Olympus BX43) 下で観察し、顕微鏡に取り付けたデジタ

ルカメラ (Olympus DP22) で撮影した。各器官構造の三次元構造の観察を行う場合、連続組織切片の画像データを Fiji/Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて画像データのサイズ変更や輝度調整を行った。次に、画像データを立体構造可視化・解析ソフトウェアの Amira ver. 6.7 に取り込み、組織切片像の位置合わせおよび各器官構造の領域のセグメンテーションを行い、三次元モデルを構築した。

各器官形態の解剖学的名称は Parsons (1970) および Bellairs and Kamal (1981) に従い、特定の名称 “lachrymo-choanal gutter” は Bellairs and Boyd (1950) に従った。各日本語名は獣医解剖学用語 (改定・2版) および動物系統分類学第9巻下 B2 (松井, 1992) を参考にし、対応のないものは本研究で和訳した。図中で用いた略号を表 3-1 に示した。

## 2. 祖先形質状態推定

有鱗目の鋤鼻器官とその関連構造である鼻涙管、内鼻溝の関係性の進化史を推定するため、これら器官構造の形態的特徴に関する先行研究の知見を網羅的に整理統合した (表 3-2)。その後、鋤鼻器官と鼻涙管の構造的関係 (形質 a)、鋤鼻器官と内鼻溝の構造的関係 (形質 b)、および鼻涙管と内鼻溝の構造的関係 (形質 c) を、それぞれ四種類の形質状態に分類した (表 3-3)。各系統の形質状態を表 3-4 に示した。

次に、Mesquite version 3.61 (Maddison and Maddison, 2019) を用いて、Zheng and Wiens (2016) で示された鱗竜類の系統関係に基づき祖先形質状態の推定を行った。祖先形質状態推定の解析は、Mesquite に実装されている最節約法および最尤法の二つの祖先形質復元アルゴリズムを用いて行った。最節約法による解析は祖先形質復元アルゴリズム “Parsimony ancestral states, unordered states” で、最尤法による解析は祖先形質復元アルゴリズム “Likelihood ancestral states, Malkov k-state one-parameter model” で実行し、形質 a、b、c をそれぞれ独立に解析した。外群比較には有鱗目の姉妹群であるムカシトカゲ *Sphenodon punctatus* を用い、その形質状態が有鱗目にとって祖先的であると仮定した。

### III. 結果

#### 1. ニホンカナヘビの鋤鼻器官および関連構造の形態的特徴

ニホンカナヘビの鋤鼻器官を内包する *cupola jacobsoni* の前方は前上顎骨、内側は鋤骨および鼻中隔軟骨、外側および腹側は *lamina transversalis anterior* と上顎骨、背側は中隔上顎骨により構成されていた (図 3-2A-D)。鋤鼻神経は器官の内背側において、中隔上顎骨と鼻中隔軟骨の接触箇所に沿って観察された (図 3-2A-D)。鋤鼻管は鋤骨と上顎骨の間を通過して口蓋に開口していた (図 3-2A)。鼻涙管は内鼻孔よりも前方で内鼻溝に連続する外側内鼻孔裂に開口し、開口部よりも前方では内鼻溝から分離していなかった (図 3-2C-F)。また、鼻涙管と内鼻溝の上皮組織が融合しており、二つの構造の境界線を断定することはできなかった。この構造は *Bellairs and Boyd (1950)* により *lachrymo-choanal gutter* (鼻涙-内鼻溝) と呼称された。鼻涙-内鼻溝は、機能的には鼻涙管と同様に、内腔液をハーダー腺から鋤鼻器官に運ぶ役割を担うと考えられている (*Pratt, 1948; Bellairs and Boyd, 1950*)。鼻涙-内鼻溝は、鋤鼻管の付近では鋤骨の腹側に、鋤鼻器官の後方では *cupola Jacobsoni* の腹側に沿って口蓋の表面で伸長していた (図 3-2C, D)。ニホンカナヘビの鋤鼻器官およびその関連構造の形態的特徴の大部分は他のカナヘビ類と類似していた。しかし本種において、鼻涙-内鼻溝の前端は鋤鼻管のわずかに後方に位置しており、鋤鼻管に連続していなかった (図 3-2A-C, G, H)。

#### 2. ニホンカナヘビの鋤鼻器官および関連構造の胚発生過程

DH ステージ 30 および 31 (図 3-3A-D) の胚試料において、内側鼻隆起と外側鼻隆起の間には鼻腔が形成されており、この鼻腔は原始内鼻孔裂 (*embryonic slit-like choana*) を通じて口腔に開口していた。鋤鼻器官原基は内側鼻隆起内において、周辺上皮組織と比較して顕著に肥厚した上皮組織として観察された。DH ステージ 32 では、鋤鼻器官原基の上皮組織はさらに肥厚していた。

DH ステージ 33 および 34 (図 3-3E-I) では、内側鼻隆起と外側鼻隆起の融合による一時口蓋の形成が開始した。鋤鼻神経束は鋤鼻器官の背側に接触していた。鋤鼻器官は未だ鼻腔に開口していた。また、外側鼻隆起と上顎突起の境界部分に鼻涙管が出現した。上皮組織塊で形成された鼻涙管が内側に向かって伸長し始めていた。

DH ステージ 35 の初期 (図 3-4A, B) までに、鋤鼻器官の開口部は鼻腔から口腔へ移動した。これにより鋤鼻器官は鼻腔から隔絶されたが、鋤鼻管と後鼻溝は上皮組織により形成された内鼻溝により連続していた。鼻涙管は鋤鼻管に向かって伸長し、内鼻溝に接近していたが、両構造は接触していなかった。鼻殻の形成候補領域には間葉細胞の凝集が観察され、これら領域はアルシアンブルーにより染色された。DH ステージ 35 の後期 (図 3-4D-H) にかけて、マッシュルームボディ構造の拡大により鋤鼻器官内腔が三日月型に狭められた。鼻涙管は内鼻孔のわずかに前方で内鼻溝に接触し、融合していた (図 3-4E, 矢印)。鼻涙管と内鼻溝は、内鼻孔の周辺では接触していなかった。

DH ステージ 36 にかけて、鼻殻の軟骨化が進行し、鋤骨、上顎骨、中隔上顎骨など *cupola jacobsoni* の構成要素である皮骨が出現した。DH ステージ 37 (図 3-5) にかけて鼻中隔軟骨と中隔上顎骨が接触し、鋤鼻上皮の背側で *cupola jacobsoni* が形成された。鼻涙-内鼻溝は未開口であったが、その前端部が鋤鼻管から分離した (図 4C, F, G)。この発生段階において、本種の鋤鼻器官とその関連構造の構造的関係性が成立した。

### 3. 有鱗目の鋤鼻器官と関連構造の関係性の祖先形質状態

有鱗目およびムカシトカゲのそれら器官の形態的特徴を図 3-1 に模式的に示した。祖先形質状態推定により得られた有鱗目の鋤鼻器官、鼻涙管、内鼻溝の構造的関係の進化史を図 3-6 に示した。有鱗目の鼻腔およびその周辺構造の祖先的な形態的特徴は、その姉妹群であるムカシトカゲに観察されると考えられている (Fuchs, 1908; Hoppe, 1934; Malan, 1946; Bellairs and Boyd, 1950)。図 3-1A に模式的に示したように、ムカシ

トカゲの鼻腔は内鼻孔を通じて広く口腔に開口している。また、鋤鼻器官はマッシュルームボディ構造を持たず、内鼻孔前方の内側壁に開口する。そのため、マッシュルームボディ構造を持ち口腔のみに開口する鋤鼻器官は有鱗目の共有派生形質であると考えられている (Bellairs and Boyd, 1950; Hallermann, 1998; Lee, 2000)。

i. 鋤鼻器官と鼻涙管の構造的関係性について (図 3-6A)

ムカシトカゲの鼻涙管は鋤鼻器官の開口部の後方で内鼻孔の外側壁に開口する。本研究ではこの形態的特徴を形質状態 a-0 とした。一方、多くの有鱗目では鼻涙管あるいは鼻涙-内鼻溝が鋤鼻管に、フタアシトカゲ科およびヨルトカゲ科では鋤鼻器官の内腔に直接開口する。この形態的特徴は形質状態 a-1 とした。形質状態 a-1 は、再節約法および最尤法のいずれの解析方法においても、有鱗目の進化史において広く保存されてきたと推定された。また、形質状態 a-1 は最尤法では鱗竜類にとって祖先的であると推定されたが、有鱗目の共有派生形質であると考えられている (Bellairs and Boyd, 1950)。有鱗目以外の四肢動物では鼻涙管が鼻腔に直接開口して鋤鼻器官に接触しない、形質状態 a-0 様の特徴が観察される。そのため、形質状態 a-0 が鱗竜類の共有祖先形質であるという推定結果は、本研究の解析が有鱗目の祖先的な形質を持つムカシトカゲのみを外群として用いたために誤って導かれたものであると考えられる。なお、Bellairs and Boyd (1950) の図 1、2、7 やそれを参考にした Parsons (1970) の図 20A、28B では、あたかもアシナシトカゲ科の種の鼻涙管が鋤鼻管よりも後方で口蓋に終端しているように見える。それゆえこれら文献を引用したいくつかの先行研究は、同科の鼻涙管は鋤鼻器官に直接開口しないと述べている (Lee, 2000; Kaczmarek et al., 2017)。しかし、Bellairs and Boyd (1950) が図 11E で説明しているように、同科の種の鼻涙管は鋤鼻管およびその周辺の口蓋の両方に開口している。また、Toubeau et al. (1994) の図 4a では、直接言及されてはいないものの鼻涙管様の管状構造が鋤鼻管に開口している様子が確認される。こ

これらのことから、同科の種でも他の大部分の有鱗目と同様に形質状態 a-1 が共有されていると考えられる。

カナヘビ科の少なくとも数種では、鼻涙-内鼻溝前端が鋤鼻器官に連続しない (Lemire, 1985)。また、Malan (1946) は、カメレオン科の *Bradypodion pumilum* において鼻涙管が鋤鼻器官から分離していると述べている。これら有鱗目における、鼻涙管あるいは鼻涙-内鼻溝が鋤鼻器官に開口しないという形態的特徴は、形質状態 a-2 として扱った。カナヘビ科の鋤鼻器官関連構造の形態的特徴に関する知見には曖昧な点があり、この点については“考察 1. カナヘビ科の鋤鼻器官関連構造の形態的特徴”で述べる。この形質状態は有鱗目内では上記の二つの系統のみで観察されるが、本研究および Malan (1946) で示されているように、これら系統の種でも胚発生過程において鋤鼻器官と鼻涙管の接触は観察される。形質状態 a-2 は、カナヘビ科の系統と *Bradypodion* 属の系統においてそれぞれ独立に獲得されたと推定された。*Bradypodion* 属を除く多くのカメレオン科の種では鋤鼻器官が退化しているか痕跡的であるが、その鼻涙-内鼻溝は他のトカゲ類において鋤鼻管が存在する位置まで伸長しており、この形態的特徴は形質状態 a-3 として扱った。解析の結果、カメレオン科の共通祖先では形質状態 a-3 が共有されており、*Bradypodion* 属では形質状態 a-3 から形質状態 a-2 が獲得されたと推定された。この結果は、カメレオン科の進化史において鋤鼻器官が一度喪失され、その後 *Bradypodion* 属の系統で再獲得されたことを暗示する。しかし、同科の多くの種では鋤鼻器官およびその関連構造の形態的特徴が観察されておらず、本研究の解析に含まれたのは科内の計 11 属のうち 4 属のみである。そのため、本研究の結果はカメレオン科の進化史において鋤鼻器官がどのように保存または喪失されてきたかを示すことはできない。Bellairs and Boyd (1950) は、Brock (1941) において鼻涙管と記述された構造が鼻涙-内鼻溝に相当すると指摘した。そこで本研究では、*Bradypodion* 属を含むカメレオン科の種の鼻涙管が鼻涙-内鼻溝であると仮定した。また、Bellairs and Boyd (1950) は、

Brock (1941) が観察した鼻涙管が鋤鼻管に開口する可能性を推察している。カメレオン科、特に *Bradypodion* 属の種の鋤鼻器官およびその関連構造の形態的特徴は、今後詳細に再評価される必要がある。

ii. 鋤鼻器官と内鼻溝の構造的関係性について (図 3-6B)

内鼻孔が鋤鼻器官に連続するカシトカゲの形態的特徴を形質状態 **b-0** とした。ヤモリ下目、トカゲ上科、カメレオン科を除くイグアナ下目、少なくとも一部のカナヘビ科の種では、内鼻溝あるいは鼻涙-内鼻溝が前方で鋤鼻器官に連続する。またフトミミズトカゲ科の種でも、内鼻溝が鋤鼻器官に連続する可能性がある。Fischer (1900) は、フトミミズトカゲ科のコモチミミズトカゲ *Trogonophis wiegmanni* では鼻涙管と内鼻溝全体が鼻涙-内鼻溝様に融合しており、同構造が鋤鼻管に連続するとしている。また、Gabe and Saint Girons (1976) は、同種の鼻涙管が内鼻溝前端部分に開口し、内鼻溝は鋤鼻管に連続すると報告した。一方で Bellairs and Boyd (1950) は、同種の鼻涙管は内鼻溝の前端部分のみに融合し、内鼻溝は鋤鼻管に連続しないと報告するとともに、同種のこれら構造の形態的特徴には種内変異が存在する可能性を指摘している。

本研究では、上述の有鱗目で観察される内鼻溝が鋤鼻器官に連続するという形態的特徴を、内鼻孔が鋤鼻器官に連続するムカシトカゲと同一の形質状態 **b-0** として扱い解析を行った。有鱗目の特徴とムカシトカゲの特徴を同一の形質状態として扱ったのは、以下に述べるように前者の内鼻溝と後者の内鼻孔がいずれも原始内鼻孔裂に由来し発生する構造であり (Fuchs, 1908; Parsons, 1970)、それゆえこれらが鋤鼻器官に連続するという特徴は両分類群間で類似しているものと考えられてきたためである (Bellairs and Boyd, 1950)。有鱗目とムカシトカゲの鋤鼻器官は、発生初期には共通して原始内鼻孔裂の前方部分に開口しており、この時点での鋤鼻器官と鼻腔の位置関係は他の四肢動物ともよく共有されている (Fuchs, 1908; Bellairs and Boyd, 1950; Parsons, 1959; 1970)。ム

カシトカゲでは、原始内鼻孔裂が口蓋形成により閉じられることなく内鼻孔へ発生するため、鋤鼻器官と鼻腔の位置関係は生涯にわたって維持され続ける。一方有鱗目では、原始内鼻孔裂は以下の口蓋形成過程によって鼻腔へと発生する背側と内鼻溝へと発生する腹側に分断される。有鱗目の原始内鼻孔裂の口腔への腹側部には、後に鋤鼻管開口部に発生する前端部分と内鼻孔に発生する後方部分を除いて、口蓋が形成される。この口蓋の形成は、具体的には原始内鼻孔裂の内側と外側を取り囲む鋤骨突起 (vomerrine process) と内鼻孔襞 (choanal fold) の接触および融合によって起こる。鋤骨突起と内鼻溝襞はそれぞれ内側鼻隆起と上顎突起に由来し鋤骨と上顎骨に発生する構造である。内鼻溝はそれら構造の接触した境界の腹側から発生し、発生初期には鋤鼻器官から内鼻孔まで連続している。この形態的特徴は有鱗目の発生過程に共通して観察されるため、同目にとって祖先的であると考えられている (Bellairs and Boyd, 1950)。なお、鋤骨突起と内鼻孔襞の融合により原始内鼻孔裂が閉じられる範囲は系統間で異なり、このことは Lakjer (1927) や Rieppel et al. (2008) が認識した口蓋の形態的多様性、すなわち鋤骨と上顎骨の接触による内鼻孔と鋤鼻窓 (vomeronasal fenestra) の隔絶の程度に差異をもたらす。しかし多くのヤモリ類やイグアナ類など、ムカシトカゲと同様に鋤骨と上顎骨が接触しないという祖先的な特徴 (palaeochoanate condition) が観察される有鱗目でさえ、上述の融合は生じる。最尤法による祖先形質状態推定の結果は、形質状態 b-0 が有鱗目の祖先形質であることを示唆した。

内鼻溝あるいは鼻涙-内鼻溝は、オオトカゲ下目、ミミズトカゲ亜目を内包するカナヘビ上科の多くの種、カメレオン科の *Bradypodion* 属では鋤鼻器官に達しない。本研究ではこの形態的特徴を形質状態 b-1 とした。ヨルトカゲ科の種では、内鼻溝が存在するが鋤鼻器官に接触しないという報告 (Young, 1942; Malan, 1946; Bellairs and Boyd, 1950) と、内鼻溝が存在しないという報告 (Gabe and Saint Girons, 1976) があり、形態的特徴の再検討が必要である。この形質状態はオオトカゲ目、*Bradypodion* 属の二系統お

よびカナヘビ上科内の系統でそれぞれ独立に獲得されたことが示唆された。カナヘビ上科の共通祖先のノード、すなわちテグートカゲ科が分岐したノードにおける形質状態が b-1 であった可能性は 54.3 % の尤度比で、b-0 であった可能性は 45.7 % の尤度比で支持されており、同ノードにおける形質状態は明瞭に示されなかった。一方、カナヘビ科が分岐したノードおよびその下位のノードでは、形質状態が b-1 であった可能性がいずれも 74 % 以上の尤度比で支持された。

形質状態 b-2 は、形質状態 a-3 と同様の形態的特徴に対して与えられた。カメレオン科内には *Bradypodion* 属の形質状態 b-1 と、同属を除く種の形質状態 b-2 が存在したが、これらは形質状態 a-2 および a-3 と同様の進化史を経て獲得されたと推定された。

フタアシトカゲ科、セイヨウミミズトカゲ科、トカゲ科の *Feylinia* 属および *Chalcides* 属、およびヘビ亜目の種では、内鼻溝が存在しない。また上述の通り、ヨルトカゲ科の種でも内鼻溝が存在しない可能性がある。本研究ではこの形態的特徴を形質状態 b-3 とした。形質状態 b-3 は、この形質状態を持つ各系統でそれぞれ独立に獲得されたと推定された。

### iii. 鼻涙管と内鼻溝の構造的関係性について (図 3-6C)

鼻涙管が内鼻孔に開口するムカシトカゲの形態的特徴を形質状態 c-0 とした。ヤモリ下目、カメレオン科を除くイグアナ下目、テグートカゲ科、オオトカゲ科を除くオオトカゲ下目の種では、鼻涙管が内鼻溝に開口する。ヤモリ下目のうちヒレアシトカゲ科の種の鼻涙管について、Gabe and Saint Girons (1976) は内鼻溝の前端部に開口すると報告しているが、Bellairs and Boyd (1950) は鋤鼻管にのみ開口し、その他の開口部を持たないと報告している。ヤモリ下目およびカメレオン科を除くイグアナ下目の種では、鼻涙管の内鼻溝への開口部が前方で鋤鼻管まで連続する (図 3-1B-C)。テグートカゲ科の鼻涙管は二つのそれぞれ独立した開口部を持ち、前方の開口部は鋤鼻管に、後方の開口

部は外側内鼻孔裂 (*lateral choanal fissure*) に開口する (図 3-1I)。オオトカゲ下目のうち、ドクトカゲ科のアメリカドクトカゲ *Heloderma suspectum* では、内鼻孔の外背側では二本の鼻涙管が互いに独立しており、それらは内鼻孔よりも前方で一本に融合して鋤鼻管に向かって伸長する (Bernstein, 1999)。Bernstein (1999) は内鼻溝について言及していないが、融合した鼻涙管が内鼻溝様の口蓋の溝に開口する様子が図示されている。また、アシナシトカゲ科およびギャリウオプス科では、鼻涙管がテグートカゲ科のそれと同様にそれぞれ独立した二つの開口部を持つ (図 3-1I)。前方の開口部は鋤鼻管およびその周辺の口蓋に開口しており、後方の開口部は外側内鼻孔裂から内鼻溝にかけて開口する。“ii. 鋤鼻器官と内鼻溝の構造的関係性” で前述した通り、ムカシトカゲの内鼻孔および有鱗目の内鼻溝は共通して原始内鼻孔裂から発生する。さらに、鼻涙管が原始内鼻孔裂に開口する点も共通している。そこで本研究では、これら有鱗目における鼻涙管が内鼻溝に開口するという形態的特徴およびムカシトカゲの形態的特徴を、形質状態 **c-0** として扱った。祖先形質状態推定の結果、形質状態 **c-0** は有鱗目の祖先形質であると推定された。

カナヘビ科、トカゲ上科の大部分、カメレオン科、フトミミズトカゲ科では、鼻涙管が内鼻溝に融合し鼻涙-内鼻溝を形成する。この形態的特徴に与えられた形質状態 **c-1** は、トカゲ上科およびカメレオン科の系統およびカナヘビ上科内のいずれかのノードでそれぞれ独立に獲得されたと推定された。

カナヘビ上科に内包されるミミズトカゲ亜目のミミズトカゲ科、フロリダミミズトカゲ科、オオトカゲ下目のオオトカゲ科では、鼻涙管が内鼻溝に開口せず鋤鼻管に連続する。また上述の通り、ヒレアシトカゲ科およびヨルトカゲ科でも、鼻涙管が内鼻溝に開口しないという報告がある。この形態的特徴に与えられた形質状態 **c-2** は、少なくともオオトカゲ科、ヒレアシトカゲ科、ヨルトカゲ科の系統およびカナヘビ上科内のいずれかのノードでそれぞれ独立に獲得されたと推定された。

形質状態 c-3 は、形質状態 b-3 と同様の形態的特徴に対して与えられた。形質 b-3 の祖先形質状態推定の結果と同様、形質状態 c-3 はこの形質状態を持つ各系統でそれぞれ独立に獲得されたと推定された。

形質 c の祖先形質状態推定の結果において、系統樹内の多くのノードではいずれかの形質状態が 75 % 以上の尤度比で支持された。一方、カナヘビ上科の形質状態の進化史は明瞭に示されなかった。カナヘビ上科の共通祖先のノードの形質状態は、本研究において祖先的と推定された形質状態 c-0 であった可能性が強く支持された。しかしそれ以外のカナヘビ上科内のノードでは、いずれの形質状態の尤度比も 50 % 以下であった。

#### IV. 考察

##### 1. カナヘビ科の鋤鼻器官関連構造の形態的特徴

本研究ではニホンカナヘビの鋤鼻器官およびその関連構造の形態を観察し、本種で鼻涙管の派生構造である鼻涙-内鼻溝が鋤鼻器官に連続しないことを示した。前述の通りこの形態的特徴はカナヘビ科の一部およびカメレオン科の *Bradypodion* 属の種にのみ観察されるものであり、鼻涙管あるいは鼻涙-内鼻溝が鋤鼻器官に開口するという有鱗目の共有派生形質と異なる (Bellairs and Boyd, 1950)。カナヘビ科の鋤鼻器官およびその関連構造の形態的特徴は、複数の先行研究で観察されている (図 3-7)。Lemire (1985) はカナヘビ科 10 種 (*Acanthodactylus boskianus*, *A. dumerilii*, *A. pardalis*, *A. scutellatus*, *Lacerta agilis*, *Mesalina guttulata*, *M. pasteuri*, *Podarcis muralis*, *Timon lepidus*, および *Zootoca vivipara*) の鋤鼻器官およびその関連構造の形態的特徴を観察し、鼻涙-内鼻溝が鋤鼻器官に連続しないと報告した (図 3-7D)。この観察結果は、本研究において観察されたニホンカナヘビの形態的特徴と同様である。一方、Lemire (1985) が観察した 10 種のうち 4 種 (*L. agilis*, *Z. vivipara*, *P. muralis*, および *A. erythrurus*) を観察したその他の研究 (Born, 1879; Fuchs, 1908; Bellairs and Boyd, 1950; Gabe and Saint Girons, 1976) は、共通して鼻涙-内鼻溝が鋤鼻管に連続すると報告している (図 3-7A-C)。このようにカナヘビ科の鋤鼻器官関連構造の観察結果は先行研究間で異なっており、同科のそれら構造の形態的特徴は不明確である。本研究で観察したニホンカナヘビの全ての幼体、成体では共通して鼻涙-内鼻溝が鋤鼻器官に連続していなかったため、これは本種の形態的特徴を表していると考えられる。この観察結果は、Lemire (1985) で報告された有鱗目の共有派生形質とは異なる形態的特徴がカナヘビ科内に確かに存在することを示す。また Slabý (1979a) は、同じくカナヘビ科の種 *Darevskia saxicola* の全長 6 cm の胚 1 個体を観察した結果、内鼻溝と鋤鼻器官の間が上皮組織により遮られていたことを強調している。Slabý (1979a) の図 1-10 の組織切片像では、観察された胚試料の鼻腔周辺の軟骨および

硬骨要素の形成が本研究で観察されたニホンカナヘビ幼体と遜色ない程度まで進んでいることが確認できる。そのため、Slabý (1979a) で観察された胚試料は DH ステージ 37 あるいはそれ以降の発生段階にあたりと推測される。同論文では鼻涙管と内鼻溝の融合に関する言及がなく、鼻涙-内鼻溝という名称を用いた Bellairs and Boyd (1950) の知見を踏まえた議論も行われていない。しかし、Slabý (1979a) の図 6-9 では鋤鼻管と内鼻孔の間の領域の組織切片に鼻涙管様の構造が確認されない。そのため、同論文で内鼻溝と呼称された構造は鼻涙-内鼻溝に相当すると考えられる。*D. saxicola* の孵化後の個体における形態はこれまでに観察されていないが、Slabý (1979a) の観察結果は本研究や Lemire (1985) においてカナヘビ科の種で観察された、鼻涙管あるいはその派生構造が鋤鼻器官に連続しないという形態的特徴 (図 3-7D-F) がカナヘビ科の共有派生形質である可能性を暗示する。この可能性を検証するために、同科内の広範な種間における比較観察が求められる。

## 2. ニホンカナヘビの鋤鼻器官関連構造の胚発生過程

ニホンカナヘビの胚発生において、鼻涙-内鼻溝様の構造は鼻涙管と内鼻溝の融合によりステージ 35 に出現した。この発生段階では同構造は鋤鼻器官に連続しているため、トカゲ科などに観察される (図 3-1E) に類似した構造的関係性であるといえる。鼻涙-内鼻溝の鋤鼻管からの分離、すなわち本種および他の少なくとも数種のカナヘビ科やカメレオン科 *Bradypodion* 属の種に特徴的な構造的関係性 (図 3-1F, 3-7D-F) は、ステージ 37 において出現した (図 3-5F, G) 。しかし、ステージ 37 胚では鋤鼻管と鼻涙-内鼻溝の間には間葉組織が存在するのみであり、孵化後の個体のように鋤骨によって仕切られてはいない (図 3-5C) 。ここで観察された鼻涙-内鼻溝の鋤鼻管からの分離過程は、口蓋の形態形成、特に鋤骨隆起と内鼻孔襞の融合の進行により生じる、他の有鱗目の発生過程における内鼻溝の消失過程 (Fuchs, 1908; Malan, 1946; Bellairs and Boyd, 1950;

Kaczmarek et al., 2017) に類似している。特に、Bellairs and Boyd (1950) で観察されたヨーロッパアシナシトカゲ *Anguis fragilis* における内鼻溝前端の消失、すなわち内鼻溝の鋤鼻管からの分離の過程とよく類似している。しかしニホンカナヘビの鼻涙管は鋤鼻管に到達する前に内鼻溝に融合して鼻涙-内鼻溝を形成し、その後同構造が鋤鼻管から分離する一方で、ヨーロッパアシナシトカゲの鼻涙管は内鼻溝とは独立したまま鋤鼻管に到達し、その後内鼻溝が鋤鼻管から分離しても鋤鼻管に連続し続ける。これらのことから、ニホンカナヘビでは口蓋形成の初期に鼻涙管と内鼻溝が融合することにより、後の口蓋形態形成において他の有鱗目の内鼻溝前端の消失と同様の形態形成が鼻涙管の派生構造である鼻涙-内鼻溝前端の消失、すなわち鋤鼻管からの分離を引き起こすことが示唆された。この可能性を検証するためには、ニホンカナヘビを含むカナヘビ科の種およびトカゲ上科の種など、鼻涙-内鼻溝構造を有する有鱗目間で発生過程を比較する必要がある。また、Bellairs and Boyd (1950) が示唆したように、有鱗目の鋤鼻器官関連構造の形態的特徴は口蓋の形態形成の影響を受けて多様化してきたと考えられる。したがって、これら構造の形態的多様化の発生的機構を解明し、有鱗目の鋤鼻器官による化学感覚受容の進化史を理解するためには、Kaczmarek et al. (2017) や Kaczmarek et al. (2020) のように口蓋の形態形成に注目した鋤鼻器官関連構造の詳細かつ包括的な観察を行い、その結果を系統間で比較解析する必要がある。

### 3. 有鱗目の鋤鼻器官関連構造の進化史

有鱗目のうち、ヤモリ下目およびイグアナ下目の内鼻溝は鼻涙管と鋤鼻器官の両構造に連続する。前節の“ii. 鋤鼻器官と内鼻溝の構造的関係性について”に上述した理由から、この形態的特徴は有鱗目の姉妹群であるムカシトカゲと類似した祖先的な特徴であると見なされている (Bellairs and Boyd, 1950)。祖先形質状態推定の結果は、本研究で形質状態 b-0 および c-0 としたこれら形態的特徴が有鱗目の祖先形質である可能性

を支持している (図 3-6B および C) 。一方、鼻涙管の内鼻溝への開口部の範囲はこれら 2 つの分類群の間で異なる。ヤモリ下目の種の鼻涙管が内鼻溝の前方部分に開口するのに対し、イグアナ下目の種の鼻涙管は外側内鼻孔裂から前方の内鼻溝全体にかけて開口する (図 3-1A, B) 。ムカシトカゲの鼻涙管は鋤鼻器官開口部のわずかに後方で内鼻孔外側に開口する。また、ヤモリ下目は有鱗目の進化史の初期に分岐した分類群であり、鼻涙管の内鼻溝への開口部が同分類群と同様に前方部分のみに限られる有鱗目は他に観察されない。これらのことは、ヤモリ下目の種における鼻涙管の内鼻溝への開口部の位置が、有鱗目にとって祖先的である可能性を示す。

鼻涙管と内鼻溝の非常に密接な構造的関係性は鼻涙-内鼻溝を持つ有鱗目に観察され、この形質状態 c-1 はトカゲ上科、カメレオン科の各系統およびカナヘビ上科内の系統でそれぞれ独立に獲得されたと推定された (図 3-6C) 。これら有鱗目のうち少なくとも一部のカナヘビ科およびカメレオン科 *Bradypodion* 属の種では、鼻涙-内鼻溝が鋤鼻器官に連続しない。この鼻涙管あるいはその派生構造が鋤鼻器官に連続しないという形質状態 a-2 は、有鱗目内においてこれら 2 つの分類群に固有である。図 3-6B に示した結果は、カナヘビ上科の進化史においてカナヘビ科が分岐する以前に形質状態 b-1、すなわち内鼻溝の鋤鼻器官からの分離という特徴が獲得されていたことを示唆している。また、前節“2. ニホンカナヘビにおける鋤鼻器官およびその関連構造の胚発生過程”に述べた通り、ニホンカナヘビの鼻涙-内鼻溝は一部の有鱗目の内鼻溝と同様の形態形成過程により鋤鼻器官から分離する。これらのことから、ニホンカナヘビを含む少なくとも一部のカナヘビ科の種に特徴的な形質状態 a-2、すなわち鼻涙-内鼻溝の鋤鼻管からの分離は、カナヘビ上科の種間で保存的な形質状態 b-1 の形態形成の影響を受けて成立した可能性が考えられる。また、Malan (1946) は *Bradypodion pumilum* の胚発生過程を観察し、鼻涙管 (鼻涙-内鼻溝) が口蓋の形成に伴い鋤鼻器官から分離すると述べている。このことは、カナヘビ科および *Bradypodion* 属の形態形質 a-2 はそれぞれ独立に獲得され

たものであるが、類似した形態形成過程により形成されることを示唆する。同様の形態形成過程が、鋤鼻器官を喪失しており形質状態 a-3、b-2 の特徴を示す種を含むカメレオン科内で保存されているかどうかは現時点で不明であり、同科の種の鋤鼻器官およびその関連構造について今後詳細な観察が必要である。

内鼻溝が存在せず、鼻涙管が鋤鼻器官のみに開口する形質状態 b-3、c-3 は、系統的に離れた複数の分類群で観察される。興味深いことに、これら形質状態を共有する系統の多数が、四肢の喪失や胴体部分の伸長などヘビ類に類似した形態的特徴を示す。図 3-6B および図 3-6C に示された結果は、この形質状態が平行的に進化した可能性を支持している。また、これら種とは異なるが、内鼻溝が鋤鼻器官まで連続し、ヘビ類と同様に四肢を喪失しているヒレアシトカゲ科のクチボソヒレアシトカゲ *Lialis burtonis* では、鼻涙管が内鼻溝に開口しないという報告がある (Bellairs and Boyd, 1950)。さらに同種のハーダー腺は、系統的に近縁なヤモリ類と、系統的には離れているヘビ類の両者に類似した形態的特徴を示す (Rehorek et al., 2000a)。これらのことは、複数の分類群で鋤鼻器官やその関連構造などが地中生活に適応し、ヘビ類に類似した形態に平行進化したという Kaczmarek et al. (2017) の仮説を支持する。現時点でヘビ類様の形態的特徴と生態との直接的な因果関係は不明であり、今後の鋤鼻器官関連構造の機能形態学的解析が期待される。

以上のように、有鱗目の鋤鼻器官、鼻涙管、内鼻溝の構造的関係性には複数の非同形形質 (ホモプラシー) が存在し、それらの大部分が複数の系統でそれぞれ独立に進化したと推定された。また、それら非同形形質の獲得が進化的逆転により生じた可能性は支持されなかった。したがって、有鱗目の進化史において鋤鼻器官とその関連構造の形態的特徴は主に平行進化により多様化してきたと考えられる。一方、鼻涙管と鋤鼻器官の直接的な接触は、この形質状態の機能的拘束を裏付けるように広く保存されてきた。しかしながら、鼻涙管および内鼻溝の形態的特徴が鋤鼻器官による化学受容に

もたらす機能的意義、すなわち内腔液を鋤鼻器官に運ぶ機能に与える影響については理解が進んでいない。鼻涙管が鋤鼻器官にのみ開口するヘビ類では、内腔液が直接鋤鼻器官内に流入することが実験的に示されている (Rehorek et al., 2000c; Souza et al., 2015)。しかし、その他の有鱗目における内腔液の経路はほとんど明らかになっていない。鼻涙管が内鼻溝に開口する有鱗目 (図 3-1B, C, E, G, I) では、内腔液が鋤鼻器官よりも後方で舌の表面に開口すると考えられる (Rehorek, 1997)。これら有鱗目のうち内鼻溝が前方で鋤鼻器官に連続する種 (図 3-1B, C, E) では、内腔液が鼻涙管と内鼻溝の両構造を通過して鋤鼻管周辺に運ばれ、舌の動きを伴って鋤鼻器官内に浸入すると考えられる。有鱗目の内鼻溝および鋤鼻管やマッシュルーム構造表面には絨毛が存在し (Pratt, 1948)、舌の背側表面には絨毛などの微細構造が存在する (Toubeau et al., 1994; Schwenk, 1995; Filoramo and Schwenk, 2009)。これら微細構造は外界の化学物質を保持し、鋤鼻器官内に浸入させるために重要な役割を担うと考えられているが、内腔液を同器官内に流入させるための役割もまた担っている可能性がある。また、鼻涙管が内鼻溝に開口する有鱗目のうち、内鼻溝が鋤鼻器官に連続しない種 (図 3-1G-I) では、口腔に流出した内腔液は舌や鋤鼻管などの微細構造により鋤鼻器官内に流入すると予想される。しかしいづれにせよ、現時点でこれら有鱗目における内腔液の経路は不明である。

多くの有鱗目と異なり、ニホンカナヘビを含む少なくとも一部のカナヘビ科およびカメレオン科 *Bradypodion* 属の種では、内腔液が鼻涙-内鼻溝を通過して鋤鼻器官内に直接流入することはないと考えられる。しかし、*Takydromus* 属の種やその他のカナヘビ科の種と、採餌行動などにおいて鋤鼻感覚が重要な役割を担う他の有鱗目の両者の tongue-flicking 行動に、注目すべき差異は観察されない (Cooper, 1999; Cooper et al., 2000; 2003; Verwajen and Van Damme, 2007; Baeckens et al., 2017a; b)。それゆえに、*Takydromus* 属の種でも他の有鱗目と同様に内腔液が鋤鼻器官内に流入していると考えられる。ニホンカナヘビの舌の前方部分の背側表面にはよく発達した microridge 構造が散在し、これ

らが外界の化学物質を含む液体の保持や拡散に重要な役割を担うと考えられている (Iwasaki and Miyata, 1985)。本種では、この構造あるいはその他の何らかの構造が内腔液を鋤鼻器官内に流入させる役割を担うと考えられる。有鱗目の鋤鼻器官およびその関連構造の形態的多様性の機能的意義を理解するためには、特にトカゲ類など鼻涙管が内鼻溝に開口する種を用いて、内腔液の経路に注目した機能形態学的研究を行う必要がある。これにより、有鱗目の進化史においてその多様化に重要な役割を担ってきたと考えられる鋤鼻感覚の仕組みについての理解が進むだろう。

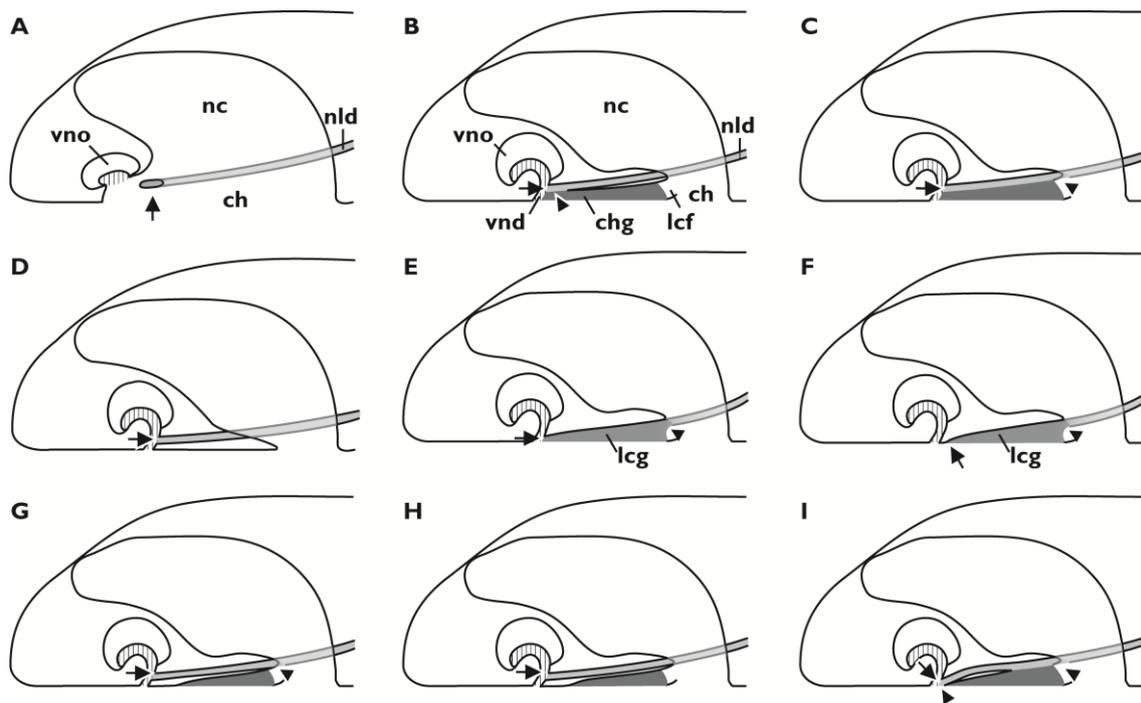


図 3-1. 有鱗目とムカシトカゲの鋤鼻器官および関連構造の関係性. 内側面から見た各構造間の関係性を模式的に示しており, 各図の左側が前方, 右側が後方である. 各図は表 3-2 の“模式図”に対応する. 矢印と矢頭はそれぞれ“鼻涙管前端の開口位置”と“鼻涙管の内鼻溝への開口位置”を示す. 略号は表 3-1 を参照.

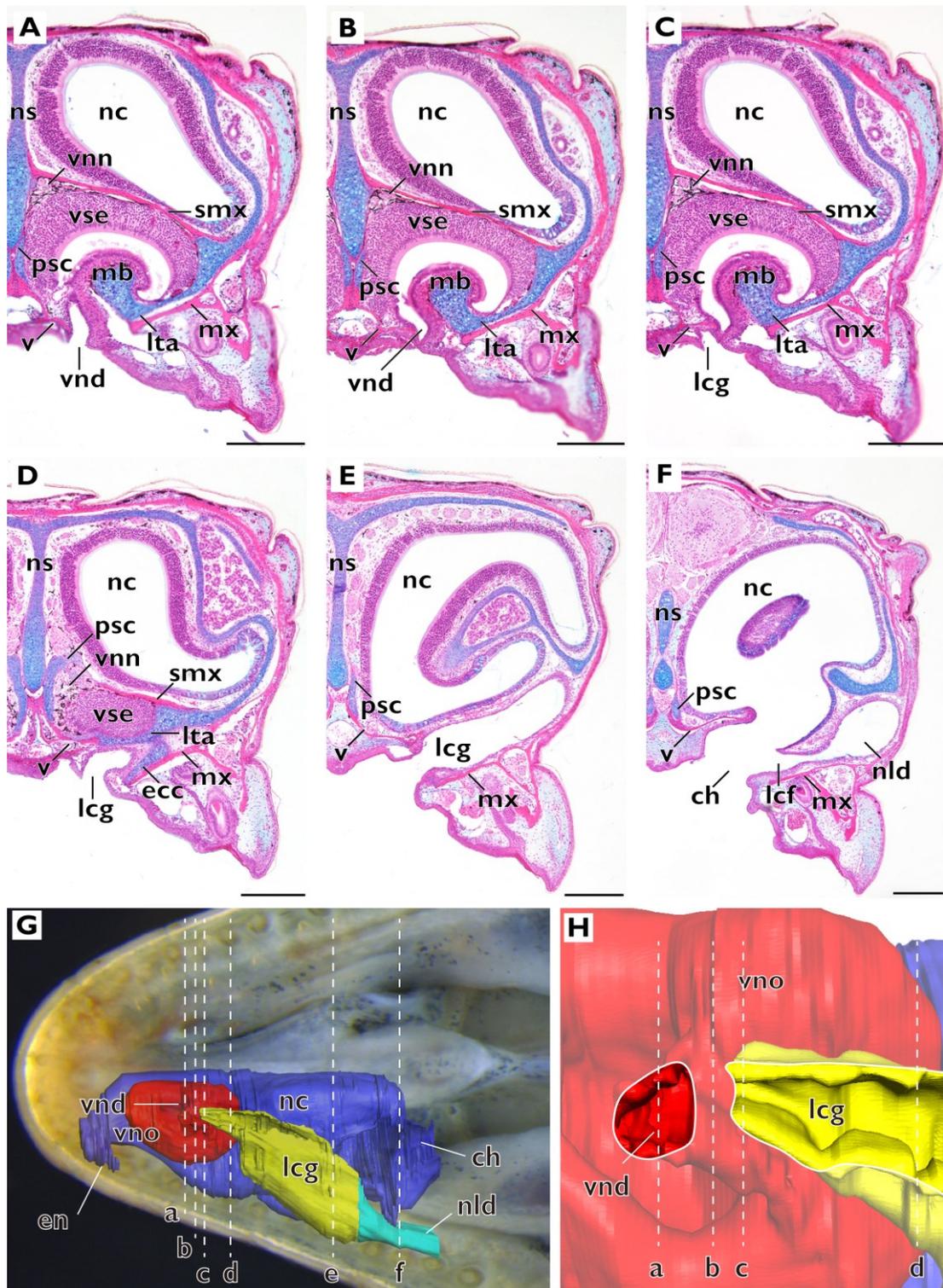


図 3-2. ニホンカナヘビの鋤鼻器官および周辺構造の形態的特徴. A-F: ニホンカナヘビ上顎の横断面. スケールバー = 200  $\mu$ m. G: 鋤鼻器官およびその周辺構造の三次元モデルの腹側面. 破線 a-f は A-F の断面の位置を示す. H: G の鋤鼻管と鼻涙-内鼻溝前端を含む領域の拡大図. 口蓋に露出している領域を白線で囲んで示した. 破線 a-d は本図 A-D の断面の位置を示す. 略号は表 3-1 を参照.

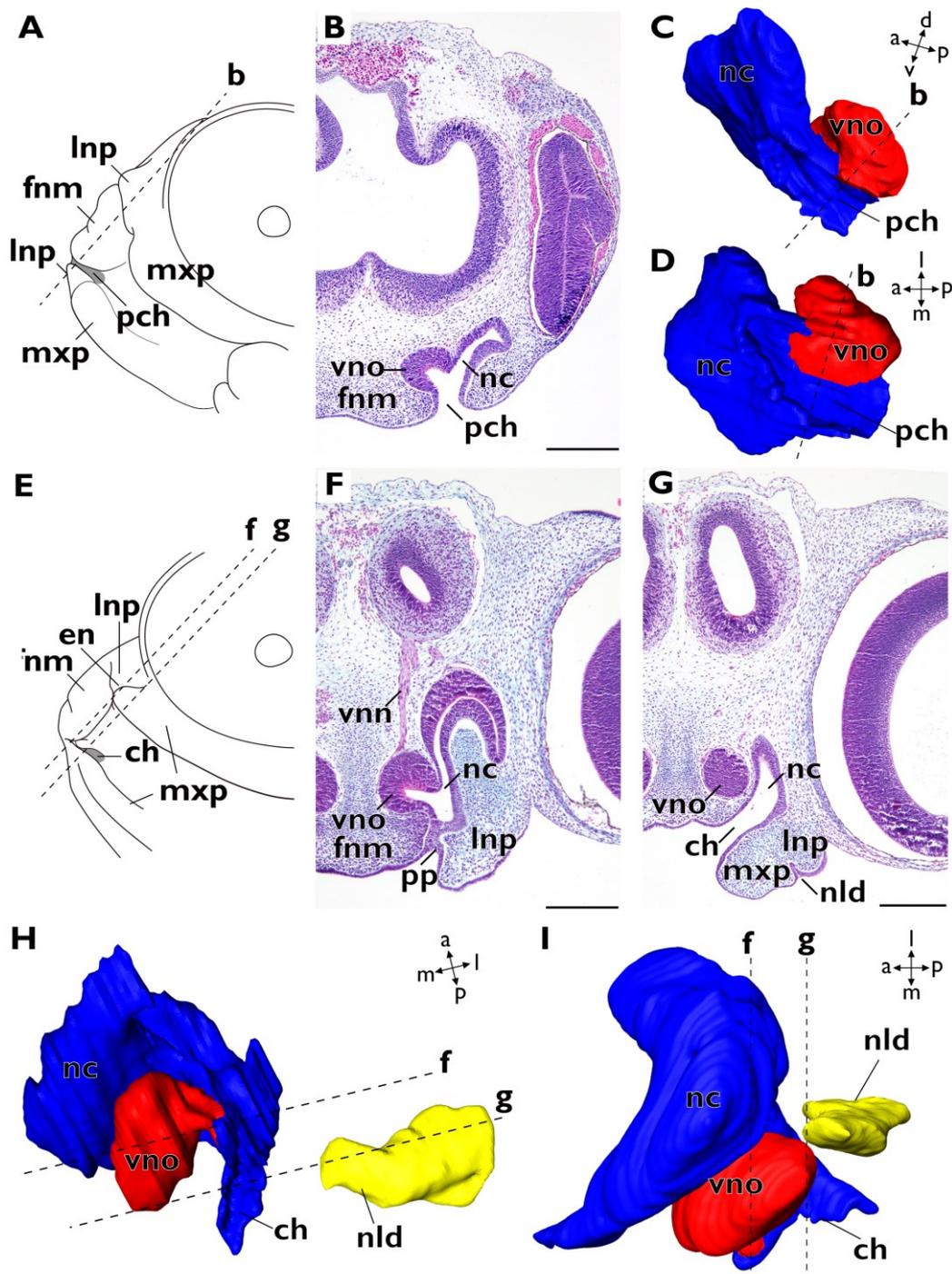


図3-3. ニホンカナヘビDHステージ31, 34胚の鋤鼻器官および周辺構造の形態的特徴. A-D: DHステージ31胚の口蓋領域を左腹側面から示した模式図 (A), 頭部の横断面 (B), 鋤鼻器官および鼻腔の三次元モデルの内腹側面 (C) および腹側面 (D). A, C, D中の破線bはBの断面の位置を示す. E-I: DHステージ34胚の口蓋領域を左腹側面から示した模式図 (E), 頭部の横断面 (F, G), 鋤鼻器官および鼻腔の三次元モデルの腹側面 (H) および外側面 (I). E, H, I中の破線f, gはF, Gの断面の位置を示す. B, F, G中のスケールバー = 200  $\mu\text{m}$ . 略号は表3-1を参照.

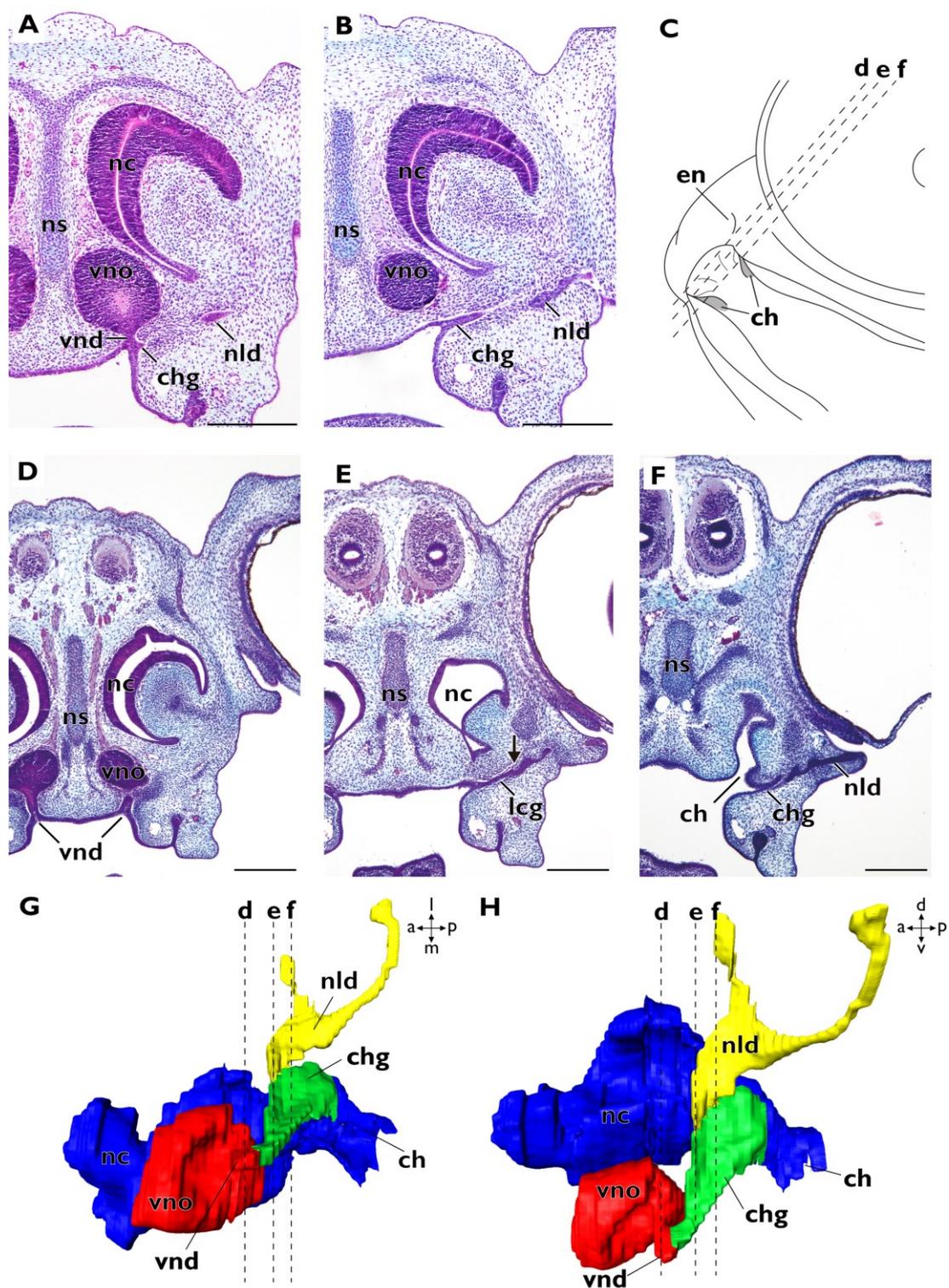


図 3-4. ニホンカナヘビ DH ステージ 35 胚の鋤鼻器官および周辺構造の形態的特徴. A, B: DH ステージ 35 初期胚の頭部の横断面. C-H: DH ステージ 35 後期胚の口蓋領域を左腹側面から示した模式図 (C), 頭部の横断面 (D-F), 鋤鼻器官および鼻腔の三次元モデルの腹側面 (G) および外腹側面 (H). C, G, H 中の破線 d-e-f は D-F の断面の位置を示す. A, B, D-F 中のスケールバー = 200  $\mu$ m. 略号は表 3-1 を参照.

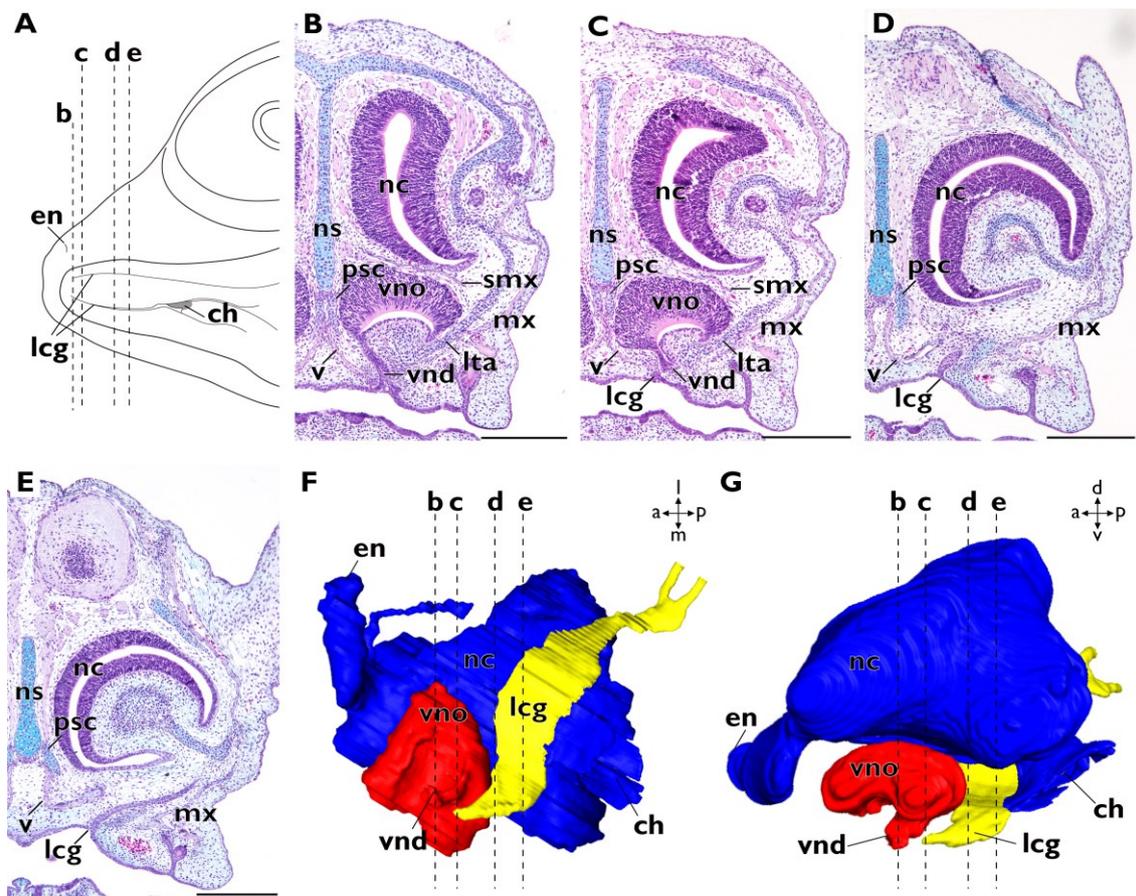


図 3-5. ニホンカナヘビ DH ステージ 37 胚の鋤鼻器官および周辺構造の形態的特徴. A: 口蓋領域を左腹側面から示した模式図. B-E: 頭部の横断面. スケールバー = 200  $\mu\text{m}$ . F, G: 鋤鼻器官および鼻腔の三次元モデルの腹側面 (F) および内側面 (G). A, F, G 中の破線 b-e は B-E の断面の位置を示す. 略号は表 3-1 を参照.

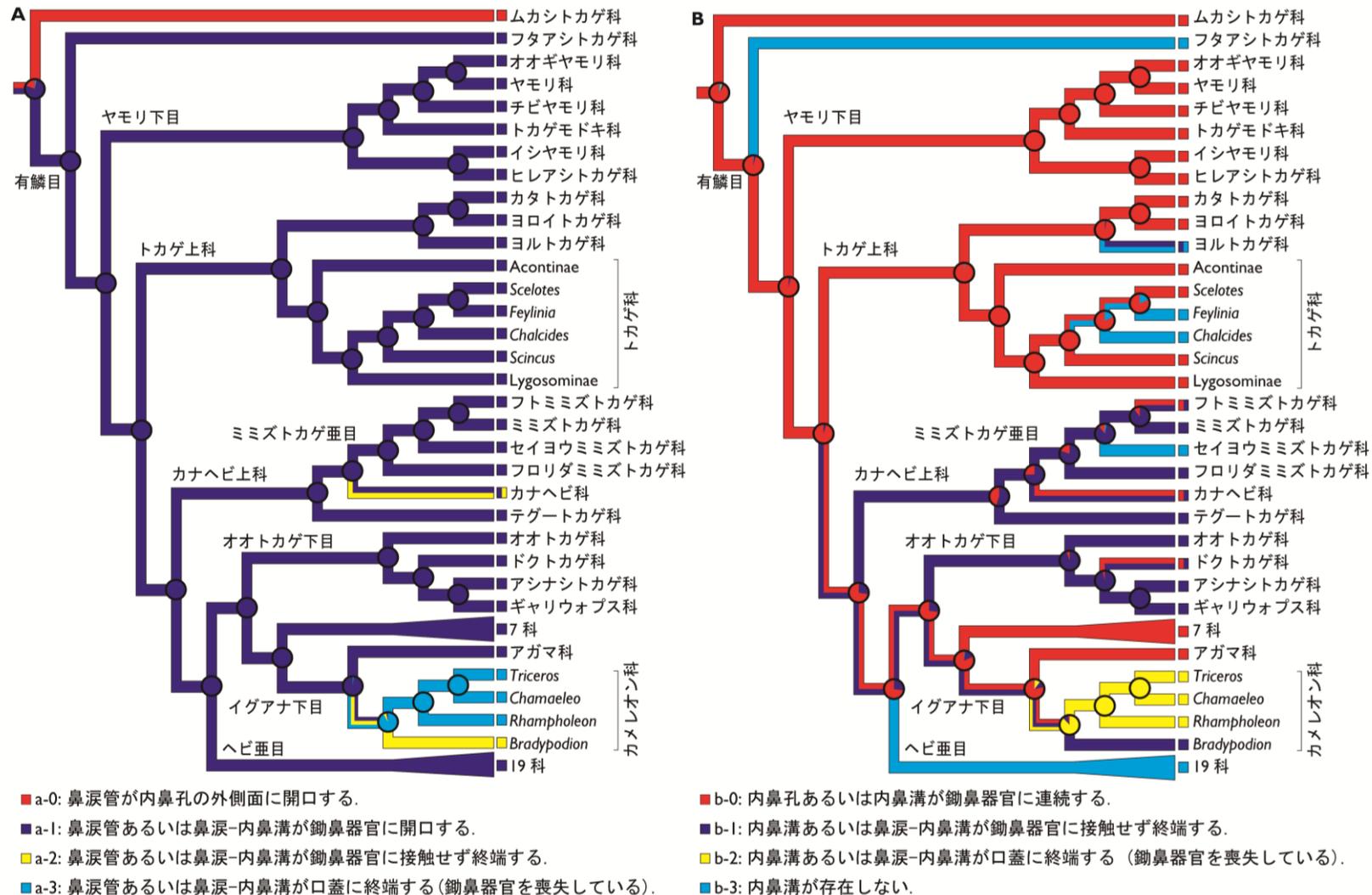


図 3-6. 有鱗目の鋤鼻器官と鼻涙管 (A), 鋤鼻器官と内鼻溝 (B), 鼻涙管と内鼻溝 (C) の構造的関係性の進化史。各形質状態の最節約的な進化史と尤度比を、それぞれ系統樹の枝と各節上の円グラフに示した。複数の形質状態が再節約的である枝や、形質状態が不確かな系統は複数の色で示した。

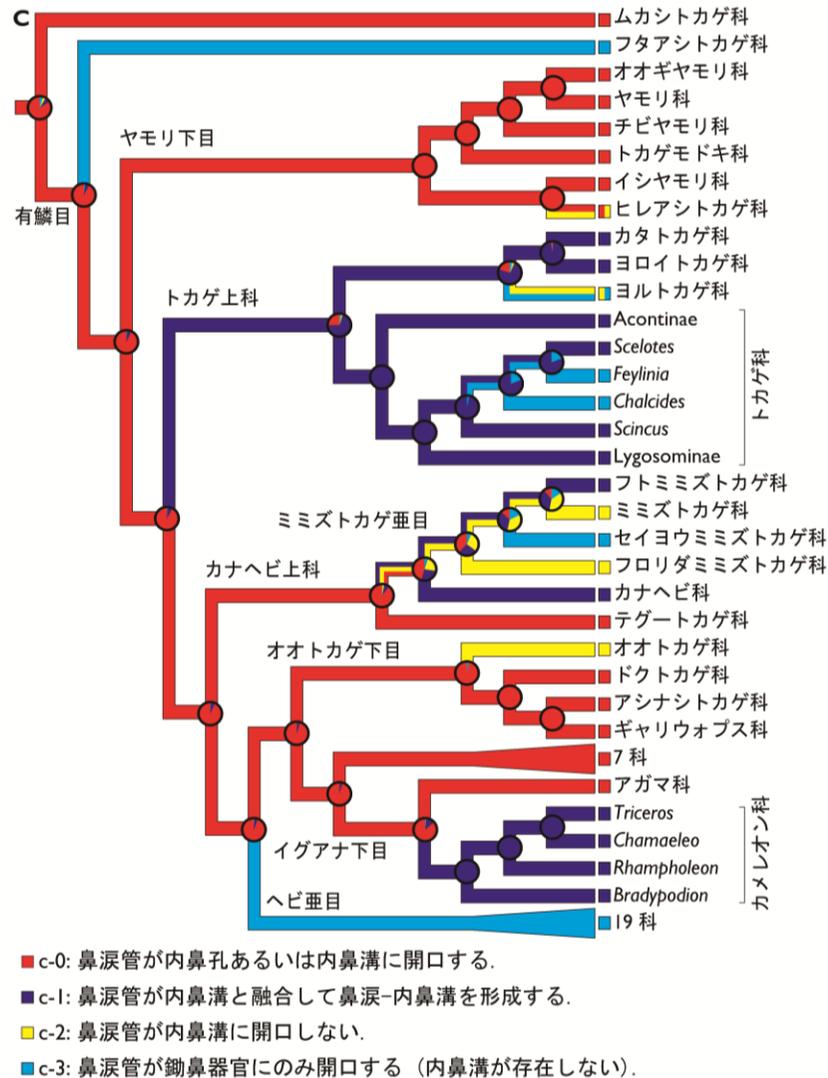


図 3-6. 有鱗目の鋤鼻器官と鼻涙管 (A), 鋤鼻器官と内鼻溝 (B), および鼻涙管と内鼻溝 (C) の構造的関係性の進化史 (続き).

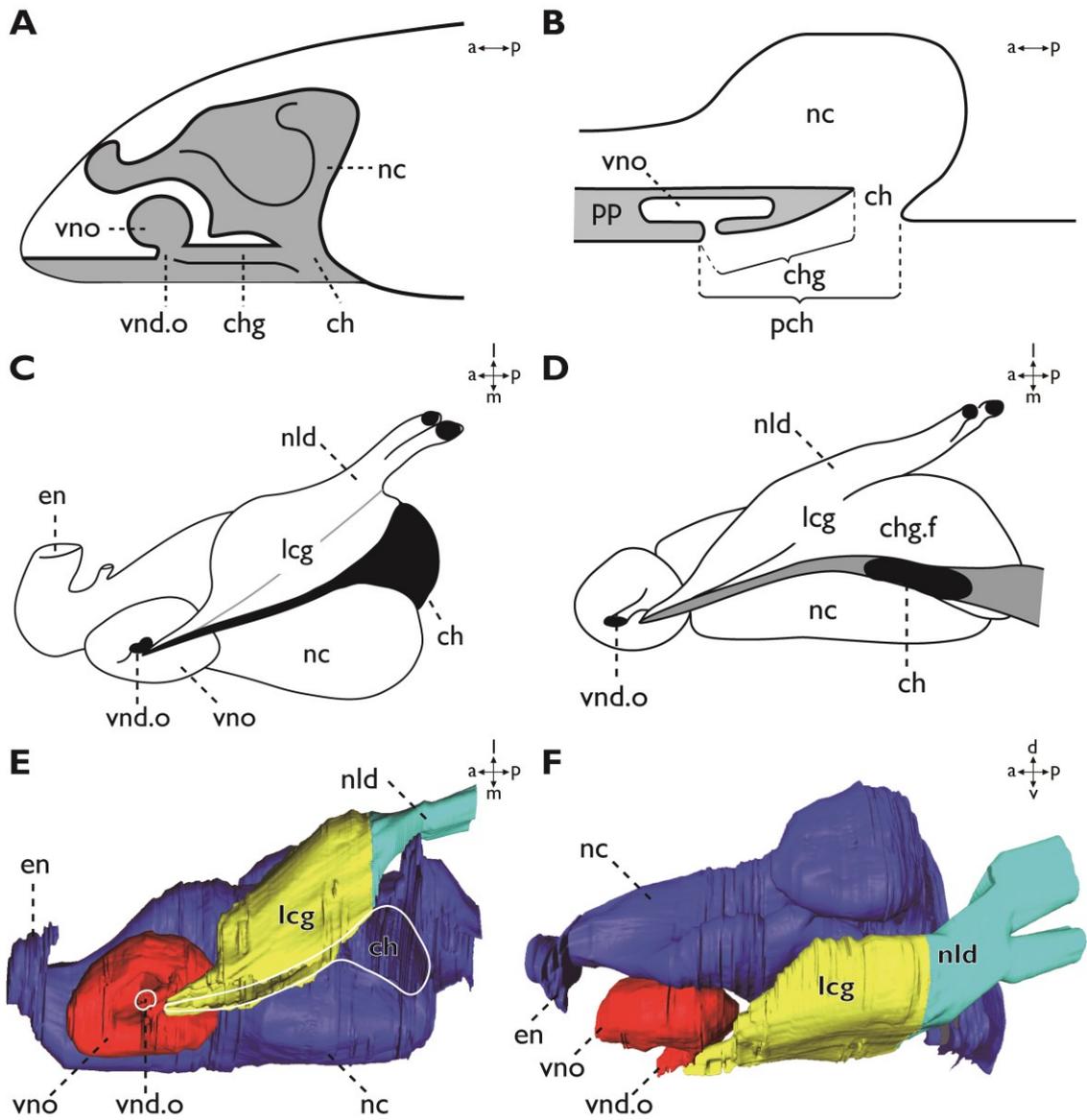


図 3-7. カナヘビ科の鋤鼻器官および周辺構造の形態的特徴. A, B: カナヘビ科の種の鼻腔周辺構造の縦断面を示した模式図. Fuchs (1908) の図 2b および文中図 7 より改変. C: コモチカナヘビの鼻腔周辺構造の腹側面模式図. Bellairs and Boyd (1950) の図 12G より改変. D: *Eremias guttulata* などカナヘビ科の種の鼻腔周辺構造の腹側面模式図. Lemire (1985) の図 28a より改変. E, F: ニホンカナヘビの鼻腔, 鋤鼻器官周辺構造の立体構造モデルの腹側面 (E) および外側面 (F). 口蓋に露出している領域を白線で囲んで示した. 略号は表 3-1 を参照.

表 3-1. 図中で用いた略号と対応する解剖学的名称.

略号	解剖学的名称	解剖学的名称 (日本語名)
ch	choana	内鼻孔
cf	choanal fold	後鼻孔襞
chg	choanal groove	内鼻溝
chg.f	floor of choanal groove	内鼻溝の底面
ecc	ectchoanal cartilage	-
en	external naris	外鼻孔
fnm	frontonasal mass	前頭鼻隆起
lcg	lachrymo-choanal gutter	鼻涙-内鼻溝
lnp	lateral nasal prominence	外側鼻隆起
lta	lamina transversalis anterior	-
mb	mushroom body	マッシュルームボディ構造
mx	maxillary process	上顎骨
mxp	maxillary process	上顎突起
nld	nasolacrimal duct	鼻涙管
nc	nasal cavity	鼻腔
ns	nasal septum	鼻中隔
pch	primitive choana	原始内鼻孔
pp	primary palate	一次口蓋
psc	paraseptal cartilage	副鼻中隔軟骨
smx	septomaxilla	中隔上顎骨
v	vomer	鋤骨
vnd	vomeronasal duct	鋤鼻管
vnd.o	opening of vomeronasal duct	鋤鼻管開口部
vnn	vomeronasal nerve	鋤鼻神経
vno	vomeronasal organ	鋤鼻器官
vse	vomeronasal sensory epithelium	鋤鼻感覚上皮

表 3-2. 有鱗目およびムカシトカゲ目の鋤鼻器官, 鼻涙管, 内鼻溝の形態的特徴.

分類群 (属)	鼻涙管前端の開口位置*1	鼻涙管の内鼻溝への開口位置	内鼻溝の前方範囲	模式図*2	参考文献*3
ムカシトカゲ目					
ムカシトカゲ科	鼻腔の大部分は内鼻孔を介して口腔に連続する. 鋤鼻器官および鼻涙管は内鼻孔前方の内側および外側壁に開口する. 鼻涙管の内鼻溝への開口部は鋤鼻器官の開口部よりもやや後方に位置する.			A	1; 2
有鱗目					
フタアシトカゲ下目					
フタアシトカゲ科	鋤鼻器官内腔	無し	内鼻溝が存在しない	-	3
ヤモリ下目					
オオギヤモリ科	鋤鼻管	内鼻溝の前方部分	鋤鼻管まで連続	B	2; 4; 5; 7; 8
ヤモリ科	鋤鼻管	内鼻溝の前方部分	鋤鼻管まで連続	B	2; 4; 5; 6; 7
チビヤモリ科	鋤鼻管	内鼻溝の前方部分	鋤鼻管まで連続	B	2; 9
トカゲモドキ科	鋤鼻管	内鼻溝の前方部分	鋤鼻管まで連続	B	2; 4
イシヤモリ科	鋤鼻管	内鼻溝の前端部分	鋤鼻管まで連続	-	4
ヒレアシトカゲ科	鋤鼻管	不明 (無し/内鼻溝前端)	鋤鼻管まで連続	-	2; 4
トカゲ上科					
カタトカゲ科	鋤鼻管および周辺の口蓋	鼻涙管と内鼻溝が融合して鼻涙-内鼻溝を形成		E	4
ヨロイトカゲ科	鋤鼻管および周辺の口蓋	鼻涙管と内鼻溝が融合して鼻涙-内鼻溝を形成		E	4; 6
ヨルトカゲ科	鋤鼻器官内腔	無し	不明 (内鼻溝が存在しない/ 鋤鼻管のすぐ後方で終端)	-	2; 4; 6; 11
トカゲ科	鋤鼻管および周辺の口蓋	鼻涙管と内鼻溝が融合して鼻涙-内鼻溝を形成		E	2; 4; 5; 6; 7; 9
トカゲ科 ( <i>Feylinia</i> ; <i>Chalcides</i> )	鋤鼻管	無し	内鼻溝が存在しない	D	4; 10

表 3-2. 有鱗目およびムカシトカゲ目の鋤鼻器官, 鼻涙管, 内鼻溝の形態的特徴 (続き).

分類群 (属)	鼻涙管前端の開口位置*1	鼻涙管の内鼻溝への開口位置	内鼻溝の前方範囲	模式図*2	参考文献*3
有鱗目					
カナヘビ上科					
テグートカゲ科	鋤鼻管	後方部分 (外側内鼻孔裂)	鋤鼻管の後方で終端	G	2; 4; 6; 7; 8
カナヘビ科	鋤鼻管および周辺の口蓋	鼻涙管と内鼻溝が融合して鼻涙-内鼻溝を形成		E	2; 4; 5; 9
カナヘビ科 ( <i>Takydromus</i> など)	口蓋 (鋤鼻管の後方で終端)	鼻涙管と内鼻溝が融合して鼻涙-内鼻溝を形成		F	7; 12
ミミズトカゲ亜目					
フロリダミミズトカゲ科	鋤鼻管	無し	鋤鼻管の後方で終端	H	2; 6; 10
セイヨウミミズトカゲ科	鋤鼻管	無し	内鼻溝が存在しない	D	4
ミミズトカゲ科	鋤鼻管	無し	鋤鼻管の後方で終端	H	2; 4; 6; 13
フトミミズトカゲ科*4	鋤鼻管および周辺の口蓋	内鼻溝の前端に融合	鋤鼻管のすぐ後方で終端	-	2; 4; 10
フトミミズトカゲ科*4	鋤鼻管および周辺の口蓋	鼻涙管と内鼻溝が融合して鼻涙-内鼻溝を形成		E	13
オオトカゲ下目					
オオトカゲ科*5	鋤鼻管	無し	鋤鼻管の後方で終端	-	2; 4; 5; 6; 7; 8
ドクトカゲ科	鋤鼻管	開口 (開口範囲は不明)	不明	-	4; 14
アシナシトカゲ科	鋤鼻管および周辺の口蓋	前端および後方部分	鋤鼻管のすぐ後方で終端	I	2; 4; 6; 10
ギャリウオプス科	鋤鼻管および周辺の口蓋	前端および後方部分	鋤鼻管のすぐ後方で終端	I	2; 6
イグアナ下目					
カメレオン科*6	口蓋*6	鼻涙管と内鼻溝が融合して鼻涙-内鼻溝を形成		-	2; 4; 5; 6
カメレオン科 ( <i>Bradypodion</i> )	口蓋 (鋤鼻管の後方で終端)	鼻涙管と内鼻溝が融合して鼻涙-内鼻溝を形成		F	6; 15; 16

表 3-2. 有鱗目およびムカシトカゲ目の鋤鼻器官, 鼻涙管, 内鼻溝の形態的特徴 (続き).

分類群 (属)	鼻涙管前端の開口位置*1	鼻涙管の内鼻溝への開口位置	内鼻溝の前方範囲	模式図*2	参考文献*3
有鱗目					
イグアナ下目					
イグアナ科	鋤鼻管	内鼻溝全体	鋤鼻管まで連続	C	4; 5; 6; 7; 8
レイオサウルス科	鋤鼻管	内鼻溝全体	鋤鼻管まで連続	C	5
スベイグアナ科	鋤鼻管	内鼻溝全体	鋤鼻管まで連続	C	5
ブキオトカゲ科	鋤鼻管	内鼻溝全体	鋤鼻管まで連続	C	4
トロピドゥルス科	鋤鼻管	内鼻溝全体	鋤鼻管まで連続	C	7
ツノトカゲ科	鋤鼻管	内鼻溝全体	鋤鼻管まで連続	C	4; 5; 6; 7
アノールトカゲ科	鋤鼻管	内鼻溝全体	管状の内鼻溝が鋤鼻管まで連続	-	2; 4; 6; 17
ヘビ亜目 (19 科)	鋤鼻管	無し	内鼻溝が存在しない	D	2; 4; 8; 18; 19; 20; 21; 22

\*1: 鼻涙-内鼻溝を持つ系統では同構造前端の開口位置を示す. \*2: 図 3-1 の模式図との対応を示す. \*3: 1, Hoppe, (1934) ; 2, Bellairs and Boyd (1950) ; 3, Hallermann (1998) ; 4, Gabe and Saint Girons (1976) ; 5, Born (1879) ; 6, Malan (1946) ; 7, Lemire (1985) ; 8, Bellairs (1949) ; 9, Fuchs (1908) ; 10, Bellairs (1950) ; 11, Young (1942) ; 12, This study; 13, Fischer (1900) ; 14, Bernstein (1999) ; 15, Brock (1941) ; 16, Engelbrecht (1951) ; 17, Kaczmarek et al. (2020) ; 18, Born (1883) ; 19, Abbasi et al. (2011) ; 20, Gharzi et al. (2013) ; 21, El-din and Dakrory (2015) ; 22, Kaczmarek et al. (2017) . \*2: Bellairs and Boyd (1950) はコモチミズトカゲ *Trogonophis wiegmanni* の鼻涙管と内鼻溝の融合範囲に種内変異がある可能性を指摘している. \*3. 左右両側にそれぞれ 2 本の鼻涙管が存在する. この表では腹側の長い鼻涙管の特徴を記載している. \*4: 発生過程において鼻涙-内鼻溝が鋤鼻器官に連続するが, その後鋤鼻器官は鼻涙-内鼻溝前端と同化するよう消失する.

表 3-3. 祖先形質状態推定に用いた形質状態.

形質	形質状態	形態的特徴
a	0	鼻涙管が内鼻孔の外側面に開口する.
	1	鼻涙管が鋤鼻器官に開口する.
	2	鼻涙管あるいは鼻涙-内鼻溝が鋤鼻器官に接触せず終端する.
	3	鼻涙管あるいは鼻涙-内鼻溝が口蓋に終端する (鋤鼻器官を喪失している).
b	0	内鼻孔あるいは内鼻溝が鋤鼻器官に連続する.
	1	内鼻溝あるいは鼻涙-内鼻溝が鋤鼻器官に接触せず終端する.
	2	内鼻溝あるいは鼻涙-内鼻溝が口蓋に終端する (鋤鼻器官を喪失している).
	3	内鼻溝が存在しない.
c	0	鼻涙管が内鼻孔あるいは内鼻溝に開口する.
	1	鼻涙管が内鼻溝と融合して鼻涙-内鼻溝を形成する.
	2	鼻涙管が内鼻溝に開口しない.
	3	鼻涙管が鋤鼻器官にのみ開口する (内鼻溝が存在しない).

表 3-4. 祖先形質状態推定に用いた形質状態行列.

目	下目/上科	科 (亜科/属)	形質 a* <sup>1</sup>	形質 b* <sup>2</sup>	形質 c* <sup>3</sup>
ムカシトカゲ目		ムカシトカゲ科	0	0	0
有鱗目	フタアシトカゲ下目	フタアシトカゲ科	1	3	3
	ヤモリ下目	ヒレアシトカゲ科	1	0	0/2
		イシヤモリ科	1	0	0
		トカゲモドキ科	1	0	0
		ヤモリ科	1	0	0
		オオギヤモリ科	1	0	0
		チビヤモリ科	1	0	0
	トカゲ上科	カタトカゲ科	1	0	1
		ヨロイトカゲ科	1	0	1
		ヨルトカゲ科	1	1/3	2/3
		トカゲ科 (Acontinae)	1	0	1
		トカゲ科 ( <i>Feylinia</i> )	1	3	3
		トカゲ科 ( <i>Scelotes</i> )	1	0	1
		トカゲ科 ( <i>Chalcides</i> )	1	3	3
		トカゲ科 ( <i>Scincus</i> )	1	0	1
		トカゲ科 ( <i>Lygosominae</i> )	1	0	1
	カナヘビ上科	カナヘビ科	1/2	0/1	1
		テグートカゲ科	1	1	0
	(ミミズトカゲ亜目)	フトミミズトカゲ科	1	0/1	1
		ミミズトカゲ科	1	1	2
		セイヨウミミズトカゲ科	1	3	3
		フロリダミミズトカゲ科	1	1	2
	オオトカゲ下目	オオトカゲ科	1	1	2
		ドクトカゲ科	1	0/1	0
		アシナシトカゲ科	1	1	0
		ギャリウオプス科	1	1	0
	イグアナ下目	レイオサウルス科	1	0	0
		ブキオトカゲ科	1	0	0
		スベイグアナ科	1	0	0
		ツノトカゲ科	1	0	0
		アノールトカゲ科	1	0	0
		トロピドウルス科	1	0	0
		イグアナ科	1	0	0
		アガマ科	1	0	0
		カメレオン科 ( <i>Triceros</i> )	3	2	1
		カメレオン科 ( <i>Chamaeleo</i> )	3	2	1
		カメレオン科 ( <i>Rhampoleon</i> )	3	2	1
		カメレオン科 ( <i>Bradypodion</i> )	2	1	1
	へび亜目	19 科	1	3	3

\*: 形質 a, b, c の各列の形質状態 0-3 は表 3-3 に対応する. 形質状態が 0 あるいは 1 など不確定な場合, 0/1 とした.

## 第4章 総論

### I. 有鱗目トカゲ類の多様化機構解明に向けて

本研究は四肢動物の中で最も多様化した分類群の一つである有鱗目に注目した。まず、同目トカゲ類のうちカナヘビ科ニホンカナヘビおよびトカゲ科ヒガシニホントカゲの2種の産卵後発生段階を定義した。さらに、同2種の産卵後胚発生の特徴を明らかにし、発生学的研究に資する可能性を議論した。これらの内容により、有鱗目トカゲ類を研究材料に用いた更なる発生学的研究に寄与する新たな基礎的知見を与えた。続いて、同分類群の生態に重要な役割を担い、その多様化に関与してきたと考えられる鋤鼻器官の関連構造の形態的多様性に焦点を当て、ニホンカナヘビの鋤鼻器官とその関連構造の形態的特徴、またそれらの発生過程を組織学的に観察し、同種の鋤鼻器官関連構造の形態が他の大部分の有鱗目と異なることを明らかにした。これまでに有鱗目の鋤鼻器官の発生過程を調べた研究では、供試した胚試料の体サイズが示されたり、器官形態形成が独自の段階に分けられたりしてきた。しかし、これら研究のほぼ全てでは、観察した器官形態形成過程がどのような外部形態の胚試料で観察されたかが示されてこなかった。そのため新たに比較発生学的研究を行う際には、どの発生段階の胚試料を観察すべきかを予備的に探索する必要がある。本研究ではニホンカナヘビの連続したDHステージの胚試料を用いて鋤鼻器官およびその関連構造の形態観察を行い、発生段階の進行に伴い鋤鼻器官などの形態形成が連続的に進行することが明らかになった。またクラッチ間で、同一のDHステージの胚試料の器官形態が大幅に異なることはなかった。同様にKaczmarek et al. (2020) は、鋤鼻器官およびその関連構造の形態形成がSanger et al. (2008) の発生段階の進行に伴い進むことを明らかにしている。これらのことは、有鱗目の体内器官のうち少なくとも鋤鼻器官やその関連構

造の形態形成過程の比較形態観察を行うためには、DH ステージや Sanger (2008) の発生段階の活用が有効であることを示している。一方で、DH ステージをはじめとする発生段階は胚の外部形態的特徴、特に咽頭弓や四肢、体鱗などの発生を基準に判断され、それら外部形態的特徴を観察して体内の器官構造を把握することは困難である。例えば本研究では、外部形態から DH ステージ 35 と同定されたニホンカナヘビ胚試料のうち、DH ステージ 35 前期の胚試料では前期鼻涙管が内鼻溝に接触していなかったが、後期の胚試料では接触していた。胚発生は連続的に進行するため、このように単一の発生段階の中でも異なる形態的特徴が観察されることはしばしばある。そのため、連続した発生段階の胚試料を観察することが、必ずしも連続した器官形態形成過程の詳細な観察に十分であるとは限らない。しかし、比較発生学的観察やそれに基づく進化発生学的研究の発展のためには、胚試料の発生段階あるいは外部形態的特徴と器官形成過程が対応付けられていくべきだろう。

次世代シーケンサーに代表される近年の遺伝子配列解析技術の進歩は顕著であり、これまでに複数の有鱗目を対象とした全ゲノム配列解析プロジェクトも行われている。これら解析技術は今後さらに発展し、有鱗目の多様性やその創出機構を分子レベルで解明することにも大きく貢献してゆくと期待される。ところが、有鱗目の進化発生学的研究の基盤はこれら解析技術により得られる分子生物学的知見を十分に活用できるように整備されているとは言い難い。この原因となっている課題の一つに、有鱗目トカゲ類の発生段階の定義が多様な分類群を網羅していないことによる、基礎的知見の不十分さが挙げられる。この課題は、過去十数年間にトカゲ類の発生段階を定義する研究が増加していることを踏まえると、今後解決に向かっていくと予想される。一方で、胚発生における体内の様々な器官形成過程の大部分が未解明であるという課題は未だ解決に向かっていないと考えられる。また、有鱗目は著しい多様性を示す分類群

であるため、種や個体群の特徴の解明を試みた形態学的研究がこれまで数多く行われてきたが、それら形態学的研究の大部分が骨格要素や外部形態の特徴に注目してきた。そのため、軟組織や体内の器官形態の形態的特徴の大部分が未だ十分に理解されていないという課題も存在する。本稿の第3章では、複数の発生段階の胚試料の連続パラフィン切片を作製し、その連続断面像をもとに鋤鼻器官およびその周辺構造の三次元形態を網羅的に再構築した。同章の結果や同様の多くの先行研究の結果が得られているように、この手法は体内の近接した数種類の器官の立体構造を再構築しつつ、その内部組織形態などを観察するために有効であった。しかし、筆者が同様の手法を用いて体内の様々な器官の立体構造の網羅的な再構築を試みたところ、切片作製の実験工程において組織形態に歪みが生じることは避け難く、多数の体内器官の大規模な立体構造を正確に再構築することが非常に困難であった。また同様の理由から、多数の連続切片像の位置合わせには多大な労力を要した。そのため、体内器官の立体構造を網羅的に再構築して観察するためには、X線マイクロCTや位相X線イメージングなど形態の保持に優れる非破壊的な三次元イメージング技術を用いる必要があると考えられる。一方、現時点でこれらイメージング技術は断面像の解像度で組織切片に劣る。特定の微小な器官構造や動物胚など小さな生体試料の器官構造の形態観察を行う場合、連続切片を作製する手法では情報量が多く精細な体組織断面像を得ることが可能であり、目的組織の特異的な染色も可能である。これらのことから、今後有鱗目の形態学的研究や進化発生学的研究に広く貢献する知見を整備するにあたっては、上述のイメージング技術を用いた体内器官の立体構造の把握と、連続組織切片の作製に基づく組織形態の精細な観察を併せて行うべきであろう。これら手法を用いて体内の器官構造の形成過程に関する知見を蓄積していくことで、有鱗目を研究材料に用いた進化発生学的研究が今後さらに発展すると期待される。

## II. バイオセラピー学の理念における本研究の位置づけ

本節では、バイオセラピー学の範疇において野生動物の生物多様性の理解への貢献を目的とした本研究の意義について論じる。考察に先立ち、バイオセラピー学入門(林、山口, 2012)を参考に、この学問領域の学理について概観する。バイオセラピー学は、20世紀以降の大量生産、大量消費時代の到来により生産性や商業性を重視して生産生物学 (Production Biology) に傾倒した農学を、福祉農学と環境農学の二種類の視点に基づいて発展させることを目指して誕生した学問分野である。これらのうち福祉農学の視点は、園芸植物や伴侶動物などの生物資源を活用することで、人間の日常生活の質の向上、医療や福祉の現場における心身の健康の改善を目指す。また環境農学の視点は、人間の生活にもたらされる利潤の追求に固執することなく、生物資源の基盤となる自然環境の負荷の少ない利用法を追求する。つまり人間の生活と、生物多様性および生態系を取り巻く自然環境の保全や保護が調和する社会の実現を目指すものである。これらのことから、バイオセラピー学の理念および同学問分野が目指す農学の発展の方向は、園芸植物や伴侶動物など人間が以前から活用してきた生物資源のみならず、自然環境の生物多様性に由来するあらゆる生物資源をも基盤とし、それらを人間の生活が持続的かつ効果的に利活用する方法を探索、開発、実践していくことにあると考える。

本研究は爬虫類の一分類群である有鱗目の生物多様性を学理的に理解しようとしたものであり、得られた知見を人間の生活における利活用と直接的に結びつけることは難しい。そのため、上述した環境農学の目的を狭義にのみ捉えた場合には、一見本研究がその範疇、ひいてはバイオセラピー学の理念に内包されないように思われる。しかし環境農学は、生物の人類への資源的価値の探索や、保全生物学的視点に基づい

た自然環境の保全方策の設定など実践的な研究ばかりを追求する分野ではない。なぜなら環境農学分野の取り組みは生物資源の基盤となる自然環境無くして存在し得ず、自然環境を構成する生態系や生物多様性の創出機構を理解すること自体が同分野にとって必要不可欠な要素であるからだ。つまり、有鱗目の生物多様性の理解を目指した本研究の内容は、環境農学およびバイオセラピー学の根幹を担うものである。

本稿の第2章では、発生学的研究への貢献を目的として日本産トカゲ類2種、すなわちニホンカナヘビおよびヒガシニホントカゲの産卵後胚発生を観察し、これらトカゲ類の自然史の一端を明らかにした。これらトカゲ類2種やヒガシニホントカゲの近縁種であるニホントカゲおよびオカダトカゲは、国内の大部分の地域では市街地でも容易に観察され、人間の生活に非常に身近な爬虫類である。前出のバイオセラピー学入門(林、山口, 2012)第2章で述べられているように、バイオセラピー学が環境農学の視点から野生生物や生態系を考える際に重要な視点の一つに、生態系サービスという概念がある(Millennium Ecosystem Assessment Series, 2005)。生態系サービスはバイオセラピー学と同様に野生生物あるいは生態系と人間の健康や文化との関係に注目したものであり、地球生態系が人類の肉体、精神的な健康や文化を築くための文化機能を有することを強調している。本稿第2章で示された身近な野生動物に関する新たな生物学的知見は、生態系サービスの文化機能のうち教育の側面が有する、生活を心豊かにする知識の取得や体験の活性化に寄与すると期待される。このように、身近な野生生物を含む生態系や生物多様性の理解から生まれる知見は確かにバイオセラピー学に貢献し得るものである。そして、バイオセラピー学に貢献する知見は環境農学あるいは福祉農学の実践的な研究においてのみ得られるものではない。今後、野生生物を対象とした研究を行う様々な分野の研究者がバイオセラピー学やその構成要素である環境農学および福祉農学の視点を備えることで、生態系や生物多様性を理解すること

と、これらを内包する自然環境と人間生活との好適な関係を模索することはもはや別個の課題ではなくなるだろう。また、それら研究者は野生生物の文化的価値に関する教育普及活動を積極的に実施することで、人間が生物多様性の恩恵を持続的に享受するために必要不可欠な自然環境の保全努力を社会全体で強化することに貢献する責任がある。

## 謝辞

指導教官である佐々木剛教授には、生命科学研究の面白さから科学者を目指す者の心構え、論文の書き方、その他あらゆる面において7年もの間ご指導を賜りました。何事においても悠長で至らない私に幾度となく叱咤激励をかけていただくとともに、大変自由に研究に取り組ませていただきました。ここに深く感謝申し上げます。

また、本論文の副査を快くお引き受けくださった東京農業大学農学部野生動物学研究室の小川博教授、松林尚志教授、東京農業大学農学部動物行動学研究室の増田宏司教授、東京工業大学生命理工学院の二階堂雅人准教授および東邦大学理学部生物学科の土岐田昌和講師に多大なる感謝を申し上げます。加えて、祖先形質状態推定に関してご指導していただいた東京農業大学農学部の米澤隆弘准教授、組織切片標本作製に関してご助言下さった東京農業大学農学部の杉山立志准教授に深く感謝申し上げます。さらに、東京農業大学農学部野生動物学研究室の工藤光平助教、ならびに現東京農業大学国際食糧情報学部熱帯作物保護学研究室の和久大介助教には、日々野生動物学研究の様々な視点を与えていただくとともに、多くのご助言をいただきました。また、佐久間夢氏をはじめとする同研究室の皆様には、飼育動物の管理など様々な面でお力添えを賜りました。ここに改めて皆様へ感謝申し上げます。

そして、東京農業大学農生命科学研究所からは大学院博士後期課程研究支援制度による研究費の補助を、同大学後援会からは国際学会への参加資金援助を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

最後に、本研究は研究者の道を志した私を常に温かく見守り、支え続けてくださった祖母、両親、家族ならびに多くの友人の存在があつてこそ遂行することができました。この場を借りて皆様に深く感謝申し上げます。

## 引用文献

[第1章 序論]

Baeckens, S., R. Van Damme, and W. E. J. Cooper. 2017. How phylogeny and foraging ecology drive the level of chemosensory exploration in lizards and snakes. *Journal of Evolutionary Biology* 30:627–640.

Bertmar, G. 1981. Evolution of vomeronasal organs in vertebrates. *Evolution* 35:359–366.

Billett, F., C. Gans, and P. F. A. Maderson. 1985. Why Study Reptilian Development? In: *Biology of the Reptilia*. Volume 14. Development A. C. Gans, F. Billett and P. F. A. Maderson (eds.). Jhons Willey and Sons, New York, pp. 1–39.

Birchard, G. F., and D. Marcellini. 1996. Incubation time in reptilian eggs. *Journal of Zoology* 240:621–635.

Brennan, P. A., and F. Zufall. 2006. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* 444:308–315.

Brykczynska, U., A. C. Tzika, I. Rodriguez, and M. C. Milinkovitch. 2013. Contrasted evolution of the vomeronasal receptor repertoires in mammals and squamate reptiles. *Genome Biology and Evolution* 5:389–401.

Burbrink, F. T., F. G. Grazziotin, R. A. Pyron, D. Cundall, S. Donnellan, F. Irish, J. S. Keogh, F. Kraus, R. W. Murphy, B. Noonan, C. J. Raxworthy, et al. 2020. Interrogating genomic-scale data for Squamata (lizards, snakes, and amphisbaenians) shows no support

- for key traditional morphological relationships. *Systematic Biology* 69:502–520.
- Camp, C. L. 1923. Classification of the lizards. *American Museum of Natural History* 48:289–480.
- Conrad, J. L. 2008. Phylogeny and systematics of Squamata (Reptilia) based on morphology. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 310:1–182.
- Cooper, W. E. 1994. Chemical discrimination by tongue-flicking in lizards: A review with hypotheses on its origin and its ecological and phylogenetic relationships. *Journal of Chemical Ecology* 20:439–487.
- Dufaure, J. P., and J. Hubert. 1961. Table de développement du lézard vivipare: *Lacerta (Zootoca) vivipara* Jacquin. *Archives d'anatomie microscopique et de morphologie expérimentale* 50:309–328.
- Estes, R., K. De Queiroz, and J. Gauthier. 1988. Phylogenetic relationships within Squamata. In: *Phylogenetic relationships of the lizard families*. R. Estes and G. Pregill (eds.). Stanford University Press, pp. 119–281.
- Ferguson, M. W. J. 1985. Reproductive Biology and Embryology of the Crocodylians. In: *Biology of the Reptilia*. Volume 14. Development A. C. Gans, F. Billet and P. F. A. Maderson (eds.). Jhons Willey and Sons, New York, pp. 329–391.
- Filoramo, N. I., and K. Schwenk. 2009. The mechanism of chemical delivery to the vomeronasal organs in squamate reptiles: a comparative morphological approach. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 311A:20–34.

- de Fraipont, M., J. Clobert, and R. Barbault. 1996. The evolution of oviparity with egg guarding and viviparity in lizards and snakes: A phylogenetic analysis. *Evolution* 50:391–400.
- Gauthier, J. A., M. Kearney, J. A. Maisano, O. Rieppel, and A. D. Behlke. 2012. Assembling the squamate tree of life: Perspectives from the phenotype and the fossil record. *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History* 53:3–308.
- Graves, B. M., and M. Halpern. 1990. Roles of vomeronasal organ chemoreception in tongue flicking, exploratory and feeding behaviour of the lizard, *Chalcides ocellatus*. *Animal Behaviour* 39:692–698.
- Greer, A. E. 1991. Limb reduction in squamates: identification of the lineages and discussion of the trends. *Journal of Herpetology* 25:166–173.
- Hamburger, V., and H. L. Hamilton. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 88:49–92.
- Huang, G.-Z., J.-J. Zhang, D. Wang, R. T. Mason, and M. Halpern. 2006. Female snake sex pheromone induces membrane responses in vomeronasal sensory neurons of male snakes. *Chemical Senses* 31:521–529.
- Jones, M. E. H., C. L. Anderson, C. A. Hipsley, J. Müller, S. E. Evans, and R. R. Schoch. 2013. Integration of molecules and new fossils supports a Triassic origin for Lepidosauria (lizards, snakes, and tuatara). *BMC Evolutionary Biology* 13:208.
- Kishida, T., Y. Go, S. Tatsumoto, K. Tatsumi, S. Kuraku, and M. Toda. 2019. Loss of olfaction in sea snakes provides new perspectives on the aquatic adaptation of amniotes.

Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 286:20191828.

Kubie, J. L., and M. Halpern. 1979. Chemical senses involved in garter snake prey training.

*Journal of Comparative and Physiological Psychology* 93:648–667.

Miller, J. D. 1985. Embryology of Marine Turtles. In: *Biology of the Reptilia*. Volume 14.

Development A. C. Gans, F. Billet and P. F. A. Maderson (eds.). Jhons Willey and Sons, New York, pp. 269–328.

Parsons, T. S. 1970. The Nose and Jacobson's Organ. In: *Biology of the Reptilia*. Volume 2.

Morphology B. C. Gans and T. S. Parsons (eds.). London: Academic Press, pp. 99–191.

Pyron, R. A., and F. T. Burbrink. 2014. Early origin of viviparity and multiple reversions to

oviparity in squamate reptiles. *Ecology Letters* 17:13–21.

Pyron, R. A., F. T. Burbrink, and J. J. Wiens. 2013. A phylogeny and revised classification of

Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology* 13:1.

Raynaud, A. 1990. Developmental mechanism involved in the embryonic reduction of limbs in

reptiles. *International Journal of Developmental Biology* 34:233–243.

Schwenk, K. 1993. The evolution of chemoreception in squamate reptiles: A phylogenetic

approach. *Brain, Behavior and Evolution* 41:124–137.

Simões, T. R., M. W. Caldwell, M. Tałanda, M. Bernardi, A. Palci, O. Vernygora, F. Bernardini,

L. Mancini, and R. L. Nydam. 2018. The origin of squamates revealed by a Middle Triassic lizard from the Italian Alps. *Nature* 557:706–709.

- Taniguchi, K., S. Saito, and K. Taniguchi. 2011. Phylogenic outline of the olfactory system in vertebrates. *The Journal of Veterinary Medical Science* 73:139–147.
- Townsend, T. M., A. Larson, E. Louis, and J. R. Macey. 2004. Molecular Phylogenetics of Squamata: The Position of Snakes, Amphisbaenians, and Dibamids, and the Root of the Squamate Tree. *Systematic Biology* 53:735–757.
- Trinh, K., and D. R. Storm. 2003. Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nature Neuroscience* 6:519–525.
- Uetz, P., P. Freed, and J. Hošek. 2020. The Reptile Database. <http://www.reptile-database.org>. (accessed on 31th December 2020).
- Vidal, N., and S. B. Hedges. 2005. The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes, and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. *Comptes Rendus Biologies* 328:1000–1008.
- Vitt, L. J., and J. P. Caldwell. 2014. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Fourth Edition. In.: Academic Press, Tokyo.
- Vitt, L. J., E. R. Pianka, W. E. Cooper, and K. Schwenk. 2003. History and the global ecology of squamate reptiles. *The American Naturalist* 162:44–60.
- Watson, C. M., R. Makowsky, and J. C. Bagley. 2014. Reproductive mode evolution in lizards revisited: updated analyses examining geographic, climatic and phylogenetic effects support the cold-climate hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology* 27:2767–2780.

Woodley, S. K. 2010. Pheromonal communication in amphibians. *Journal of Comparative Physiology A* 196:713–727.

Yntema, C. L. 1968. A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. *Journal of Morphology* 125:219–251.

Zehr, D. R. 1962. Stages in the normal development of the Common garter snake, *Thamnophis sirtalis sirtalis*. *Copeia* 2:322–329.

中村健児, 松井正文. 1988. 第1部 総説. 動物系統分類学 第9巻 (下B1) 脊椎動物 (IIb1) 爬虫類I (中村健児, 疋田努, 松井正文 著). pp. 1–221. 中山書店, 東京.

疋田努. 2012. 爬虫類の進化. 東京大学出版会, 東京.

若尾慶子. 2018. 南西諸島固有両生類・爬虫類のペット取引. *Traffic*. pp. 1–18.

[第2章 有鱗目トカゲ類 2種を用いた発生学的基盤研究]

Alturk, W. I. M., and E. R. Khannoon. 2020. Ontogeny of the Moorish gecko *Tarentola mauritanica* with emphasis on morphogenesis of the skin and its derivatives. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 334:294–310.

Ballowitz, E. 1905. Die Gastrulation bei der Blindschleiche (*Anguis fragilis* L.). *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* 83:707–732.

Billy, A. J. 1988. Observations on the embryology of the unisexual lizard *Cnemidophorus*

- uniparens* (Teiidae). *Journal of Zoology* 215:55–81.
- Birchard, G. F., and D. Marcellini. 1996. Incubation time in reptilian eggs. *Journal of Zoology* 240:621–635.
- Blanc, F. 1974. Table de développement de *Chamaeleo lateralis* Gray, 1831. *Annales D'Embryologie et de Morphogenese* 7:99–115.
- Braña, F., A. Bea, and M. Jesús. 1991. Egg retention in lacertid lizards: relationships with reproductive ecology and the evolution of viviparity. *Herpetologica* 47:218–226.
- Dhouailly, D., and R. Saxod. 1974. Les stades du développement de *Lacerta muralis* Laur. entre la ponte et l'éclosion. *Bulletin de la Société zoologique de France*. 99:489–494.
- Du, W.-G., L. Shou, and J.-K. Liu. 2003. The effect of incubation temperature on egg survival, hatchling traits and embryonic use of energy in the blue-tailed skink, *Eumeces elegans*. *Animal Biology* 53:27–36.
- Dufaure, J. P., and J. Hubert. 1961. Table de développement du lézard vivipare: *Lacerta (Zootoca) vivipara* Jacquin. *Archives d'anatomie microscopique et de morphologie expérimentale* 50:309–328.
- Eckalbar, W. L., E. D. Hutchins, G. J. Markov, A. N. Allen, J. J. Corneveaux, K. Lindblad-Toh, F. Di Palma, J. Alföldi, M. J. Huentelman, and K. Kusumi. 2013. Genome reannotation of the lizard *Anolis carolinensis* based on 14 adult and embryonic deep transcriptomes. *BMC Genomics* 14:49.

- Georges, A., Q. Li, J. Lian, D. O'Meally, J. Deakin, Z. Wang, P. Zhang, M. Fujita, H. R. Patel, C. E. Holleley, Y. Zhou, et al. 2015. High-coverage sequencing and annotated assembly of the genome of the Australian dragon lizard *Pogona vitticeps*. *GigaScience* 4:45.
- Gregorovicova, M., O. Zahradnicek, A. S. Tucker, P. Velensky, and I. Horacek. 2012. Embryonic development of the monitor lizard, *Varanus indicus*. *Amphibia Reptilia* 33:451–468.
- Hara, Y., M. Takeuchi, Y. Kageyama, K. Tatsumi, M. Hibi, H. Kiyonari, and S. Kuraku. 2018. Madagascar ground gecko genome analysis characterizes asymmetric fates of duplicated genes. *BMC Biology* 16:40.
- Hara, Y., K. Tatsumi, M. Yoshida, E. Kajikawa, H. Kiyonari, and S. Kuraku. 2015. Optimizing and benchmarking de novo transcriptome sequencing: From library preparation to assembly evaluation. *BMC Genomics* 16:977.
- Hasegawa, M. 1984. Biennial reproduction in the lizard *Eumeces okadae* on Miyake-jima, Japan. *Herpetologica* 40:194–199.
- Hasegawa, M. 1985. Effect of brooding on egg mortality in the lizard *Eumeces okadae* on Miyake-Jima, Izu islands, Japan. *Copeia* 1985:497–500.
- Hasegawa, M. 1990. Demography of an island population of the lizard, *Eumeces okadae*, on Miyake-jima, Izu Islands. *Researches on Population Ecology* 32:119–133.
- Hikida, T. 1981. Reproduction of the Japanese Skink (*Eumeces latiscutatus*) in Kyoto. *Zoological magazine* 90:85–92.

- Hugi, J., C. Mitgutsch, and M. R. Sánchez-Villagra. 2010. Chondrogenic and ossification patterns and sequences in White's skink *Liopholis whitii* (Scincidae, Reptilia). *Zoosystematics and Evolution* 86:21–32.
- Inukai, T. 1927. Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Reptilien: I. Die frühesten Entwicklungsvorgänge bei der Waldeidechse (*Lacerta vivipara* Jacq.). Journal of the College of Agriculture, Hokkaido Imperial University.
- Inukai, T. 1930. Notes on the breeding habits of *Takydromus tachydromoides* Schlegel. Journal of the faculty of science in Hokkaido Imperial University series VI. *Zoology* 1(1):33–43.
- Ishihara, S. 1964. Observation on egg-laying and hatching of the lizard, *Takydromus tachydromoides* (Schlegel). Bulletin of the Kyoto Gakugei University series B 25:79–85. (in Japanese with English summary)
- Iungman, J. L., M. N. Molinero, M. S. Simoncini, and C. I. Piña. 2019. Embryological development of *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae). *genesis* 57:e23280.
- Ji, X., and Z. Zhang. 2001. Effects of thermal and hydric environments on incubating eggs, hatching success, and hatchling traits in the Chinese skink (*Eumeces chinensis*). *Acta Zoologica Sinica* 47:256–265.
- Kanda, Y. 2013. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplantation* 48:452–458.
- Khannoon, E. R. 2015. Developmental stages of the climbing gecko *Tarentola annularis* with special reference to the claws, pad lamellae, and subdigital setae. *Journal of Experimental*

Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution 324:450–464.

Kuriyama, T., and M. Hasegawa. 2017. Embryonic developmental process governing the conspicuousness of body stripes and blue tail coloration in the lizard *Plestiodon laticutatus*. *Evolution & Development* 19:29–39.

Lemus, D. 1967. Contribucion al estudio de la embriologia de reptiles chilenos. II. Tabla de desarrollo de la lagartija vivipara *Liolaemus gravenhorsti*. *Biológica* 40:39–61.

Lemus, D., J. Illanes, M. Fuenzalida, Y. P. De La Vega, and M. Garcia. 1981. Comparative analysis of the development of the lizard, *Liolaemus tenuis tenuis*. II. A series of normal postlaying stages in embryonic development. *Journal of Morphology* 169:337–349.

Lima, F. C., T. R. Py-Daniel, M. R. Sartori, A. S. Abe, O. P. dos Santos, L. M. Freitas, K. F. Pereira, and A. Sebben. 2019. Developmental staging table of the green iguana. *Acta Zoologica* 100:232–244.

Ma, L., K. Guo, S. Su, and X. Ji. 2019. Embryonic Growth and Yolk Depletion during Incubation in the Chinese Skink, *Plestiodon chinensis*. *Asian Herpetological Research* 10:56–61.

Ma, L., Z. Lin, J. Gao, H. Li, X. Ji, and H. Lu. 2018. Maternal thermal effects on female reproduction and hatchling phenotype in the Chinese skink (*Plestiodon chinensis*). *Asian Herpetological Research* 9:250–257.

Meyer, E. 1910. Über die Entwicklung der Blindschleiche (*Anguis fragilis* L.) vom Auftreten des Proamnion bis zum Schlusse. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* 94:447–487.

- El Mouden, E., J. Bons, C. Pieau, S. Renous, M. Znari, and A. Boumezzough. 2000. Table de développement embryonnaire d'un lézard agamidé, *Agama impalearis* Boettger, 1874. Annales des Sciences Naturelles - Zoologie et Biologie Animale 21:93–115.
- Muthukkaruppan, V., P. Kanakambika, V. Manickavel, and K. Veeraraghavan. 1970. Analysis of the development of the lizard, *Calotes versicolor*. I. A series of normal stages in the embryonic development. Journal of Morphology 130:479–489.
- Nicolas, A. 1904. Recherches sur l'embryologie des Reptiles. IV. La segmentation chez l'Orvet (*Anguis fragilis*). Archives de Biologie 20:611–658.
- Noro, M., A. Uejima, G. Abe, M. Manabe, and K. Tamura. 2009. Normal developmental stages of the Madagascar ground gecko *Paroedura pictus* with special reference to limb morphogenesis. Developmental Dynamics 238:100–109.
- Oka, T. 1971. Morphogenesis of the visceral pouches in the lizard, *Takydromus tachydromoides* SCHLEGEL. Bulletin of Tokyo Gakugei University. Section IV 23:118–128. (in Japanese with English summary)
- Oka, T. 1996. Influence of incubation temperature on sex determination in the lizard, *Takydromus tachydromoides*. Bulletin of Tokyo Gakugei University. Section IV 48:53–56. (in Japanese with English summary)
- Okamoto, T., and T. Hikida. 2012. A new cryptic species allied to *Plestiodon japonicus* (Peters, 1864) (Squamata: Scincidae) from eastern Japan, and diagnoses of the new species and two parapatric congeners based on morphology and DNA barcode. Zootaxa 3436:1–23.

- Ollonen, J., F. O. Da Silva, K. Mahlow, and N. Di-Poi. 2018. Skull development, ossification pattern, and adult shape in the emerging lizard model organism *Pogona vitticeps*: a comparative analysis with other squamates. *Frontiers in Physiology* 9:278.
- Pasteels, J. 1956. Une table analytique du développement des reptiles. I. Stades de gastrulation chez cheloniens et lacertiliens. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*:217–241.
- Peter, K. 1904. Normentafel zur Entwicklungsgeschichte der Zauneidechse (*Lacerta agilis*). In: *Normentafeln zur Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere*. volume 4. G. Fischer (ed.). pp. 1–165.
- Py-Daniel, T. R., A. Kennedy Soares De-Lima, F. Campos Lima, A. Pic-Taylor, O. Rodrigues Pires Junior, and A. Sebben. 2017. A Staging Table of Post-Ovipositional Development for the South American Collared Lizard *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae). *The Anatomical Record* 300:277–290.
- Qu, Y. F., H. L. Lu, H. Li, and X. Ji. 2014. Incubation temperature fluctuation does not affect incubation length and hatchling phenotype in the Chinese skink *Plestiodon chinensis*. *Journal of Thermal Biology* 46:10–15.
- Rodríguez-Díaz, T., and F. Braña. 2011. Plasticity and limitations of extended egg retention in oviparous *Zootoca vivipara* (Reptilia: Lacertidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 102:75–82.
- Roscito, J. G., and M. T. Rodrigues. 2012. Embryonic development of the fossorial

- gymnophthalmid lizards *Nothobachia ablephara* and *Calyptommatus sinebrachiatus*.  
*Zoology* 115:302–318.
- Sanger, T. J., J. B. Losos, and J. J. Gibson-Brown. 2008. A developmental staging series for the lizard genus *Anolis*: A new system for the integration of evolution, development, and ecology. *Journal of Morphology* 269:129–137.
- Shapiro, M. D. 2002. Developmental morphology of limb reduction in *Hemiergus* (Squamata: Scincidae): Chondrogenesis, osteogenesis, and heterochrony. *Journal of Morphology* 254:211–231.
- Shapiro, M. D., J. Hanken, and N. Rosenthal. 2003. Developmental basis of evolutionary digit loss in the Australian lizard *Hemiergus*. *Journal of Experimental Zoology* 297B:48–56.
- Shen, W., J. Pei, L. Lin, and X. Ji. 2017. Effects of constant versus fluctuating incubation temperatures on hatching success, incubation length, and hatchling morphology in the chinese skink (*Plestiodon chinensis*). *Asian Herpetological Research* 8:262–268.
- Shen, X. X., D. Liang, Y. J. Feng, M. Y. Chen, and P. Zhang. 2013. A versatile and highly efficient toolkit including 102 nuclear markers for vertebrate phylogenomics, tested by resolving the higher level relationships of the caudata. *Molecular Biology and Evolution* 30:2235–2248.
- Shine, R. 1983. Reptilian reproductive modes: The oviparity-viviparity continuum. *Herpetologica* 39:1–8.
- Skinner, M. M. 1973. Ontogeny and adult morphology of the skull of the South African Skink,

- Mabuya capensis* (Gray). *Annale van die Uniwersiteit van Stellenbosch* 48:1–116.
- Takenaka, S. 1980. Growth of the Japanese Grass Lizard *Takydromus tachydromoides* in Relation to Reproduction. *Herpetologica* 36:305–310.
- Takenaka, S. 1981a. Intraspecific variation in reproduction of the lizard, *Takydromus tachydromoides*, with its intraspecific comparison with *T. smaragdinus*. University of Tsukuba, for doctoral degree:1–183.
- Takenaka, S. 1981b. Maturity and other reproductive traits of the Kanahebi Lizard *Takydromus tachydromoides* (Sauria, Lacertidae) in Mito. *Japanese journal of herpetology* 9:46–53.
- Telford, S. R. 1969. The ovarian cycle, reproductive potential, and structure in a population of the Japanese lacertid *Takydromus tachydromoides*. *Copeia* 1969:548–567.
- Thapliyal, J. P., K. S. Singh, and A. Chandola. 1973. Pre-laying stages in the development of Indian garden lizards *Calotes versicolor*. *Annales D'Embryologie et de Morphogenese* 6:253–379.
- Turner, F. B. 1977. The dynamics of populations of squamates, crocodylians and rhynchocephalians. In: *Biology of the Reptilia*. Volume 7. C. Gans and D. W. Tinkle (eds.). Academic Press, New York, pp. 157–264.
- Werneburg, I. 2009. A standard system to study vertebrate embryos. *PLoS ONE* 4:e5887.
- Werneburg, I., K. M. Polachowski, and M. N. Hutchinson. 2015. Bony skull development in the Argus monitor (Squamata, Varanidae, *Varanus panoptes*) with comments on

developmental timing and adult anatomy. *Zoology* 118:255–280.

Whiteley, S. L., C. E. Holleley, W. A. Ruscoe, M. Castelli, D. L. Whitehead, J. Lei, A. Georges, and V. Weisbecker. 2017. Sex determination mode does not affect body or genital development of the central bearded dragon (*Pogona vitticeps*). *EvoDevo* 8:25.

Wise, P. A. D., M. K. Vickaryous, and A. P. Russell. 2009. An embryonic staging table for In ovo development of *Eublepharis macularius*, the leopard gecko. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 292:1198–1212.

Zhao, R.-N., L.-Y. Zhang, P.-F. Wu, J. Ping, J.-Y. Jin, and Y.-P. Zhang. 2017. The morphological characteristics of embryos at different developmental stages in the Japanese Gecko, *Gekko japonicus*. *Chinese Journal of Zoology* 52:987–995.

昆 泰寛. 2000. 獣医発生学用語 改定・2版. 獣医解剖学・組織学・発生学・家禽用語集 (日本獣医解剖学会, 編). 705–864. 日本獣医解剖学会.

[第3章 有鱗目の鋤鼻器官とその関連構造の関係性の進化史]

Abbasi, M., A. Gharzi, and P. Usefi. 2011. Histomorphometry of vomeronasal organ in the *Eirenis collaris*. *Research Journal of Biological Science* 6:432–435.

Baeckens, S., R. Van Damme, and W. E. J. Cooper. 2017a. How phylogeny and foraging ecology drive the level of chemosensory exploration in lizards and snakes. *Journal of Evolutionary Biology* 30:627–640.

- Baeckens, S., A. Herrel, C. Broeckhoven, M. Vasilopoulou-Kampitsi, K. Huyghe, J. Goyens, and R. Van Damme. 2017b. Evolutionary morphology of the lizard chemosensory system. *Scientific reports* 7:10141.
- Bellairs, A. d'A. 1949. Observations on the snout of *Varanus*, and a comparison with that of other lizards and snakes. *Journal of anatomy* 83:116–146.
- Bellairs, A. d'A. 1950. Observations on the cranial anatomy of *Anniella*, and a comparison with that of other burrowing lizards. *Proceedings of the Zoological Society of London* 119:887–904.
- Bellairs, A. d'A, and J. D. Boyd. 1947. The lachrymal apparatus in lizards and snakes.-I. The brille, the orbital glands, lachrymal canaliculi and origin of the lachrymal duct. *Proceedings of the Zoological Society of London* 117:81–108.
- Bellairs, A. d'A, and J. D. Boyd. 1950. The lachrymal apparatus in lizards and snakes.-II. The anterior part of the lachrymal duct and its relationship with the palate and with the nasal and vomeronasal organs. *Proceedings of the Zoological Society of London* 120:269–310.
- Bellairs, A. d'A, and A. E.-D. M. Kamal. 1981. The chondrocranium and the development of the skull in recent reptiles. In: *Biology of the Reptilia*. Volume 11. Morphology F. C. Gans and T. S. Parsons (eds.). London: Academic Press, pp. 1–263.
- Bernstein, P. 1999. Morphology of the nasal capsule of *Heloderma suspectum* with comments on the systematic position of helodermatids (Squamata: Helodermatidae). *Acta Zoologica* 80:219–230.

- Born, G. 1879. Die Nasenhöhlen und der Thränennasengang der amnioten Wirbelthiere. I. Morphologisches Jahrbuch 5:62–137.
- Born, G. 1883. Die Nasenhöhlen und der Thränennasengang der amnioten Wirbelthiere. III. Morphologisches Jahrbuch 8:188–232.
- Brock, G. T. 1941. The skull of the chameleon, *Lophosaura ventralis* (Gray); some developmental stages. Proceedings of the Zoological Society of London 110(B):219–241.
- Cooper, W. E. 1999. Supplementation of phylogenetically correct data by two-species comparison: Support for correlated evolution of foraging mode and prey chemical discrimination in lizards extended by first intrageneric evidence. Oikos 87:97.
- Cooper, W. E., M. A. Paulissen, and J. J. Habegger. 2000. Discrimination of prey, but not plant, chemicals by actively foraging, insectivorous lizards, the lacertid *Takydromus sexlineatus* and the teiid *Cnemidophorus gularis*. Journal of Chemical Ecology 26:1623–1634.
- Cooper, W. E., V. Pérez-Mellado, L. J. Vitt, and B. Budzynski. 2003. Cologne as a pungency control in tests of chemical discrimination: effects of concentration, brand, and simultaneous and sequential presentation. Journal of Ethology 21:101–106.
- El-din, E. Y. S., and A. I. Dakrory. 2015. Embryonic developmental study on vomeronasal organ of Montpellier snake (*Malpolon monspessulana*). Cellular and Molecular Life Sciences 10:70–77.
- Engelbrecht, D. van Z. 1951. Contributions to the cranial morphology of the chamaeleon *Microsaura pumila* Daudin. Annales of the University of Stellenbosch 27:4–31.

- Filoramo, N. I., and K. Schwenk. 2009. The mechanism of chemical delivery to the vomeronasal organs in squamate reptiles: a comparative morphological approach. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 311A:20–34.
- Fischer, E. 1900. Beiträge zur Kenntniss der Nasenhöhle und des Thränenasenganges der Amphisbaeniden. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 55:441–478.
- Fuchs, H. 1908. Über Das Munddach Der Rhynchocephalen, Saurier, Schlangen, Krokodile Und Säuger Und Den Zusammenhang Zwischen Mund- Und Nasenhöhle Bei Diesen Tieren. *Zeitschrift Für Morphologie Und Anthropologie* 11:153–248.
- Gabe, M., and H. Saint Girons. 1976. Contribution a la morphologie comparee des fosses nasales et de leurs annexes chez les lepidosoriens. *Momories du museum national d’histoire naturelle, Serie A* 98:1–87.
- Gharzi, A., M. Abbasi, and P. Yusefi. 2013. Histological studies on the vomeronasal organ of the worm-like snake, *Typhlops vermicularis*. *Journal of Biological Sciences* 13:372–378.
- Graves, B. M., and M. Halpern. 1989. Chemical access to the vomeronasal organs of the lizard *Chalcides ocellatus*. *Journal of Experimental Zoology* 249:150–157.
- Groombridge, B. 1979. On the vomer in Acrochordidae (Reptilia: Serpentes), and its cladistic significance. *Journal of Zoology* 189:559–567.
- Hallermann, J. 1998. The ethmoidal region of *Dibamus taylori* (Squamata: Dibamidae), with a phylogenetic hypothesis on dibamid relationships within Squamata. *Zoological Journal of the Linnean Society* 122:385–426.

- Hoppe, G. 1934. Das Geruchsorgan von *Hatteria punctata*. Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte 102:434–461.
- Iwasaki, S., and K. Miyata. 1985. Scanning electron microscopy of the lingual dorsal surface of the Japanese Lizard, *Takydromus tachydromoides*. Okajimas Folia Anatomica Japonica 62:15–25.
- Kaczmarek, P., M. Hermyt, and W. Rupik. 2017. Embryology of the VNO and associated structures in the grass snake *Natrix natrix* (Squamata: Natricinae): a 3D perspective. Frontiers in Zoology 14:1.
- Kaczmarek, P., K. Janiszewska, B. Metscher, and W. Rupik. 2020. Development of the squamate naso-palatal complex: detailed 3D analysis of the vomeronasal organ and nasal cavity in the brown anole *Anolis sagrei* (Squamata: Iguania). Frontiers in Zoology 17:28.
- Lakjer, T. 1927. Studien über die Gaumenregion bei Sauriern im Vergleich mit Anamniern und primitiven Sauropsiden. Zoologische Jahrbücher: Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere 49:57–356.
- Lee, M. S. 2000. Soft anatomy, diffuse homoplasy, and the relationships of lizards and snakes. Zoologica Scripta 29:101–130.
- Lemire, M. 1985. Contribution a l'étude des fosses nasales des Sauriens: Anatomie fonctionnelle de la glande "a sels" des Lézards Déserticoles. Memoirs du Musée nationale d'Histoire naturelle. Serie A, Zoologie 135.
- Maddison, W. P., and D. R. Maddison. 2019. Mesquite: a modular system for evolutionary

analysis. Version 3.61. Available at <http://www.mesquiteproject.org>.

Malan, M. E. 1946. Contributions to the comparative anatomy of the nasal capsule and the organ of Jacobson of the Lacertilia. *Annales of the University of Stellenbosch* 24:69–137.

Parsons, T. S. 1959. Studies on the comparative embryology of the reptilian nose. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 120:101–277.

Parsons, T. S. 1970. The nose and Jacobson's organ. In: *Biology of the Reptilia*. Volume 2. Morphology B. C. Gans and T. S. Parsons (eds.). London: Academic Press, pp. 99–191.

Pratt, C. W. M. M. 1948. The morphology of the ethmoidal region of sphenodon and lizards. *Proceedings of the Zoological Society of London* 118:171–201.

Rehorek, S. J. 1997. Squamate Harderian gland: An overview. *The Anatomical Record* 248:301–306.

Rehorek, S. J., B. T. Firth, and M. N. Hutchinson. 2000a. Can an orbital gland function in the vomeronasal sense? A study of the pygopodid Harderian gland. *Canadian Journal of Zoology* 78:648–654.

Rehorek, S. J., B. T. Firth, and M. N. Hutchinson. 2000b. The structure of the nasal chemosensory system in squamate reptiles. 1. The olfactory organ, with special reference to olfaction in geckos. *Journal of biosciences* 25:173–179.

Rehorek, S. J., W. J. Hillenius, W. Quan, and M. Halpern. 2000c. Passage of Harderian gland secretions to the vomeronasal organ of *Thamnophis sirtalis* (Serpentes: Colubridae).

- Canadian Journal of Zoology 78:1284–1288.
- Rieppel, O., J. Gauthier, and J. Maisano. 2008. Comparative morphology of the dermal palate in squamate reptiles, with comments on phylogenetic implications. *Zoological Journal of the Linnean Society* 152:131–152.
- Saito, S., T. Oikawa, K. Taniguchi, and K. Taniguchi. 2010. Fine structure of the vomeronasal organ in the grass lizard, *Takydromus tachydromoides*. *Tissue and Cell* 42:322–327.
- Schwenk, K. 1995. Of tongues and noses: chemoreception in lizards and snakes. *Trends in Ecology & Evolution* 10:7–12.
- Shrivastava, R. K. 1963. The structure and the development of the chondrocranium of *Varanus*. I. Development of the ethmoidal region. *Okajimas Folia Anatomica Japonica* 39:55–83.
- Slabý, O. 1979c. Morphogenesis of the nasal capsule, the nasal epithelial tube and the organ of Jacobson in Sauropsida. I. Introduction and morphogenesis of the nasal apparatus in members of the families Lacertidae and Scincidae. *Folia Morphologica* 27:245–258.
- Slabý, O. 1979b. Morphogenesis of the nasal apparatus in *Gecko verticillatus* Laur. (Family Geckonidae). Morphogenesis of the nasal capsule, the nasal epithelial tube and the organ of Jacobson in Sauropsida II.). *Folia Morphologica* 27:259–269.
- Slabý, O. 1979a. Morphogenesis of the nasal apparatus in a member of the family Varanidae. Morphogenesis of the nasal capsule, the nasal epithelial tube and the organ of Jacobson in Sauropsida. III. *Folia Morphologica* 27:270–281.

- Slabý, O. 1981. Morphogenesis of the nasal apparatus in sauropsida. IV. Morphogenesis of the nasal capsule, epithelial nasal tube and organ of Jacobson in a member of the family Agamidae. *Folia Morphologica* 29:305–317.
- Slabý, O. 1982a. Morphogenesis of the nasal capsule, the epithelial nasal tube and the organ of Jacobson in Sauropsida. V. Contribution to knowledge of the early morphogenesis of the nasal apparatus in Teiidae. *Folia Morphologica* 30:20–25.
- Slabý, O. 1982b. Morphogenesis of the nasal capsule, the epithelial nasal tube and the organ of Jacobson in Sauropsida. VI. Morphogenesis of the nasal apparatus in *Iguana iguana* Shaw and morphological interpretation of the individual structures. *Folia Morphologica* 30:75–85.
- Slabý, O. 1982c. Morphogenesis of the nasal capsule, the epithelial nasal tube and the organ of Jacobson in Sauropsida. VII. Morphogenesis and phylogenetic morphology of the nasal apparatus in *Calotes jubatus* O. B. *Folia Morphologica* 30:238–248.
- Souza, N. M., D. J. Maggs, S. A. Park, S. M. Puchalski, C. M. Reilly, J. Paul-Murphy, and C. J. Murphy. 2015. Gross, histologic, and micro-computed tomographic anatomy of the lacrimal system of snakes. *Veterinary Ophthalmology* 18:15–22.
- Toubeau, G., C. Cotman, and V. Bels. 1994. Morphological and kinematic study of the tongue and buccal cavity in the lizard *Anguis fragilis* (Reptilia: Anguidae). *The Anatomical Record* 240:423–433.
- Verwajen, D., and R. Van Damme. 2007. Relationships between chemosensory behaviour and

foraging mode within lacertid lizards. *Behaviour* 144:83–99.

Young, E. A. E. 1942. The cranial morphology of the Californian lizard, *Xantusia vigilis*. *South African Journal of Medical Sciences, Biological Supplement* 7:19–32.

Zheng, Y., and J. J. Wiens. 2016. Combining phylogenomic and supermatrix approaches, and a time-calibrated phylogeny for squamate reptiles (lizards and snakes) based on 52 genes and 4162 species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 94:537–547.

昆 泰寛. 2000. 獣医解剖学用語 改定・3版. 獣医解剖学・組織学・発生学・家禽用語集 (日本獣医解剖学会, 編). pp. 1–536. 日本獣医解剖学会.

#### [第4章 総論]

Kaczmarek, P., M. Hermyt, and W. Rupik. 2017. Embryology of the VNO and associated structures in the grass snake *Natrix natrix* (Squamata: Natricinae): a 3D perspective. *Frontiers in Zoology* 14:1.

Kaczmarek, P., K. Janiszewska, B. Metscher, and W. Rupik. 2020. Development of the squamate naso-palatal complex: detailed 3D analysis of the vomeronasal organ and nasal cavity in the brown anole *Anolis sagrei* (Squamata: Iguania). *Frontiers in Zoology* 17:28.

Millennium Ecosystem Assessment, *Ecosystems and Human Well-being*. 2005. Synthesis, Island Press, Washington DC.

Sanger, T. J., J. B. Losos, and J. J. Gibson-Brown. 2008. A developmental staging series for the

lizard genus *Anolis*: A new system for the integration of evolution, development, and ecology. *Journal of Morphology* 269:129–137.

林良博, 山口裕文. 2012. バイオセラピー学入門 人と生き物の新しい関係をつくる福祉農学. 講談社, 東京.

## 摘要

### 第1章 序論

生物多様性とその創出機構の理解は、生物学の主要な命題の一つである。脊椎動物の形態的多様性は、主要な器官形成に関わる共通の発生過程と、各系統の派生的な器官形成に関わる特徴的な発生過程の両者を通じて獲得されてきた。そのため、形態的多様化の進化史を理解するためには、進化発生的視点に基づき発生過程を比較解析することで、その共通性と特殊性の両面を明らかにする必要がある。次世代シーケンス解析や遺伝子改変技術に代表される近年の科学技術の発展は、様々な脊椎動物のモデル動物種を対象とした進化発生的研究に応用され、これら研究により脊椎動物の形態進化に関わる発生的メカニズムが明らかにされてきた。一方で、地球上の様々な環境に適応し四肢動物の中で最も多くの種を含むことが知られる爬虫綱有鱗目を研究材料に用いた進化発生的研究は少ない。四肢動物の進化史の初期に分化した有鱗目の生物学的特徴を理解し、その著しい多様性が獲得された仕組みを解明することは、我々ヒトを含む羊膜類、四肢動物が如何にして陸上環境に適応放散したかを理解するために重要である。

動物の感覚器官は彼らの生生活動、生殖活動に不可欠であり、それゆえ種の多様性獲得にも重要な役割を担う。感覚器官のうち嗅覚器は、遠隔化学刺激を受容することにより環境認知を司る。四肢動物は複数の嗅覚器を持つことが知られるが、中でも鋤鼻器官は同種他個体の放出する化学物質であるフェロモンを受容し、繁殖行動などを含む個体間相互作用に関与することで種の分化および維持に重要な役割を担ってきたと考えられている。一方、他の四肢動物とは異なり、有鱗目は個体間相互作用のみならず採食や外敵の回避など生態の様々な側面において鋤鼻器官に依る化学受容を

行うことが知られる。このことから、有鱗目の多様化の進化史において鋤鼻器官の進化が重要な役割を担ってきたと考えられている。

## 第2章 有鱗目トカゲ類2種を用いた発生学的基盤研究

発生学研究は、複数の種間あるいは動物群間で発生過程の比較解析を行うために、胚発生 of 進行度を標準化する発生段階定義を確立してきた。有鱗目のうちトカゲ類を対象とした発生学研究では、Dufaure and Hubert (1961) の発生段階定義 (DH ステージ) が広く用いられてきた。しかしトカゲ類では、発生段階定義に用いられる形態的特徴の一部の発生順序が科間、上科間などの系統間で異なる場合があり、それら発生順序の差異は系統関係を反映しない。それゆえに、有鱗目の発生過程の比較解析が活発に行われるためには、少なくとも各科を網羅した共通の発生段階が定義され、分類群間に存在する発生順序の差異が理解される必要がある。しかし、現在の分類体系で認識されるトカゲ類 40 科以上のうち連続した発生段階が詳細に観察されているのは 14 科に留まっている。このような発生過程に関する知見の不十分さは、有鱗目を用いた進化発生学的研究を活性化するために解決すべき課題の一つである。

本研究では、今後の有鱗目を用いた進化発生学的研究への貢献を目的として、トカゲ類のうち発生過程に関する情報が不十分であったカナヘビ科のニホンカナヘビ *Takydromus tachydromoides* およびトカゲ科のヒガシニホントカゲ *Plestiodon finitimus* の産卵から孵化までの一連の産卵後発生段階 (DH ステージ) を定義した。ニホンカナヘビの一連の産卵後発生過程の観察はカナヘビ科の産卵種としては 3 例目であり、一連の産卵後 DH ステージの観察は同科の卵生種として 1 例目である。また、ヒガシニホントカゲの一連の産卵後 DH ステージの観察はトカゲ科の種としては 2 例目である。さらに本研究では、両種の産卵後胚発生の特徴を明らかにし、今後の発生学的研究におけるこれらトカゲ類 2 種の活用の可能性について議論した。加えて、ヒガシニホン

トカゲの母個体が産卵後に卵を保護し世話をする生態に注目し、卵を母個体の保護下で発生させた群と、卵を母個体から回収しインキュベータ内で発生させた群の間で、胚の正常発生率および発生段階の進行度を比較した。

多くの産卵性トカゲ類の胚が DH ステージ 30 前後で産卵され、60 日間前後の孵卵期間を経て DH ステージ 42 前後で孵化する一方、ニホンカナヘビ胚は初期咽頭胚期にあたる DH ステージ 26-28 で産卵され、約 28 日間の孵卵期間を経て DH ステージ 42 で孵化に至った。ヒガシニホントカゲ胚は後期咽頭胚期にあたる DH ステージ 32 で産卵され、約 24 日間の孵卵期間を経て DH ステージ 42 で孵化に至った。これらのことから、本研究で観察したトカゲ類 2 種は共通して孵卵日数が短く、発生の進行が他のトカゲ類と比較して短期間に進むことが明らかになった。両種の外部形態的特徴の発生順序の大部分は DH ステージの定義に用いられたコモチカナヘビ *Zootoca vivipara* と類似していたが、近縁な科間でも差異がある場合が知られる色素形成開始のタイミングはそれぞれ異なっていた。ヒガシニホントカゲの母個体による卵の世話が胚発生に与える影響を調べた結果、胚の正常発生率および発生段階の進行度に孵卵条件間で有意な差は認められなかった。しかし、母個体から回収しインキュベータ内で発生した胚の正常発生率が 86.7% であったのに対し、母個体の世話の下で発生した胚の正常発生率は 100% であった。このことは、同種の母個体が卵の世話をする際にとる行動が胚の正常発生率を向上させる可能性を示している。この可能性を検証するため、今後は母個体の詳細な行動観察を行いつつ、さらに多くの胚試料数を用いて比較解析を行う必要がある。

本研究で観察したトカゲ類 2 種は、日本国内で容易に採集、飼育繁殖して胚試料を入手することが可能である。また、単一のクラッチから複数の胚試料を得ることができ、それらの胚発生が一定の速度で進行する。さらに、産卵後の胚発生の進行が速

く、目的の発生段階の胚試料を短期間に入手することができる。加えて、ニホンカナヘビの産卵のタイミングは他のカナヘビ科の種と同様にトカゲ類中では比較的早く、肢芽形成の開始以前である。そのため、同種の産卵後胚発生においては一連の四肢形成過程を観察することができる。また、ヒガシニホントカゲでは母個体が卵の世話をする際の何らかの行動により非常に高い正常発生率で胚試料を入手できる可能性がある。以上の特徴から、これらトカゲ類 2 種は発生学的研究で活用されるために十分な利点を備えていると考えられた。

### 第 3 章 有鱗目の鋤鼻器官とその関連構造の関係性の進化史

有鱗目の鋤鼻器官は、他の四肢動物の同器官と同様に嗅上皮の一部から発生する。しかし、鼻腔と完全に隔絶して口蓋に開口する点や、器官内部に分泌腺構造を持たず、その内腔が眼窩のハーダー腺で分泌される内腔液で満たされる点など、他の四肢動物と異なる形態的特徴を持つ。有鱗目の鋤鼻器官には、1) 外界の化学物質を付着させ器官の開口部に運ぶ舌、2) ハルダー腺から鋤鼻器官へ伸長し内腔液の経路となる鼻涙管、3) 内鼻孔から鋤鼻器官へ伸長し、鼻涙管が開口する内鼻溝などの機能的関連構造が知られる。これら鋤鼻器官関連構造は目内で形態的に多様化していることが知られ、中でも舌の形態的特徴やその機能的意義、進化史は盛んに議論されてきた。一方、鼻涙管および内鼻溝の形態的多様性は統合的に整理されておらず、その進化史や機能的意義に関して議論した研究は非常に少ない。また、鋤鼻器官およびその関連構造の発生過程を詳細に観察した研究は少なく、上述の形態分化の仕組みには未解明な点が多く残されている。

本研究では、まず有鱗目ニホンカナヘビの鋤鼻器官およびその関連構造の連続組織切片を作製して三次元構造を再構築し、形態的特徴を明らかにした。カナヘビ科の種の鋤鼻器官関連構造の形態的特徴には、鼻涙管と内鼻溝が融合した LCG が鋤鼻器官

まで伸長するという複数の報告と、同構造が鋤鼻器官に接触せず終端するという Lemire (1985) の報告が混在しているが、ニホンカナヘビの形態的特徴は Lemire (1985) の報告と類似していた。この鼻涙管あるいはその派生構造が鋤鼻器官に接触しない形態は、有鱗目内ではカナヘビ科および一部のカメレオン科の種のみで知られる特徴的なものである。

次に、同様の手法により同種の胚発生における鋤鼻器官および関連構造の形態形成過程を観察した。その結果、本種の鋤鼻器官および関連構造の発生過程は DH ステージ 36 以前では他のカナヘビ科の種などに類似していることが明らかになった。また、上述の本種に特徴的な形態、すなわち鼻涙管の派生構造の鋤鼻器官からの分離が、一部の有鱗目で観察される口蓋形成による内鼻溝の鋤鼻器官からの分離とよく類似した挙動により、DH ステージ 37 で形成されることが明らかになった。

さらに、先行研究で示された有鱗目の鋤鼻器官関連構造の形態的特徴に関する知見を整理統合し、鋤鼻器官と鼻涙管、鋤鼻器官と内鼻溝、鼻涙管と内鼻溝の三種類の構造的関係性をそれぞれ 4 種類の形質状態に分類した。続いて、現在広く支持されている有鱗目の系統関係に基づき、それら形質状態の祖先形質状態を推定した。その結果、鋤鼻器官、鼻涙管、内鼻溝が互いに連続する形質状態が有鱗目にとって祖先的であると推定された。また、有鱗目の進化史において、鼻涙管派生構造の鋤鼻器官からの分離、内鼻溝の喪失、内鼻溝の鋤鼻器官からの分離、鼻涙管と内鼻溝の融合といった複数の非相同同形形質 (ホモプラシー) が平行的に進化したと推定された。

#### 第 4 章 総論

本研究は有鱗目の著しい多様性に注目し、以下の二つの研究内容によりその創出機構の理解に貢献することを目的とした。まず、有鱗目トカゲ類の胚発生に関する基礎的知見を充実させるために、胚試料の外部形態の観察に基づきトカゲ類 2 科 2 種の

産卵後発生段階を新たに定義し、それら種の発生過程の特徴および発生学研究への活用の利点を示した。また、有鱗目の多様化に重要な役割を担った可能性がある鋤鼻器官関連構造の形態的多様性について、以下の新たな知見を示した。まず、カナヘビ科ニホンカナヘビのそれら構造の形態を組織学的に観察し、同種が有鱗目内で特徴的な形態を持つことを明らかにした。加えて、鋤鼻器官関連構造の形態的多様化の進化史を推定し、複数の非相同同形形質の平行進化の可能性を示した。

本研究の内容に関連し、今後の有鱗目の形態学および発生学的研究に活用される研究基盤を整備するために解決すべき課題として、多くの種の軟組織や体内器官の形態や、胚発生における体内の器官形成過程の大部分が十分に理解されていないことが挙げられる。今後これら課題を解決するためには、体内器官の立体構造を網羅的に観察するために強力な手段となる非破壊的三次元イメージングと、各器官の組織形態の詳細な観察に利点のある連続組織切片作製の両手法を併用することが求められる。これら手法により得られるデータを統合した進化発生学的解析は、有鱗目の形態的多様性の理解に大きく貢献するだろう。

## Summary

Developmental Study of Lizards for the Understanding of the Diversification of Squamata

Kentaro Okuyama

Department of Human and Animal-Plant Relationships, Graduate School of Agriculture, Tokyo

University of Agriculture

### 1. Introduction

Squamata is a taxonomic group in reptiles that emerged in the early evolutionary history of amniotes and represents extreme diversity with more than 10,000 species. They are known to have adapted to various environments with their ecological, physiological, and morphological diversification. However, little is known about the mechanism of morphogenesis that has established their extreme diversity because not many evolutionary developmental studies have been conducted for them. The evolutionary developmental study aims to understand biodiversity by elucidating both the common and characteristic developmental mechanism of organisms based on comparative analysis. For the comparative developmental analysis, the basic embryological information with regard to the ontogeny is necessary.

To understand biodiversity, the evolutionary history of sensory organs should be elucidated because those are essential for external recognition in any activities of organisms.

The vomeronasal organ, which is one of the olfactory organs of tetrapods, is known to have important roles in interspecific interaction including reproduction by perceiving pheromones. In squamates, the vomeronasal organ is functionally well developed and they depend on that to recognize their environment, forage of prey, and avoid predators. Thus, the evolution of the vomeronasal organ is considered to have contributed to the diversity of squamates.

## **2. Post-Ovipositional Developmental Stages of Two Lizard Species**

The developmental studies have been established the staging criteria for the comparative analysis of developmental processes of animals. Among developmental studies concerning lizards, the developmental stages established in Dufaure and Hubert (1961), which are called DH stages in this study, have been widely used to describe the developmental process. In squamates, developmental sequences of several key morphological characters for the determination of DH stages are not necessarily uniform among taxa. Besides, the differences in those sequences do not reflect the phylogenetic relationships. Thus, for the comparative developmental analysis of squamates, differences in developmental sequences among taxa are necessary to be understood by the observation of the developmental process for each family. However, the description of the series of developmental processes is not sufficient in lizards and the evolutionary developmental studies are prevented by this insufficiency.

In this study, I defined series of post-ovipositional developmental stages (DH stages) for Japanese grass lizard (*Takydromus tachydromoides*, Lacertoidea, Lacertidae) and Far eastern skink (*Plestiodon finitimus*, Scincoidea, Scincidae), aiming to contribute further evolutionary developmental studies for squamates. To our knowledge, Japanese grass lizard is the third oviparous lacertid of which the post-ovipositional developmental process was extensively described, and the first oviparous one of which complete series of post-ovipositional DH

stages were described. Besides, Far eastern skink is the second scincid of which complete series of post-ovipositional DH stages were described. This study also clarified the characteristics of post-ovipositional developmental processes in both species and discussed the possibility of utilizing them for further developmental studies.

In Japanese grass lizard, embryos were laid at DH stages 26–28, which is a relatively early period in pharyngula stages, and hatched at DH stage 42 after the incubation duration of approximately 28 days. In Far eastern skink, embryos were laid at DH stage 32, which is the late pharyngula stages, and hatched at DH stage 42 after the incubation duration of approximately 24 days. Generally in many lizards, embryos are laid around DH stage 30 and hatch at DH stage 42 after the incubation duration of approximately 60 days. These indicate that the incubation durations of the two species observed in this study is considerably short compared to many other lizards.

Most of the developmental sequences of key morphological characters in the observed species were similar to *Zootoca vivipara*, which was used for the definition of DH stage. However, timings of the first body pigmentation, which are known to differ between closely related taxa, were commonly differed from *Z. vivipara* in the observed species.

Further, the influence of the care of eggs in Far eastern skink on the development of embryos was investigated. The viabilities of and the progress of DH stages were compared between embryo specimen that acquired from eggs developed under the following two different incubation conditions: in one condition, eggs were developed under the care of their mother; in another condition, eggs were developed in the incubator without their mother. Although no significant differences were found in the viability and the progress of the developmental process between the two incubation conditions, the viability of embryos

acquired from eggs developed under the care of their mother (100 %) was considerably higher than that of embryos developed in another condition (86.7 %). These results suggest the possibility that behaviors of mothers during the care of eggs improve the viability of embryos. Behavioral analysis of the care of eggs of the mother and the further comparative analysis using a larger sample size of embryo specimen should be implemented to verify this possibility.

The post-ovipositional developmental process of two lizard species observed in this study possess the following several favorable characters for the developmental studies. They are abundant in Japan and are easily bred in captivity. Multiple embryo specimens that develop at a constant speed are available from a single clutch. The developmental process proceeds faster compared to other lizards. Besides, the timing of the oviposition in Japanese grass lizard is relatively early among lizards, and the whole process of limb morphogenesis can be observed. Moreover, in Far eastern skink, relatively many embryo specimens with notably high viability are possibly available from a single clutch, by the care of eggs of the mother.

### **3. Evolutionary History of Structural Relationships between the Vomeronasal Organ and its Associated Structures of Squamata**

The vomeronasal organ of squamates has several characteristic morphological features among tetrapods, whereas it originates from a part of the epithelium of the nasal cavity, similarly to that of other tetrapods. For example, the vomeronasal organ of squamates opens only into the oral cavity and is separated from the nasal cavity. Besides, it has no own glandular structure within and the lumen is filled with the luminal fluid, which is secreted in the orbital Harderian gland and passed through the nasolacrimal duct into the vomeronasal

duct. The vomeronasal organ of squamates functionally associated with the following several structures: the tongue that holds the external chemicals and delivers them into the organ; the nasolacrimal duct that extends from the Harderian gland to the organ for being the pathway of the luminal fluid; the choanal groove that extends from the choana to the organ and in which the nasolacrimal duct opens. These associated organs of the vomeronasal organ of squamates are known to be morphologically diversified. The functional implication and evolutionary history of the tongue have been discussed in many studies, in contrast, those of the nasolacrimal duct and the choanal groove has not been studied well. Besides, the developmental processes of those structures have not been observed sufficiently to understand the morphological diversification of them.

In this study, the morphological characteristics of the vomeronasal organ and its associated structures in Japanese grass lizard were observed based on the histological technique. The separation of the derivative structure of the nasolacrimal duct from the vomeronasal organ was observed in this species. This is a characteristic morphology that differs from many other squamates. Then, the morphogenesis of those structures in this species was observed. The developmental process was similar to other lacertids before DH stage 36. The characteristic morphology of this species emerged at DH stage 37 by the process of palatogenesis, similar to the process of separation of the choanal groove from the vomeronasal organ in several other squamates.

Further, I integrated the known morphological characteristics of the vomeronasal organ and its associated structures among squamates, focusing on structural relationships between the structures. Then, the ancestral state reconstruction was implemented to elucidate the evolutionary history of those structural relationships under both the parsimony and likelihood

methods. Results suggested that the following homoplasies have emerged by the parallelism during the evolutionary history of squamates: separation of the derivative structure of nasolacrimal duct from the vomeronasal organ; separation of the choanal groove from the vomeronasal organ; loss of the choanal groove; a fusion between the nasolacrimal duct and choanal groove.

#### **4. Conclusion**

This study aimed to contribute to the understanding of the diversification of squamates by the following two approaches. First, the definitions of post-ovipositional developmental stages were provided for two lizard species based on the external morphological characters. Also, the advantages of the utilization of them for further developmental studies were noted. Second, the following new observations were provided for the morphological diversity of relationships among the vomeronasal organ and its associated structures of squamates. This organ is considered to have important roles in their ecology. Japanese grass lizard has a characteristic morphology among squamates and that is possibly shared with several other lacertids. Besides, the evolutionary history of that structural relationships was inferred and the possibility of parallelisms was shown for several homoplasies.

In the morphological and developmental studies of squamates, it is problematic that the morphological characteristics of soft tissues and internal organs in many species and the morphogenesis of most internal organs are not sufficiently understood. These should be solved to enhance the basis for further studies. To solve these problems, it is desired to implement the observation based on the combination of the following two techniques: non-destructive three-dimensional imaging that is a powerful technique for the comprehensive observation of internal organs, and preparation of serial paraffin sections that have the

advantage in the detailed observation of tissue morphology. The comparative morphological and evolutionary developmental studies based on the integrated data acquired from the above two techniques are expected to significantly contribute to the understanding of the morphological diversity of squamates.