

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月10日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07851

研究課題名(和文)天然河川におけるニホンウナギの生理生態学的解析に基づいた資源動態モデルの構築

研究課題名(英文) Population dynamics mechanism on the Japanese eel in natural river based on physiological and ecological analyses

研究代表者

吉永 龍起 (Yoshinaga, Tatsuki)

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号：30406912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ニホンウナギが河川に加入する時期と量，および質を評価する手法の確立を目的とした．接岸は概ね12月から4月にかけてで，初夏の来遊は2年に1度の頻度で見られた．2017年級群は3月のごく短期間に集中して接岸する特異なパターンを示した．様々な生活史段階で塩類細胞の相対面積を比較したところ，環境塩分を反映して変化することがわかった．接岸時期を通して塩類細胞の体積は一定であったものの，同時に接岸した群は様々な大きさの細胞を持つ個体からなり，こうした個体差が広い塩分環境を利用する回遊多型をもたらしているものと考えられた．グリコーゲン含量は接岸時期が遅くなるほど少なくなり，質の評価指標として有用と考えられた．

研究成果の学術的意義や社会的意義

水産重要種であるニホンウナギの資源は激減しており，早急な保全策の立案が求められている．しかしシラスウナギの漁獲量は信頼度に劣り，資源の動態を把握する上での障害となっている．本研究は科学的な手法で接岸モニタリングを実施し，天然加入が期待される初夏の来遊が2年に一度ほどの頻度で起こることを明らかにした．また，海水から淡水に成長の場を移す際に重要な塩類細胞の大きさには個体差があり，これによりニホンウナギは幅広い塩分環境を利用する可能性を見出した．さらに，生存に重要なグリコーゲン量は接岸時期の終盤にかけて低下することを明らかにし，天然加入と養殖用に使い分けるための質の指標としての有用性を見出した．

研究成果の概要(英文)：To contribute to recovery of the stock of the Japanese eel, monitoring of the recruitment pattern and development of the method to quantitatively measure the quality of the glass eels were carried out. Recruitment was observed in late December to early April, and summer recruitment was confirmed to occur in almost every year. Relative area of the chloride cells were at constant throughout the recruitment period, but were largely varied in the simultaneously recruited populations, suggesting that such individual variability cause flexible migration pattern in this species. Glycogen contents decreased at the late of the recruitment period, and is considered to be useful index to quantify the glass eels recruited.

研究分野：個体群生態学

キーワード：ニホンウナギ 接岸生態 塩分適応 グリコーゲン

## 1. 研究開始当初の背景

食糧危機は人類が今世紀中に直面する深刻な問題である。この問題の解決には、穀物や家畜、養殖魚などの安定した生産と並んで、天然資源を持続的に利用することが必須である。水産資源については数十種以上の魚介類について生産技術が確立している。一方、未だ人工的に生産することができず、天然資源に依存しているものもある。その代表がウナギ属魚類である。

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) の産卵場はグアム島の周辺海域にある。孵化した幼生 (レプトセファルス) は約半年間の海洋生活期を経てシラスウナギに変態し、東アジア一帯の河口に接岸する。その後、河川や汽水域で 5-10 年ほどかけてクロコ期と黄ウナギ期を経て成長し、再び降河回遊して外洋で繁殖した後に一生を終える。近年、天然卵の採集や産卵地点の決定機構など、ニホンウナギの産卵生態の解明は飛躍的に進んだ (Tsukamoto et al 2011; Aoyama et al 2014)。また、河川でも黄ウナギ期の生態について多くの研究が行われている (Yokouchi 2014; Itakura 2015)。一方、シラスウナギの漁獲量は 1970 年代から激減し、天然種苗に専ら依存している養鰻業では深刻な問題となっている。さらに、ニホンウナギは 2014 年に絶滅危惧 IB 類に指定され、早急な保全策の立案が求められている。ニホンウナギの資源を回復するためには、海洋から河川に加入する時期と量、および河川での生残の実態を把握することが重要である。しかし、いつどのくらいの数のシラスウナギが接岸し、どのように河川に定着するのかがほとんど明らかとなっておらず、資源保護の大きな障壁となっている。

## 2. 研究の目的

上述の背景の下、我々はニホンウナギの接岸および河川での生態を解明することを目的として調査を行ってきた。まず、シラスウナギの加入量について科学的なデータを蓄積するために、2009 年 11 月より神奈川県相模川の河口で継続的な採捕調査を行っている。その結果、ニホンウナギは冬から春先にかけて来遊すると考えられてきたが、初夏にも接岸することが明らかとなった (Aoyama et al 2012)。一方、年によっては初夏の接岸は確認されないこともあり、より長期かつ広範囲での調査が必要であることが分かった。漁期の後で接岸するシラスウナギは天然への加入が期待されるため、その実態を把握することはニホンウナギの保全において極めて重要である。そこで本研究では、ニホンウナギの接岸時期と量について科学的に信頼できるデータを蓄積することを第 1 の目的とした。

河川に加入したシラスウナギは、体表の黒色素胞が発達してクロコ期になる。この生活史段階では、海水から淡水に生息域を転換するため、塩分適応などの生理的機構および捕食者逃避など多岐にわたる変化が生じていると予想される。この時期における生理学的な特性を理解することで、天然下で生存が期待される個体群は漁獲せず、逆に生理的に劣るものを養殖に利用することで、保全と産業の両立を達成できることになる。そこで本研究では、異なる塩分環境下で体液調整を担う塩類細胞、および環境適応においてエネルギー源として利用されるグリコーゲン量を指標とすることで、接岸したシラスウナギの質を評価するための手法を確立することを第 2 の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 接岸量の調査

調査は 2016 年 4 月 - 2019 年 3 月に実施した (計 36 回; 本課題の終了後も継続中)。採集地点は相模川の河口で、神奈川県平塚市側の湘南大橋の下を定点とした。調査日は毎月の新月前の深夜として、各回に 2 時間の調査を行なって単位努力量あたりの採集量 (CPUE) を求めた。調査の開始時刻は干潮からの上げ潮時とした。LED 水中漁灯を海面直下に設置し、表層周辺に出現したシラスウナギを目視で探索して手網で採集した。同時に、物理環境をコンパクト CT 計により測定した。採集時刻を野帳に記録し、1 個体ずつ環境水とともに 50 mL 容チューブに入れて生かしたまま研究室に移送した。採集した個体は、麻酔下で全長、背鰭基部前長、肛門前長、体重を計測した。なお、シラスウナギの採集は神

奈川県内水面漁業調整規則に基づく特別採捕許可を得て実施した。

## (2) 免疫染色による塩類細胞の観察

塩類細胞の観察は、シラスウナギ期、クロコ期、黄ウナギ期、銀ウナギ期と河川生活期の全てを対象として実施した。シラスウナギ期の標本は上述の相模川河口で採集したものをを用いた。レプトセファルス期からシラスウナギ期への変態過程にある標本も解析した。クロコ期以降の生活史段階の標本は、神奈川県小田原市にある下菊川で採集した。

鰓を鰓弓ごと採取し、Triton X-100 含有 PBS (PBST) で洗浄した。続いて、ブロッキング処理を行った後、ウサギ抗 NKA モノクローナル抗体とともに、マウス抗ヒト NKCC モノクローナル抗体、もしくはマウス抗ヒト CFTR モノクローナル抗体液中で反応させた。抗体の反応後、Alexa fluor 555 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と Alexa fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を混合した 2 次抗体液中で反応させた。その後に鰓弁を分取し、DAPI 溶液に浸した。続いて鰓弁をスライドガラス上で封入し、共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡 C1 (Nikon) もしくは LSM510 (Zeiss) を用いて観察した。2 次元の画像解析には Image J 1.50i を用いた。さらに、LSM800 (Zeiss) を用いて、免疫染色された鰓弁上皮において z 軸に沿って 0.49  $\mu\text{m}$  ごとに写真を撮影し、画像解析ソフト Imaris (Zeiss) を用いて取得した 3 次元データから体積を求めた。

## (3) グリコーゲン量の測定

2018 年 1 - 5 月に相模川で採集したシラスウナギについて、ドットプロットによりグリコーゲン量を定量した。試料を過塩素酸溶液中でホモジナイズした後にジエチルエーテルを加え、遠心分離により得た沈殿を測定試料とした。試料を過塩素酸溶液で希釈し、PBS および MeOH 含有 PBS をそれぞれ加えた。この試料を吸引して PVDF 膜上にプロットして乾燥させ、MeOH, H<sub>2</sub>O, PBST にそれぞれ浸した。PVDF 膜を 2 枚に分け、一方のみをアミラーゼ処理用緩衝液中で前処理した後に  $\alpha$  アミラーゼ含有 PBS 中 (ARB) で反応させた。もう一方の膜は、アミラーゼを加えていない ARB 中で処理した。洗浄した後にブロッキングし、マウス抗グリコーゲン抗体を反応させた。さらに、抗マウス IgG + IgM アルカリフォスファターゼ標識 2 次抗体を反応させた。NT 緩衝液に浸した後、BCIP/NBT Alkaline Phosphatase Substrate Kit を用いて発色させた。乾燥させた PVDF 膜をスキャンし、Image J による画像解析でプロットの濃さを数値化した。

## 4. 研究成果

### (1) シラスウナギの接岸時期と量の年変動

2017 年 4 - 6 月に 7 - 32 個体のシラスウナギが採集され、7 月にはクロコ期の個体が確認された。11 月から翌年の 5 月にかけては 22 - 198 個体が採集され、これは同地点における過去 7 年間の接岸量と比べて著しく多かった。特に 2018 年 3 月には 198 個体と非常に大きな来遊群が認められた。2018 年 12 月の調査ではシラスウナギ期へと変態の過程にあるレプトセファルス期の個体が採集された。本課題の調査結果を含めた 10 年間にわたる採集記録を解析したところ、初夏の来遊群はおよそ 2 年に 1 度ほどの頻度で比較的小きな規模で見られた。通常の接岸時期は概ね 12 月から翌年の 4 月にかけてであり、年による大きな変化はなかった。一方、2017 年級群は 3 月のごく短期間にのみ集中して接岸する特異なパターンを示した。

シラスウナギの全長を接岸の早期と後期に分けて比較してみると、早期群の方が大きい傾向にあることが分かった。一方、採集された標本の多くはレプトセファルス期からの変態過程で負の体成長を示す生活史段階であったことから (Okamura et al 2012)、全長を質の評価指標として用いる際は注意が必要と考えられた。

## (2) 塩分環境と塩類細胞

早期変態期（レプトセファルス）、シラスウナギ期、淡水クロコ期、汽水クロコ期、および黄ウナギ期の標本について、塩分環境ならびに接岸時期による塩類細胞の違いを比較した。鰓の観察は、抗 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) 抗体、抗 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl-cotransporter (NKCC) 抗体、および抗 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) 抗体をそれぞれ用いた蛍光免疫染色により行った。

抗 NKA 抗体および抗 NKCC 抗体による染色では、シラスウナギ期と汽水・淡水クロコ期のいずれの標本でも陽性反応が観察された。一方、抗 CFTR 抗体についてはシラスウナギ期と汽水クロコ期の標本では明瞭な陽性反応が見られたものの、淡水クロコ期では極めて微弱であった。クロコ期では採集地点の塩分により反応が異なったことから、CFTR は環境水中のごく微量の塩分にも反応して発現することが示唆された。これは、淡水域に生活の場を移した後も高塩分環境への適応機構を維持しているためと考えられた。

各生活史段階で塩類細胞の相対面積を比較したところ、環境の塩分を反映して大きさが変化することがわかった。シラスウナギ期では接岸時期を通して塩類細胞の体積は一定であったものの、同時に接岸した群には様々な大きさの細胞を持つ個体が含まれていることがわかった。小型の塩類細胞を持つ個体はより早く淡水適応を開始したと考えられ、こうした個体差が淡水から海水まで広い塩分の環境を成長の場として利用するニホンウナギの回遊多型をもたらしているものと考えられた。

## (3) 接岸時期とグリコーゲン量

2018年1-5月にかけて相模川河口に接岸したシラスウナギ期の標本について、魚体中のグリコーゲン含量をドットプロット法で定量した。各月の接岸群のグリコーゲン含量は、2月を例外として接岸時期が遅くなるほど少なくなることがわかった。2017年級群は、他の年級群に比べて来遊が著しく遅れる特異的なものであった。したがって、海洋で生じた輸送を妨げる何らかの要因により接岸までに時間がかかり、多くのグリコーゲンが消費されていた可能性がある。

北米東海岸に分布するアメリカウナギでは、接岸までの移動距離や要する期間によって、シラスウナギ期の体内のエネルギーの保存・消費戦略が異なることが報告されている。本研究で解析に用いた標本は、通常よりもずっと接岸が遅れた2017年級群のものである。仮に、夏季に孵化した個体群が海流中の渦に取り込まれるなどして来遊に時間がかかったとすれば、グリコーゲンの消費量が例年より多かったと説明できる。今後、さらに多くの検体を解析していくことで、グリコーゲン量を指標とした質の評価法が確立できるものと期待される。

## 〔引用文献〕

- Aoyama et al (2014). *PLoS ONE* 9, e88759  
Aoyama et al (2012). *Fish. Sci.* 78, 1195-1204  
Itakura et al (2015). *Environ. Biol. Fish.* 98, 1871-1888  
Okamura et al (2012). *Can. J. Zool.* 90, 1378-1385  
Tsukamoto et al (2011). *Nature Commun.* 2, 179  
Yokouchi et al (2014). *Fish. Sci.* 80, 543-554

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計9件；いずれも査読あり）

1. Han Y-S, Hsiung K-M, Chow L-Y, Zhang H, Tzeng W-N, Shinoda A, Yoshinaga T, Hur S-P, Hwang S-D, Iizuka Y, Kimura S (2019). Dispersal characteristics and pathways of Japanese glass eel in the East Asian Continental Shelf. *Sustainability* 11, 2572
2. Tsutsui S, Yoshinaga T, Watanabe S, Aoyama J, Tsukamoto K, Nakamura O (2019). Mucosal galectin genes in all freshwater eels of the genus *Anguilla*. *J. Fish Biol.* 94, 660-670

3. 米田彬史, 板倉 光, 荒井考磨, 海部健三, 吉永龍起, 三宅陽一, 木村伸吾 (2019). 耳石安定同位体比分析と文献調査に基づく日本におけるニホンウナギの自然分布域. 日本水産学会誌 85, 150-161
4. Igarashi Y, Zhang H, Tan E, Sekino M, Yoshitake K, Kinoshita S, Mitsuyama S, Yoshinaga T, Chow S, Kurogi H, Shinoda A, Han Y-S, Wakiya R, Mochioka N, Yamamoto T, Kuwada H, Kaji Y, Suzuki Y, Gojobori T, Kobayashi T, Saitoh K, Watabe S, Asakawa S (2018). Whole-genome sequencing of 84 Japanese eels reveals evidence against panmixia and support for sympatric speciation. *Gene* 9, 474
5. Chow S, Kurogi H, Yamamoto T, Tomoda T, Mochioka N, Shirotori F, Yoshinaga T, Ambe D, Okazaki M, Nagai S, Yanagimoto T (2017). Reproductive isolation between *Anguilla japonica* and *A. marmorata*. *J. Fish Biol.* 91, 1517-1525
6. Arai K, Itakura H, Yoneta A, Yoshinaga T, Shirotori F, Kaifu K, Kimura S (2017). Discovering the dominance of the non-native European eel in the upper reaches of the Tone River system, Japan. *Fish. Sci.* 83, 735-742
7. Shirotori F, Ishikawa T, Tanaka C, Aoyama J, Shinoda A, Yambot AV, Yoshinaga T (2016). Species composition of anguillid glass eels recruited at southern Mindanao Island, the Philippines. *Fish. Sci.* 82, 915-922
8. Nakazato S, Minagawa T, Shirotori F, Shinoda A, Aoyama J, Yoshinaga T (2016). Ages of the giant mottled eel *Anguilla marmorata* recruited at the northern Luzon Island, the Philippines between 2009 and 2011. *Coast. Mar. Sci.* 39, 1-4
9. Tsutsui S, Yoshinaga T, Komiya K, Yamashita H, Nakamura O (2016). Differential expression of skin mucus C-type lectin in two freshwater eel species, *Anguilla marmorata* and *Anguilla japonica*. *Dev. Comp. Immunol.* 61, 154-160

〔学会発表〕 (計 31 件；うち 18 件を掲載)

1. 小川郁未, 古川史也, 篠田 章, 筒井繁行, 阿見彌典子, 吉永龍起. ニホンウナギの河川加入時における塩類細胞の変化. 日本水産学会秋季大会, 2018
2. 呉 青逸, 吉永龍起, 塚本勝巳, 篠田 章. 初期生活史解析に基づくニホンウナギの接岸機構の解明. 日本水産学会秋季大会, 2018
3. 小川郁未, 古川史也, 篠田 章, 筒井繁行, 阿見彌典子, 吉永龍起. ニホンウナギの河川生活期における塩類細胞の動態. 日本水産増殖学会第 17 回大会, 2018
4. 呉 青逸, 吉永龍起, 塚本勝巳, 篠田 章. ニホンウナギの初期生活史と海洋環境. 日本水産増殖学会第 17 回大会, 2018
5. リズティアン, 中曾 謙, 榊本峻行, 緒方京子, 高崎一人, 布藤 聡, 吉永龍起. DNA クロマトを用いたニホンウナギの判別法の開発. 日本水産学会春季大会, 2018
6. 吉永龍起, 山口杏奈, 足立賢太, 田中千香也, 青山 潤, 木村伸吾, 渡邊 俊, Michael J Miller, 塚本勝巳. ニホンウナギ天然卵の遺伝子解析による親魚数の推定. 第 30 回北里大学バイオサイエンスフォーラム, 2017
7. Yoshinaga T, Yamaguchi A, Shirotori F. CITES-listing and other social forces shrank the commercial utilization of the European eel in the Japanese market between 2011 and 2016. First UK International Eel Science Symposium, 2017
8. Shirotori F, Maezono T, Unagiike S, Aoyama J, Shinoda A, Yambot AV, Yoshinaga T. Early life history and recruitment season of *Anguilla bicolor pacifica* at the northern Philippines. First UK International Eel Science Symposium, 2017
9. 前蘭孝彰, 白鳥史晃, 篠田 章, 青山 潤, 高野昌和, 嵯峨篤司, 白石 學, 吉永龍起. ウナギ属熱帯種 3 種の初期生活史の多様性. 日本水産学会春季大会, 2017
10. 山口杏奈, 田中千香也, 足立賢太, 青山 潤, 木村伸吾, 渡邊 俊, Michael J Miller, 塚本勝巳, 吉永龍起. ニホンウナギ天然卵の遺伝子解析による親魚数の推定. 日本水産学会春季大会, 2017
11. 海部健三, 木村伸吾, 白井厚太郎, 望岡典隆, 横内一樹, 吉永龍起, 板倉 光, 脇谷量子郎. 河川におけるニホンウナギの保全生態学的研究 その 1: ニホンウナギの減少と保全生態学. 日本水産学会春季大会, 2017
12. 白鳥史晃, 中里 翔, 板倉 光, 脇谷量子郎, 海部健三, 白井厚太郎, 戸井田伸一, 吉永龍起. 河川におけるニホンウナギの保全生態学的研究 その 5: 酒匂川においてニホンウナギの分布を規定する要因. 日本水産学会春季大会, 2017
13. 横内一樹, 海部健三, 板倉 光, 脇谷量子郎, 吉永龍起, 望岡典隆, 木村伸吾. 河川におけるニホンウナギの保全生態学的研究 その 6: ニホンウナギの河川内分布. 日本水産学会春季大会, 2017

14. 脇谷量子郎, 横内一樹, 海部健三, 板倉 光, 吉永龍起, 望岡典隆, 木村伸吾. 河川におけるニホンウナギの保全生態学的研究 その7: 淡水域におけるニホンウナギのマイクロハビタット. 日本水産学会春季大会, 2017
15. 荒井考磨, 板倉 光, 米田彬史, 吉永龍起, 海部健三, 木村伸吾. 利根川水系における外来ウナギの分布状況. 日本水産学会秋季大会, 2016
16. 山口杏奈, 田中千香也, 青山 潤, 木村伸吾, 渡邊 俊, Michael J Miller, 塚本勝巳, 吉永龍起. ニホンウナギ天然卵の母系解析. 日本水産学会春季大会, 2016
17. 前蘭孝彰, 白鳥史晃, 篠田 章, 青山 潤, 高野昌和, 嵯峨篤司, 白石 學, 吉永龍起. ウナギ属熱帯種 *Anguilla interioris* の初期生活史. 日本水産学会春季大会, 2016
18. Yoshinaga T. Reproductive ecology of the Japanese eel. International Eel Symposium Eel Planet, 2016

〔図書〕 (計 1 件)

1. 吉永龍起. 外来種. 塚本勝巳 編, ウナギの科学. 朝倉書店. ISBN978-4-254-48502-8, 2019, pp. 146-149

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ: <https://yoshinagalab.wordpress.com>

メディア取材:

1. 格安ウナギの正体 (JAM THE WORLD; J-WAVE; 2018.8.20; スタジオ出演)
2. 大手チェーン店の商品を DNA 検査 (FLASH; 2018.7.31)
3. 都会で発見! 絶滅危惧種ウナギ (ダーウィンが来た; NHK 総合; 2018.7.15; 収録出演)
4. ウナギ不漁, 丑の日に影響も (週刊東洋経済; 2018.2.3)
5. スーパー・外食のウナギ加工品の種類は? (日本養殖新聞; 2017.8.25)
6. 土用の丑の日に考える うなぎのこと (ハレタル; 東洋経済新報社; 2017.7.25)
7. ウナギの資源保護など議論 (おはよう日本; NHK 総合; 2016.9.25; 収録出演)
8. ウナギ激減, 危うし丑の日 放流や募金…取り組み広がる (朝日新聞; 2016.7.30)
9. はびこるウナギの密輸入 台湾・香港ルートを追う (Wedge; 2016.7.20)
10. ウナギ関係者, 丑の日を前に保全策や代替品を議論 (オルタナ, Yahoo ニュース; 2016.7.11)
11. ウナギの稚魚に異変? 遡上 6 月も続く (朝日新聞; 2016.7.8)

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

※科研費による研究は, 研究者の自覚と責任において実施するものです. そのため, 研究の実施や研究成果の公表等については, 国の要請等に基づくものではなく, その研究成果に関する見解や責任は, 研究者個人に帰属されます.