

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（A）  
 研究期間：2006年度～2008年度  
 課題番号：18208018  
 研究課題名（和文）天然生態情報に基づく新しいウナギ種苗生産技術の開発  
 研究課題名（英文）Development of a new technology for seed production of the Japanese eel based on ecological information  
 研究代表者  
 氏名（アルファベット）塚本 勝巳（TSUKAMOTO KATSUMI）  
 所属機関・所属部局名・職名 東京大学・海洋研究所・教授  
 研究者番号 10090474

## 研究成果の概要：

資源が激減したウナギの養殖用種苗を補うために、天然生態情報を活用して人工種苗の生産技術の開発研究を行った。その結果、ホルモンを使わず、水温の操作のみにより自然にウナギを成熟させる技術の確立に道が開けた。雌雄の親魚を水槽内で自然産卵させることにより、奇形率が減り、良質の卵を得ることができた。天然仔魚の栄養段階の解析から、マリンスノーを餌としていることがわかった。天然の生息環境を調べて、これを模した飼育装置を開発し、生産コストを大幅に削減することができた。本研究によりウナギの大量種苗生産の実現に向けて大きく前進した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
18年度	23,500,000 円	7,050,000 円	30,550,000 円
19年度	7,300,000 円	2,190,000 円	9,490,000 円
20年度	6,300,000 円	1,890,000 円	8,190,000 円
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	37,100,000 円	11,130,000 円	48,230,000 円

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：増養殖，種苗生産

## 1. 研究開始当初の背景

ウナギ (*Anguilla japonica*) は我が国だけでも年間 10 万トンも消費される水産重要種である。しかし 1970 年以降世界のウナギ属魚類の資源は激減した。養鰻用のシラスウナギ種苗の不足を補う目的で、1960 年代よりウナギの人工種苗生産技術の開発が始まり、近年世界初のシラスウナギ生産にまで漕ぎつけた (Tanaka 2003)。しかしこれはまだ実験的段階で、実用に耐える大量生産技術の完

成には遠い。それは「卵質」と「仔魚飼育技術」の 2 大問題が依然として解決されていないからである。約 2 ヶ月にわたって 10 回ものホルモン注射を繰り返した結果得られるウナギ卵の卵質は、古くから懸念されてきた。現在でも卵期に多発する異常卵割や孵化仔魚の 50% を越える奇形率は、親魚の成熟過程に遡り、抜本的に卵質を見直す必要があることを示している。一方、仔魚飼育はサメの卵黄を初期餌料として用いることで飛躍的に

進歩した。しかし、これは一般の魚類の大規模飼育とは全く異なり、多大な手間と時には1年をこえる長い時間を要す。こうした卵質と飼育技術の大幅な見直しをしない限り、ウナギの健全な大量種苗生産技術の確立は望めない。

ウナギの産卵生態と初期生態に関する研究は近年大きな展開をみせている。2005年の白鳳丸航海では孵化後2日齢のプレプトセファルスが200尾以上採集され(Tsukamoto, Nature 2006), 2008年にはマリアナ沖の産卵場で、ついに親魚が採集された。今後卵が採集されれば産卵地点の水深・水温・光・産卵時刻などの環境条件がすべて明らかになる。また親魚の生理状態と卵の発生過程についても天然の詳しい情報が得られる。

ウナギレプトセファルスの消化管内容物の顕微鏡観察から、ウナギは動物プランクトンの糞粒やオタマボヤの被嚢を摂食していると推定されているが、これらが餌の主成分であるか否かは不明である。下りウナギの生理学的解析は、成熟初期の天然ウナギの内分泌状態や成熟プロセスを知る上で重要であるが、いくつか知見があるものいずれも断片的で、包括的結論は得られていない。脳下垂体や各種ホルモンを多量に用いる現行の種苗生産法は、天然生態情報に基づいてより自然な方法に見直される必要がある。

## 2. 研究の目的

こうした背景を踏まえて、本研究ではまず、天然環境下のウナギの(1)成熟過程、(2)産卵過程、(3)発育過程を明らかにし、これらの知見をもとにホルモンを使わない新催熟技術と自然産卵誘発技術を開発する。またサメ卵に代わる初期餌料の探索を行い、大量種苗生産を可能にする健全な仔魚飼育技術の開発を行う。これらを総合して従来のウナギ人工種苗生産法とは全く異なる、新しいウナギの自然種苗生産技術を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ウナギの人工種苗生産を成熟、産卵、発育の3過程にわけ、各過程について野外生態調査と室内実験を実施する。それぞれについて自然催熟技術、産卵誘発技術、仔魚飼育技術を開発し、これらを統合して、これまでとは全く違った、新しいウナギ種苗生産技術の確立を目指す。

### (1) 成熟過程

下りウナギの内分泌状態の観察

浜名湖・都田川および三河湾で採集した下りの銀ウナギについて、血中のステロイドホルモン(E2、T、11-KT)と甲状腺ホルモン(T4、T3)をELISA法で測定する。また

GTH、GnRHはリアルタイムPCR法によりmRNAから発現量を推定する。産卵場で親魚が採集されれば同様の解析を行い、内分泌状態を把握する。

### 非ホルモン催熟実験

大型円形回遊水槽6基に親魚候補のウナギを収容し、5°、10°、15°、20°、25°、30°の水温区を作る(図3)。3ヶ月後に生殖腺の組織像、GSI、卵径を調べ、水温がウナギの成熟に与える影響を検討する。

### (2) 産卵過程

#### 卵・仔魚・親魚の採集

2006、2007、2008年の白鳳丸航海において、ウナギ卵・仔魚・親魚の採集を行い、本種の産卵地点を特定する。採集された魚卵については、船上でリアルタイムPCR法により種査定を行う。ウナギ卵と査定された場合は船上で飼育を行い、人工種苗との発育比較を行う。産卵地点の環境条件は、CTD、ADCPにより計測する。

#### 産卵行動実験

サケ脳下垂体処理で人為催熟したウナギ(3尾・3尾)にDHP(排卵誘発ホルモン)を注射し、角型観察水槽に収容してビデオ記録により産卵行動を観察する。異なる水温の実験区を作り、水温が産卵行動に与える影響をみる。

### (3) 発育過程

#### 初期餌料の探索

天然海域で採集されたウナギレプトセファルスの消化管組織を観察すると同時に、消化管内容物をSEMで観察する。

マリアナ海域で採集された天然レプトセファルス3個体(TL約15mm)、人工生産されたレプトセファルス2個体(TL13、16mm)および人工レプトセファルスの飼育に用いられる含サメ卵養殖研餌について、3種類のアミノ酸(アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)、フェニルアラニン(Phe))の窒素同位体比をガスクロマトグラフ/燃焼/同位体質量分析計を用いて測定し、それぞれの栄養段階を推定する。

#### 発達過程の比較

人工種苗と天然仔魚の形態を卵黄の吸収、眼、口器、内臓等の発達に着目して同日齢毎に比較する。

#### 初期餌料と飼育システムの改良

人工種苗の摂餌実験からサメ卵以外の効果的な餌料を探索する。また現行のアクリル製ハーフパイプを用いた仔魚飼育システムを見直すために、まず仔魚の摂餌行動に及ぼす、水温、光、水深、水流の影響を実験的に明らかにする。その結果を基に、新しい飼育装置を考案する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 成熟過程

###### 下りウナギの内分分泌状態の観察

浜名湖と三河湾で採集した下りウナギについて降海行動に伴うステロイドホルモン ( $E_2$ , T, 11-KT),  $T_4$ , GTH, GnRH の動態を検討したところ, 秋~初冬の降海行動に伴って,  $E_2$ , T, 11-KT, LH が上昇し, GH が下降することがわかった。一方, FSH, TSH は変化しなかった。これにより, ウナギの降河回遊と成熟の開始時のホルモン動態をほぼ把握することができた。

###### 非ホルモン催熟実験

ホルモンを投与しないで親ウナギの自然催熟を行う技術を開発するため, ステロイドホルモン ( $E_2$ ) 処理によってメス化した養成ウナギに毎日 5-15 の変動水温を与えたところ, 3ヶ月後には GSI が 4%前後にまで進んだ。また三河湾で採集された下りウナギを大型回遊水槽に収容し, 5-15 の日周変動水温を与え3ヶ月後に成熟度を調べたところ, 有意差は無かったものの, 卵径, GSI, 組織像に催熟効果が認められた。またその内1個体は GSI が 8.5 まで上昇し, 卵は第2次卵黄球期にまで成熟が進んだ(図1)。これはウナギでホルモンを使わず成熟を進めることができた世界で初めての例であり, これにより水温刺激で自然催熟できる可能性が示された。今後, 光や運動の影響を合わせて検討する必要がある。



図1 大型回遊水槽中で 5-15 の日周変動水温を与え3ヶ月飼育した銀ウナギの卵巣。GSI は 8.5 まで上昇し, 卵は第2次卵黄球期になった。

##### (2) 産卵過程

###### 卵・仔魚・親魚の採集

2005, 2007, 2008 年の研究航海において, 孵化後 2~7 日のプレレプトセファルスそれぞれ, 約 200 尾, 7 尾, 約 150 尾を採集した(図2)。これらはいずれも西マリアナ海嶺の端の海山域で採集されており, 海山仮説の証明となった(Tsukamoto 2006)。また, 採集日とプレレプトセファルスの日齢から

逆算した親魚の産卵日はいずれも各月の新月直前(2~5日前)であり, 新月仮説(Tsukamoto et al. 2003)の証明もできた。

ウナギ目の卵は4年間に約100個体採集されたが, その塩基配列解析より, いずれも二ホンウナギ卵ではないものと考えられた。

ウナギ産卵場の指標と考えられる 34.5 psu の塩分フロントが北緯 18.5 度に認められた。

2008 年夏, 水産庁の開洋丸で二ホンウナギの産卵後雌親魚 2 尾, 産卵前雄親魚 2 尾, オオウナギ雄親魚 1 尾が得られた。親魚の耳石 Sr:Ca 比の解析から回遊履歴を推定したところ, 二ホンウナギ 4 尾中 1 尾は一度も淡水を経験していない海ウナギで, 1 尾は通常の降河回遊性の回遊型をもつ川ウナギ, 残り 2 尾は河口ウナギと判定された。このことは河川を成育場として使うウナギより海または河口で成長したウナギの方が再生産への貢献度が高いことを示唆しており, 沿岸の銀ウナギ 600 個体より得られた結果とよく一致した。資源管理の方策を根底から見直す必要を提起する結果となった。

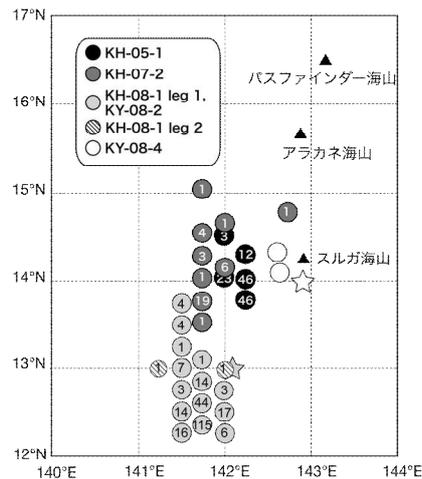


図2 プレレプトセファルスの採集測点(丸印)。丸内の数字は採集個体数。星印は親魚の採集測点。KY-08-2 データは Chow et al. in press. より引用, KY-08-4 データは Kurogi et al. unpublished.

###### 産卵行動実験

人工受精法と雌雄のペアリングによる自発産卵法の比較を行ったところ, 自発産卵法で得た卵の方が受精率が高く, 孵化仔魚の奇形率は低かった。また水温 22 で最も産卵前の活動が活発になることがわかった。

3m の大型水槽で雌雄各 30 尾の親ウナギの産卵行動を観察したところ, 顕著な追尾行動が見られないまま, 放精, 放卵が行われることを確認した。ウナギの産卵は少なくともサケのようなペア産卵ではないと考えられ

た。これらの結果は、採卵技術の向上につながる。

### (3) 発育過程

#### 初期餌料の探索

消化管内容物を SEM で観察したところ、腸吸収細胞の微柔毛の上に球形または繊維状の粘液様物質が多数確認された(図3)。球形の粘液様物質の大きさは直径 10  $\mu\text{m}$  以下(大部分が 3-5  $\mu\text{m}$ )で、いずれも一般にマリンスノーと称される懸濁物と推察された。粘液様物質の他に、識別される固形物は認められず、この傾向は個体間で特に顕著な違いはみられなかった。

レプトセファルスの食べた餌の窒素同位体比を反映するグルタミン酸に対するフェニルアラニンの窒素同位体比から栄養段階を推定すると、天然レプトセファルスが平均 2.3 であるのに対し、人工魚は 4.5、サメ卵を主体とした人工餌が 3.3 となり、人工魚に比べ天然魚は栄養段階の低い植物プランクトン(栄養段階 = 1)を主食としているものと考えられた(表2)。これにより、レプトセファルスがデトリタスフィーダーであることが、ほぼ確定された。

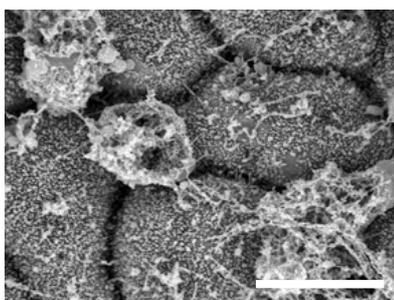
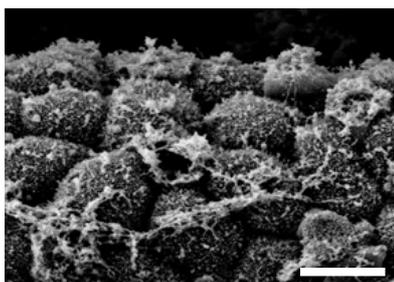


図3 ウナギ消化管上皮の SEM 写真

#### 発達過程の比較

プレプトセファルスの消化管は前半部の食道と後半部の腸とに明瞭に区別され、腸内壁上皮は1層の吸収細胞で構成された(図4)。この吸収細胞の自由表面は微絨毛で覆われ、細胞上部には大小の顆粒構造、細胞下部には多数のミトコンドリアと発達した層板状膜構造が観察された(図5)。これらの細胞学的特徴はいずれもウナギレプトケファルスの腸吸収細胞(Otake 1996)のものと同様

であり、プレプトケファルスにおいてすでに腸管が機能化し、栄養吸収を開始している可能性を示唆する。観察に供した個体の日齢は4~5日と推定されており、ふ化後5~7日で腸が機能化する人工種苗(Kurokawa et al. 1996)に比べ、天然魚では消化吸收機能の発達が若干早いものと考えられた。



図4 ウナギプレプトケファルス(全长 5.2mm)の腸上皮

#### 初期餌料と飼育システムの改良

人工レプトセファルスの摂餌実験を行い、種々の餌候補生物を試してみたが、現在のところサメ卵を凌ぐ成長・生残を示す餌料は見つかっていない。今後こうした餌のスクリーニングを続けていく必要がある。

レプトセファルスの飼育に適した回転水流をもつ縦型円形水槽“レプトタンク”を作成した。タンクの洗浄およびタンク内での給餌を自動化して、省力化を図ったところ、従来の生産コストを大幅に(約 1/10)削減することができた。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者に下線)

(雑誌論文)(計 53 件、以下抜粋)

1. Tsukamoto, K., Oceanic migration and spawning of anguilled eels. *Journal of Fish Biology*, in press, 2009 (査読有).
2. Kuroki, M., J. Aoyama, K. Tsukamoto (他 4 名 2, 7 番目), Sympatric spawning of *Anguilla marmorata* and *Anguilla japonica* in the western North Pacific Ocean. *Journal of Fish Biology*, in press, 2009 (査読有).
3. Fukuda, N., J. Aoyama, K. Tsukamoto (他 4 名 6, 7 番目), Influence of water temperature and feeding regime on otolith growth in *Anguilla japonica* glass eels: Does otolith growth cease at low temperatures? *Journal of Fish Biology*, in press, 2009 (査読有).
4. Yamada, Y., A. Okamura, K.

- Tsukamoto (他 5 名 8 番目), Ontogenetic changes in phototaxis behavior during metamorphosis of artificially reared *Anguilla japonica* larvae. Marine Ecology Progress Series, in press, 2009 (査読有).
5. Aoyama, J., Life history and evolution of migration in catadromous eels (Genus *Anguilla*), Aqua BioScience Monograph, 2, 1-42, 2009 (査読有).
  6. Chow, S., H. Kurogi, K. Tsukamoto(他 3 名 6 番目), Discovery of mature freshwater eels in the open ocean. Fisheries Science, 75, 257-259, 2009 (査読有).
  7. Okamura, A., Y. Yamada, K. Tsukamoto (他 5 名 8 番目), Short communication rearing eel leptocephali (*Anguilla japonica* Temminck & Schlegel) in a planktonkreisel. Aquaculture Research, 40, 509-512, 2009 (査読有).
  8. Okamura, A., H. P. Oka, K. Tsukamoto (他 5 名 8 番目), Assessing sexual maturity of feminized Japanese eel *Anguilla japonica* by measuring eye size. Aquacult Int, 17, 91-99, 2009 (査読有).
  9. Tsukamoto, K., Y. Yamada, T. Kaneko (他 7 名 1, 6 番目), Positive buoyancy in eel leptocephali: an adaptation for life in the ocean surface layer. Marine Biology, 156, 835-846, 2009 (査読有).
  10. Dou, S., Y. Yamada, K. Tsukamoto (他 3 名 6 番目), Temperature influence on the spawning performance of artificially-matured Japanese eel, *Anguilla japonica*, in captivity. Environmental Biology of Fishes, 82, 151-164, 2008 (査読有).
  11. Kaneko, T., S. Watanabe & K. M. Lee, Functional morphology of mitochondrion-rich cells in euryhaline and stenohaline teleosts. Aqua-BioScience Monograph, 2008, 1, 1-62 (査読有).
  12. Kim, Y. K., H. Ideuchi, T. Kaneko (他 3 名 6 番目), Rectal water absorption in seawater-adapted Japanese eel *Anguilla japonica*. Comparative Biochemistry and Physiology A, 151, 533-541, 2008 (査読有).
  13. Okamura, A., Y. Yamada, K. Tsukamoto(他 4 名 7 番目), Effects of silvering state on induced maturation and spawning in wild female Japanese eel *Anguilla japonica*. Fisheries Science, 74, 642-648, 2008 (査読有).
  14. Okamura, A., Z. Huan, K. Tsukamoto (他 7 名 10 番目), Decline in non-native freshwater eels in Japan: ecology and future perspectives. Environmental Biology of Fishes, 81, 347-358, 2008 (査読有).
  15. Watanabe S., J. Aoyama & K. Tsukamoto, The use of morphological and molecular genetic variations to evaluate subspecies issues in the genus *Anguilla*. Coastal Marine Science, 32, 19-29, 2008 (査読有).
  16. Yokouchi, K., J. Aoyama, H. P. Oka & K. Tsukamoto, Variation in the demographic characteristics of yellow-phase Japanese eels in different habitats of the Hamana Lake system, Japan. Ecology of Freshwater Fish, 17, 639-652, 2008 (査読有).
  17. Dou, S., Y. Yamada, K. Tsukamoto (他 3 名 6 番目) Observations on the spawning behavior of artificially matured Japanese eels *Anguilla japonica* in captivity. Aquaculture, 266, 117-129, 2007 (査読有).
  18. Kotake, A., T. Arai, K. Tsukamoto (他 5 名 8 番目), Ecological aspects of Japanese eel, *Anguilla japonica*, collected from coastal areas of Japan. Zoological Science, 24, 1213-1221, 2007 (査読有).
  19. Okamura, A., Y. Yamada, K. Tsukamoto (他 5 名 8 番目), A silvering index for the Japanese eel *Anguilla japonica*. Environmental Biology of Fisheries, 80, 77-89, 2007 (査読有).
  20. 塚本勝巳, ウナギの回遊に関する研究. 平成 19 年度日本農学賞受賞論文要旨. 10-12, 2007 (査読無).
  21. Kimura, S. & K. Tsukamoto, The salinity front in the North Equatorial Current: A landmark for the spawning migration of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) related to the stock recruitment. Deep-Sea Research II, 53, 315-325, 2006 (査読有).
  22. Otake, T., M. J. Miller, K. Tsukamoto (他 9 名 1, 12 番目), Evidence for migration of metamorphosing larvae of *Anguilla japonica* in the Kuroshio. Coastal Marine Science, 30, 453-458, 2006 (査読有).

23. Kamei, H., T. Kaneko, T. & K. Aida, Steroidogenic activities of follicle-stimulating hormone in the ovary of Japanese eel, *Anguilla japonica*. General and Comparative Endocrinology, 146, 83-90, 2006 (査読有).
24. Sasai, S., F. Katoh, T. Kaneko & K. Tsukamoto, Ontogenic change of gill chloride cells in leptocephalus and glass eel stages of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Marine Biology, 150, 487-496, 2006 (査読有).

〔学会発表〕(計70件, 以下抜粋)

1. Aoyama, J., Ecological traits of the Japanese eel and their conservation. The 11th annual meeting of EASEC International Symposium "Eel 2008 in Yokohama: Multi-disciplinary approaches for eel conservation", October 17, 2008, Queens Forum, Yokohama.
2. Kaneko, T., Recent advances in chloride cell research, Pauley Summer Program, Hawaii Institute of Marine Biology, July 24, 2008, Coconut Island, Hawaii, USA.
3. Tsukamoto, K., A tale of silver eels: their maturation, migration and spawning behavior-lessons we can learn from the field. Aquaculture Europe 2008, September 15, 2008, Kurakow, Poland.
4. Aoyama, J., Molecular approaches for understanding migratory ecology and evolution of freshwater eels. University of Hawaii and University of Tokyo Joint Symposium on Ocean and Coastal Sciences, March 13, 2008, Ocean Research Institute, The University of Tokyo.
5. Kaneko, T., Development and differentiation of chloride cells during early life stages of fish. The 7th International Symposium on Developmental Biotechnology, October 26, 2007, Jeju National University, Jeju, Korea.
6. Tsukamoto, K., Migratory behavior has driven the evolution in anguillid eels. Commemoration of the 130th Anniversary of the National Museum of Nature and Science - International Symposium on Systematics and Diversity of Fishes -, March 2, 2008, The National Museum of Nature and

Science, Ueno, Tokyo.

7. Tsukamoto, K., The Mystery of Eel Spawning and their Great Migration. 2007 Forum on Fishery Science and Technology, October 23, 2007, Qingdao Fuxin Hotel, Qingdao, China.

〔図書〕(計6件, 以下抜粋)

1. Tsukamoto, K., M. J. Miller, J. Aoyama(他2名1, 4番目), The origin of diadromous fish migration: the random escapement hypothesis In *Challenges for Diadromous Fishes in a Dynamic Global Environment* (eds Haro, A., T. Avery et al.), American Fisheries Society, 2009, in press.
2. Tsukamoto, K., J. Aoyama & M. J. Miller, Present status of the Japanese eel *Anguilla japonica*: resources and recent research. In *Eels at the edge* (eds. Casselman, J. & D. Cairns), American Fisheries Society, 21-35, 2009.
3. Kaneko, T. & J. Hiroi, Osmo- and ionoregulation. In *Fish Larval Physiology* (eds. Finn, R.N. & B. G. Kapoor), 163-183, 2008.

〔その他〕

1. 朝日新聞夕刊 ニッポン人・脈・記(2007年12月19日)
2. NHK ワールドテレビ(2007年9月14日)
3. テレビ朝日 素敵な宇宙船地球号(2006年7月16日)

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚本 勝巳(研究者番号 10090474)  
東京大学・海洋研究所・教授

(2)研究分担者

青山 潤(研究者番号 30343099)  
東京大学・海洋研究所・特任准教授

大竹 二雄(研究者番号 20160525)  
東京大学・海洋研究所・教授

金子 豊二(研究者番号 70221190)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

(3)連携研究者

なし