

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：32641

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830149

研究課題名(和文) 経験水温の相違を利用した、ニホンウナギの天然加入個体と放流個体の識別法の開発

研究課題名(英文) Development of a method to discriminate wild and stocked Japanese eel using environment water temperature

研究代表者

海部 健三(Kaifu, Kenzo)

中央大学・法学部・助教

研究者番号：30615258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ニホンウナギの天然加入個体と放流個体とを識別する手法を開発した。4県20経営体に対する調査により、養殖場における飼育水が一般的に28℃から30℃の淡水であることが確認され、天然加入個体と養殖場から購入・放流される個体とでは、耳石の酸素・炭素安定同位体比が異なると予測された。天然加入個体106個体と養殖個体314個体を入手し、耳石安定同位体比を比較した。非線形判別モデルにより判別分析を行ったところ、教師データの判別率は98.6%であった。天然加入が途絶えていると報告されている福井県三方湖で捕獲された20個体に、判別モデルを適用したところ、90%に養殖場の経験がある(放流個体である)と判別された。

研究成果の概要(英文)：Discrimination method to distinguish wild and stocked Japanese eel was developed. Based on investigation of 20 eel farms in 4 prefectures, we found eel farms use freshwater of 28-30℃ in general. Oxygen and carbon stable isotope ratios of 106 wild eels and 314 cultured eels were compared and non-linear discrimination analysis was applied. 98.6% of the training data was correctly discriminated. The discrimination model was then applied to 20 eels caught in Mikata Lake, where no or little eels are now recruiting. 90% of the eels was discriminated as eels once cultured in eel farm, i.e., stocked eels.

研究分野：保全生態学

キーワード：ニホンウナギ 放流 耳石 安定同位体

1. 研究開始当初の背景

ニホンウナギ資源の維持と回復を目的として、過去 40 年間にわたり、ウナギを漁業対象種としているほとんど全ての内水面漁協が、仔魚放流を行ってきた。これら放流個体のほとんどは標識を施されていないが、もしもこれら放流個体を天然加入個体と区別する技術が開発されれば、長期間にわたって全国的に標識放流を継続した場合と同じ効果が生み出されることになり、本種の資源学的研究に大きく貢献する。

2. 研究の目的

ニホンウナギの保全生態学的研究の基盤を整え、本種資源の保全と持続的利用に貢献することを目的として、ニホンウナギの天然加入個体と放流個体を識別する手法を開発した。

3. 研究の方法

ニホンウナギは、東アジア沿岸に分布する全個体が単一の任意交配集団を形成しているため、地域間で遺伝的集団構造を形成しない。このため識別には、遺伝子ではなく、成育過程の履歴が記録された硬組織である耳石(内耳の一部)を用い、その酸素・炭素安定同位体比を利用した。

飼育環境：飼育環境について、複数の養鰻場を訪問して聞き取り調査を行うとともに、直接環境計測を行った。4 県 20 経営体に対する調査により、養鰻場における飼育水が一般的に 28 から 30 の淡水であることが確認され、天然加入個体と養鰻場から購入・放流される個体とでは、耳石の酸素・炭素安定同位体比が異なると予測された。

識別手法の開発：耳石酸素・炭素安定同位体比については、天然加入個体 68 個体(4 グループ)および養鰻場個体 216 個体(6 グループ)の耳石酸素・炭素安定同位体比を比較した。

ニホンウナギから取り出した耳石試料はエポキシ樹脂(Epofix、Struers 社製)に包埋した後、エポキシ樹脂系化学反応形接着剤(クイック 30、KONISHI 社製)でスライドガラスに接着した。70 $\mu$ m および 13 $\mu$ m のダイヤモンドカップ砥石を装着した鉋物薄片標本作成装置(Discoplan-TS、Struers 社製)を用いて、耳石中心を挟むように長軸方向で両面から研磨した。研磨面の片面は耳石核が表面に露出する直前まで研磨した。その後、コロイダルシリカ懸濁液(OP-S、Struers 社製)と回転研磨装置(LaboPol、Struers 社製)により鏡面になるまで琢磨し、核を露出させ耳石薄層切片を作成した。

耳石分析のための粉末試料の削り出しは、パワーパック(Minimo、C101A、ミニター社製)に接続されたハンドピース(Minimo、スタンダードルーター M21H、ミニター社製)を使用し、円錐のマイクロドリル(電着

ダイヤモンドバー AD1201、ドリル径 0.7mm、ミニター社製)によって顕微鏡下で耳石を掘削した。耳石の掘削範囲は、河川生活期あるいは養鰻場生活期部分とした。シラスウナギが接岸した際に耳石の核から 150 $\mu$ m 付近に形成されるエルバーマークよりも内側は、全個体が共通して経験する海洋生活期に相当する。そのため、初めに全ての個体からエルバーマーク内側部分を削り取り、エアダスターで除去し、エルバーマークの内側は掘削範囲から除外した。耳石粉末は、放流個体が養鰻場で飼育された時期にあたる部分を採取する必要がある。平成 22 年及び平成 23 年に福井県三方湖と岡山県旭川にて放流用に漁業協同組合によって購入された養鰻場個体の耳石の長径を計測したところ、放流用個体の耳石の 90%が長径 1,312 $\mu$ m よりも大きかった。耳石のこの径よりも外側部分は、河川に生息する全ての個体(放流された個体も含む)において河川生活期に相当し、内側部分が天然加入個体と放流個体で生活場所に相違がある部分に相当する。そのため、エルバーマークの内側を除去後、核から長径 650 $\mu$ m の範囲内を掘削し、50 から 250 $\mu$ m の耳石試料粉末を得た。得られた粉末をアルミ箔上に回収した後、分析用ガラスバイアルに導入した。同位体比分析は自動前処理装置(GasBench II、Thermo Fisher Scientific)に接続された安定同位体質量分析装置(Delta V plus、Thermo Fisher Scientific)により行った。粉末の入ったバイアル瓶を高純度ヘリウム(99.9999%以上)により置換し、その後シリンジを用い 100%リン酸を滴下し、試料と 70 で反応させる事で二酸化炭素を発生させた。試料から発生した二酸化炭素ガスをヘリウムキャリアーガス流により装置に輸送し、ナフィオン半透膜による脱水、ガスクロマトグラフによる分離精製(PoraPLOT Q、Agilent)を経た後に、質量分析部に導入した。質量数 44 ( $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ )、45 ( $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ )、46 ( $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ )の信号強度を 3 つの並列のファラデーカップ検出器で分析した。同位体比は Pee Dee Belemnite (PDB)からの偏差を千分率(%)で表記した(下式)

$$\square_{\text{Sample}} \text{ 値} = [(\text{試料の同位体比} / \text{PDB の同位体比}) - 1] \times 1000$$

National Bureau of Standard から頒布されている同位体組成が既知の大理石標準試料である NBS-19 ( $\square^{13}\text{C} = +1.95\%$ 、 $\square^{18}\text{O} = -2.20\%$ 、VPDB)を標準試料として用いた。本分析装置では試料導入量( $\square$ 信号強度)に依存した検出感度変化が見られる。その影響と検出感度の経時変化を補正するため、50、100、150、200、250 マイクログラムと 5 段階に重さを変えた NBS-19 を 10 試料毎に分析し、信号高度と感度の関係式を得た。その同位体比の信号強度依存性を基に試料の信号強度依存性を補正した後、NBS-19 の信号強度を基に試料

の同位体比を算出した。信号強度依存性を補正した後の NBS-19 の繰り返し再現性を分析誤差として採用した。誤差は $\delta^{13}\text{C}$  で 0.7‰ から 1.2‰、 $\delta^{18}\text{O}$  で 0.7‰ から 1.8‰ 程度であった。天然加入個体と養殖個体合計 420 個体のニホンウナギ耳石の酸素・炭素安定同位体比を教師データとして、非線形判別モデルを得た。判別モデルの計算には、統計ソフト R (version 3.0.2) の qda を利用した。

識別手法の検証：得られた判別モデルの信頼性を確認するため、すでに先行研究によってシラスウナギの加入が確認されていないことが報告されている福井県三方湖で採集された 20 個体のニホンウナギに非線形判別モデルを適用した。

#### 4. 研究成果

天然加入個体 106 個体と養殖個体 314 個体、合計 420 個体を教師データとした非線形判別モデルにより判別分析を行ったところ、教師データの判別率は 98.6% であった。天然加入が途絶えていると報告されている福井県三方湖で捕獲された 20 個体に、判別モデルを適用したところ、90% に養殖場の経験がある（放流個体である）と判別された（図 1）。

以上より、耳石の酸素・炭素安定同位体比を利用して、ニホンウナギの天然加入個体と放流個体のある程度の確度で判別する手法が可能であることが分かった。

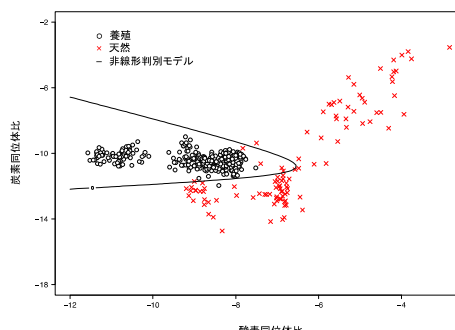


図 1：420 個体の教師データを用いた線形判別分析

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 8 件）

1. Terui A, Miyazaki Y, Yoshioka A, Kaifu K, Matsuzaki S, Washitani I (2014) Asymmetric dispersal structures a riverine metapopulation of the freshwater pearl mussel *Margaritifera laevis*. *Ecology and Evolution* 4, 3004-3014
2. Yokouchi K, Kaneko Y, Kaifu K, Aoyama J, Uchida K, Tsukamoto K (2014) Demographic survey of the yellow-phase Japanese eel *Anguilla japonica* in Japan. *Fisheries Science* 80, 543-554
3. Kaifu K, Maeda H, Yokouchi K, Sudo R,

- Miller MJ, Aoyama J, Yoshida T, Tsukamoto K and Washitani I (2014) Do Japanese eels recruit into the Japan Sea coast?: a case study in the Hayase River system, Fukui Japan. *Environmental Biology of Fishes* 97, 921-928
4. Kaifu K, Miller MJ, Aoyama J, Washitani I, Tsukamoto K (2013) Evidence of niche segregation between freshwater eels and conger eels in Kojima Bay, Japan. *Fisheries Science* 79, 593-603
5. 宮崎佑介・照井 慧・吉岡明良・海部健三・鷺谷いづみ (2013) 「朱太川水系沓瀬原の小規模な一時的水域の魚類相：種多様性の要因と保全・再生への示唆」 保全生態学研究 18, 55-68
6. Kaifu K, Yokouchi K, Aoyama J, Tsukamoto K (2013) Head shape polymorphism in Japanese eels *Anguilla japonica* in relation to differences of somatic growth in freshwater and brackish habitats. *Journal of Fish Biology* 82, 1308-1320
7. Kaifu K, Miyazaki S, Aoyama J, Kimura S, Tsukamoto K (2013) Diet of Japanese eels *Anguilla japonica* in the Kojima Bay-Asahi River system, Japan. *Environmental Biology of Fishes* 96, 439-446
8. Kaifu K, Miller MJ, Yada T, Aoyama J, Washitani I, Tsukamoto K (2013) Growth differences of Japanese eels *Anguilla japonica* between fresh and brackish water habitats in relation to annual food consumption in the Kojima Bay-Asahi River system, Japan. *Ecology of Freshwater Fish*, 22, 127-136

〔学会発表〕（計 8 件）

1. 海部健三 天野洋典 板倉光 杉原奈央 子 白井厚太郎 横内一樹 大竹二雄 木村伸吾 鷺谷いづみ 矢田崇 (2014) 「ニホンウナギ天然加入個体 / 放流個体識別法とその応用」平成 26 年日本水産学会春季大会, 函館
2. Yada T, Kaifu K, Kaiya H, Tsukamoto K (2013) Ghrelin and food acquisition in Japanese eel. The 7<sup>th</sup> Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE) intercongress, Keelung.
3. Kaifu K (2013) Report on the Japanese eel symposium. The 16<sup>th</sup> East Asia Eel Resource Consortium (EASEC), Tokyo.
4. Shinoda A, Aoyama J, Mochioka N, Yoshinaga T, Kaifu K, Kaji Y, Kurogi H, Wakiya R, Yada T, Amiya N, Tsutsui S, Ishikawa M, Tanaka Y, Matsushita K, Matsushita M, Hidaka S, Han YS, K Tsukamoto K (2013) Eel river project. The 16<sup>th</sup> East Asia Eel Resource Consortium (EASEC), Tokyo.
5. Kaifu K, Andre M, Akamatsu T (2013) Particle motion perception by cephalopods.

World Congress of Mariculture and Fisheries, Hangzhou

研究者番号：30615258

6. Andre M, Kaifu K, Sole M, van der Schaar M, Akamatsu T, Balastegui A (2013) Sound reception and effects in marine invertebrates. Third International Conference on the Effects of Noise on Aquatic Life, Budapest
7. 矢田崇 海部健三 阿部倫久 塚本勝巳 (2013) 「河川遡上期のウナギにおけるコルチゾールと関連遺伝子の動態」平成 25 年度動物学会, 岡山
8. 海部健三 天野洋典 板倉光 横内一樹 白井厚太郎 大竹二雄 木村伸吾 鷲谷いづみ 矢田崇 (2013) 「耳石酸素・炭素安定同位体比を利用したニホンウナギ天然加入個体 / 放流個体識別法の開発」平成 25 年度日本水産学会秋季大会, 三重

(2)研究分担者

(3)連携研究者

〔図書〕(計 3 件)

1. 海部健三 (2013) 「IUCN ウナギレッドリスト会議報告」ほか 東アジア鰻資源協議会編「うなぎの未来」青土社, 東京
2. 海部健三 (2013) 「わたしのウナギ研究」さ・え・ら書房, 東京
3. 海部健三 (2012) 「汽水域に生息するウナギと人」黒木真理編「ウナギの博物誌」第四章 pp. 95-114. 化学同人, 京都.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://c-faculty.chuo-u.ac.jp/blog/kaifu/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

海部 健三 (KAIFU, Kenzo)  
中央大学・法学部・助教