

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03859

研究課題名（和文）環境制御によるウナギ健苗量産化に向けた機能形態学的アプローチ

研究課題名（英文）Morphofunctional approach for stable mass production of glass eels through environmental controls

研究代表者

黒木 真理 (Kuroki, Mari)

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：00568800

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：ニホンウナギの味覚、嗅覚、視覚、側線器官の各外部環境情報受容機構について詳細な検討を行い、各発育過程における機能形態学的特性を明らかにした。また、耳石酸素安定同位体比分析、野外調査、行動実験による仮説検証など複数のアプローチによって、ニホンウナギにとって好適な環境条件を推定した。本研究によって得られた知見は、本種の人工飼育環境の制御による健苗量産化に向けて、適切な成育環境の選定に資すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニホンウナギ仔稚魚の外部環境情報受容機構および成育環境条件について得られた研究成果は、現在の喫緊の課題であるニホンウナギ種苗生産技術確立でボトルネックのひとつとなっている飼料開発における問題点を洗い出す上で重要な情報となる。また、飼育環境の制御による健苗量産化や継代飼育による選抜育種に向けて、適切な環境の選定や保全に資する知見も得られており、今後の活用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We examined the receptive mechanisms of taste, smell, visual and lateral line organs of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, using morphofunctional approaches and revealed the morphological and functional features during the developmental stages from leptocephalus larvae to juvenile glass eels. We also estimated the characteristics of their favorable habitat conditions by applying multiple approaches, including otolith oxygen stable isotope analysis, behavioral experiments, and field surveys. These results will contribute to the selection of appropriate rearing environments for stable mass production of healthy seedlings by controlling the rearing environment conditions and to the conservation of the wild population of the Japanese eel.

研究分野：水圏生態学

キーワード：ウナギ 感覚器官 行動生理

### 1. 研究開始当初の背景

ウナギ属魚類の仔魚(レプトセファルス幼生)の生理・生態学的知見は、外洋における産卵場調査の過程で蓄積されてきた。ニホンウナギ *Anguilla japonica* は2009年に天然卵が西マリアナ海嶺で採集され、孵化してから発育・成長し、変態するまでの初期生活史の全貌が明らかになった。一方、養殖用種苗のシラスウナギ稚魚の安定供給を目指し、日本では約50年前から人工種苗生産の研究が始まった。2003年には世界初の人工シラスウナギができ、2010年には第2世代が誕生して人工環境下で本種の生活環を完結させる完全養殖に成功した。しかし、依然として飼育環境下における仔魚の生残・成長率は低く、長期にわたる飼育期間中の大規模な斃死や重篤な奇形発生も問題となっている。こうした初期成長に生じる諸問題の解決は、大量種苗生産の早期実用化に不可欠である。ニホンウナギは重要な水産資源であるが、その資源量は大きく減少し、2014年には国際自然保護連合により絶滅危惧IB類に指定された。仔魚の健全な発育に最適な飼育環境が明らかとなり、人工シラスウナギ種苗の大量生産が実現できれば、天然資源への漁獲圧を大幅軽減でき、資源保全に繋がるものと期待される。

### 2. 研究の目的

ニホンウナギの種苗生産技術の開発では、実用化に向けた応用研究が進められている。しかし、現在の飼育条件下では多くの仔魚が異常遊泳や索餌・摂餌行動不全を示し、これらに起因する成長遅滞、変態不斉・遅延および奇形の多発が種苗量産化技術の確立の障壁となっている。仔魚を適切な行動に導くためには、諸感覚器官による外部環境の正確な受容が必須であるが、仔魚の感覚受容機構は不明である。そこで本研究では、ニホンウナギ仔魚の感覚器官に着眼し、その発達過程と機能の特性・健全性、変態の引き金機構について、機能形態学的アプローチを多角的に駆使して明らかにする。さらに、野外調査および飼育実験によって、本種の成育に重要な環境条件を探索する。これらの知見を基に、天然成育環境と人工飼育環境の両面からニホンウナギの飼育条件を最適化し、環境制御による新たな飼育プロトコルの策定を目指す。

### 3. 研究の方法

- (1) ニホンウナギ仔魚の味覚・嗅覚・視覚・側線感覚に関連する各外部感覚器官について、形態学・免疫組織化学・分子生物学的手法を用いて、発達過程および機能特性を調べる。
- (2) ニホンウナギ仔魚の耳石酸素安定同位体比の経験水温の指標としての有効性を飼育実験によって検証し、さらに東アジアの異なる成育場や時期に接岸するシラスウナギ稚魚の耳石酸素安定同位体比を分析して、初期生活史における水温条件を推定する。
- (3) 飼育実験および野外調査を行い、ニホンウナギ仔魚の発育と成長に最適な環境条件を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) 外部感覚器官の発達と機能の検討

味覚：ニホンウナギ仔魚の味覚器官の発達過程を調べたところ、味覚受容細胞マーカー *plcb2* 遺伝子陽性細胞の分布は、孵化後10日齢の仔魚において口唇の歯牙基部に確認され、発達に伴い下顎腹側部までその分布が拡大することがわかった。より簡便な味覚受容細胞検出系として5HTおよびCT抗体を用いた手法を検討したところ、当該分子の局在パターンは *plcb2* 陽性細胞の分布と対応していた。また、下顎腹側部に分布するCT陽性細胞は5HT陽性細胞を隣接してもたず、味蕾を形成しない *solitary chemosensory cells* (SCC) であることが示唆された。加えて、嗜好性味覚受容機構のマーカー分子抗体を作製し、CTとの対応を解析した結果、CT陽性細胞の頂端部に当該分子の局在が観察された(図1)。また、CT陽性細胞の分布は後期仔魚において咽頭部まで拡大することも示され、ニホンウナギ仔魚では個体発達に伴い、味覚受容特性も変化することが示唆された。味覚受容細胞の開口部形態の検討ともあわせて、ニホンウナギにおける味覚器官の形態学的評価法を確立することができた。

嗅覚：仔魚の嗅覚器官である鼻の外部形態の発達過程を検討したところ、孵化直後の仔魚では嗅上皮が完全に外環境に露出した状態で存在し、その状態は孵化後70日齢まで維持された。その後、100日齢までに鼻隔壁の発達が進行し、前鼻孔と後鼻孔が形成された。この結果からニホンウナギ仔魚は個体発達に伴い、方向性を含む嗅覚情報を獲得できるようになることが示唆された。一方、民間の種苗生産研究

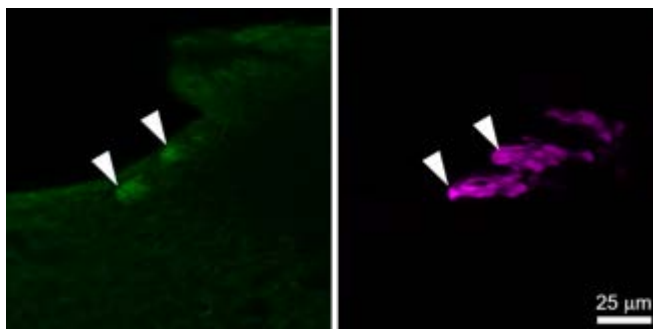


図1 ニホンウナギ仔魚の嗜好性味覚受容機構マーカー分子(左)と味覚受容細胞マーカーCT(右)の局在

所で現在使用されている飼料成分に対しては顕著な索餌行動を示さなかったことから、仔魚の嗅覚受容特性と本飼料成分の間にはミスマッチがあることが推察された。

視覚：ニホンウナギの産卵場のマリアナ西方海域における有人潜水艇しんかい 6500 を用いた照度実験では、水深に伴って著しく減衰する海水面（0 m）から水深 250 m の照度を計測し、海洋仔魚期の生息水深帯における光環境を調べた。

ニホンウナギ仔魚の視覚受容特性について検討するため、0.1 ルクス以下の低照度条件における行動観察系を用いて行動実験を行ったところ、仔魚は常に負の走光性を示すわけではなく、ある一定程度の照度を下回ると正の走光性を示した（図 2）。魚類の明暗順応機構として知られる網膜上皮における組織学的変化について検討したものの、光条件による変化は検出されず、仔魚期における明暗順応の存在は確認できなかった。

側線感覚：これまで不明であったニホンウナギの側線系（側線管、感覚孔、感丘配列および神経支配）について全体像を把握し（図 3）、側線管の袋状部位という特殊な部位・構造がウナギ目魚類に共通して存在する可能性が高いことを報告し、刺激増幅と抑制の機能に関する推測を行った。さらに、これまでウナギ目魚類では無いとされていた上側頭骨および後側頭骨が起源と推測される未知の骨要素を初報告し（図 4）、相同性に関する検討も行った。側線系の発達では、仔魚期終盤には黄ウナギと同様の感丘配列を既に備えていること、そしてシラスウナギ稚魚への変態前後に大部分の管器感丘の体内への潜行が速やかに生じて側線系の発達が短期間に進行することを明らかにした。これは、海洋仔魚期には海流感知（主に体表の感丘の働き）が重要であり、変態・着底後には餌生物の探索や天敵からの逃避（側線系では主に管器感丘が担う）が重要になることを考えると、整合的な結果といえる。また、天然個体と養殖個体の側線系を比較し、現時点では両者に有意な差がみられないことを確認した。一方、サケ科魚類では、継代飼育魚に受容器数の明瞭な減少が確認されていることから、ニホンウナギにおける完全養殖・選抜育種においても、継代飼育による側線系の変化とそれに伴う行動・生理的变化が生じる可能性については注意が必要であることが示唆された。

## (2) 海洋仔魚期における水温環境の推定

内部栄養から外部栄養に切り替わる発育初期における仔魚の最適水温を調べた飼育実験では、高水温区の仔魚ほど高い成長を示し、高水温区で生残率が最も高く、低温区では孵化後 12~16 日齢の外部栄養へ切り替わる時期に生残率が大きく減少した。実験開始直後は高水温区において仔魚は最も高い成長を示したが、その後は高水温区では活発な遊泳と索餌活動により代謝が大きく、孵化後約 1 ヶ月には 23~27°C でほぼ同様の体成長となった。また、飼育水温と耳石成長には正の相関が認められ、その関係式から孵化後約 1 ヶ月間の天然仔魚の平均経験水温を推定した。

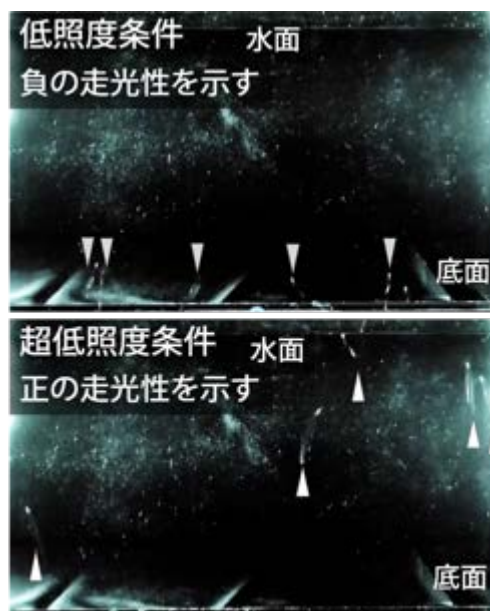


図 2 ニホンウナギ仔魚の走光性特性

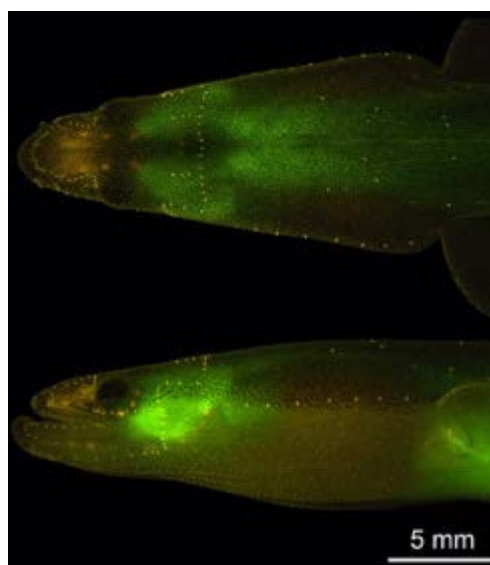


図 3 ニホンウナギの側線系、黄色の光点が DiAsp で染色された感丘（受容器）

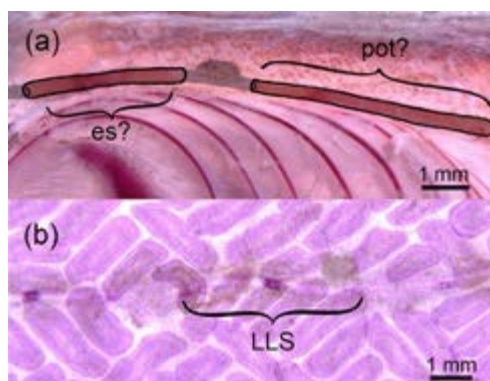


図 4 本研究で初報告となるニホンウナギの側頭部の未知の骨要素 (a) と体側鱗と側線鱗 (b). es? : 上側頭骨?, LLS : 側線鱗, pot? : 後側頭骨?



異なる水温環境条件で孵化後 6 日齢のニホンウナギ仔魚を 3 週間飼育し (図 5)、飼育水温と仔魚の耳石酸素安定同位体比の関係を調べたところ、水温と耳石酸素安定同位体比には有意な負の相関が認められ、ニホンウナギ仔魚の耳石酸素安定同位体比の値が経験水温推定の指標として有用であることが確認された。

海洋仔魚期に相当する耳石中心の核部分から縁辺部まで成長軸に沿って耳石酸素安定同位体比の点分析を行い、仔魚の成長に伴う経験水温の変化から海洋における生息環境について調べたところ、成長に伴って耳石酸素安定同位体比の値は上昇し、生息環境の水温は低下すると推定された。仔魚期における環境水温の低下は、体長の増大に伴って変化する仔魚の日周鉛直移動の水深を反映しており、さらに変態期以降の経験水温の低下には冬季の黒潮流域の低水温が影響しているものと考えられた。

また、日本の千葉、愛知、高知、鹿児島と台湾の宜蘭、淡水、屏東の計 7 地点に接岸したシラスウナギ稚魚の耳石酸素安定同位体比分析を行い、推定された生息水温環境から初期生活史における海洋環境を検討した。日本の個体群の耳石酸素安定同位体比は台湾の個体群と比べて高値を示した。このことから、シラスウナギの耳石酸素安定同位体比の値は、変態期以降に蓄積された耳石部位の影響が大きいことが示唆され、台湾の個体群は北赤道海流を離脱し早期に熱帯・亜熱帯の台湾に接岸するのに対し、日本の個体群はさらに北上して黒潮の低水温に晒され、高緯度の日本に接岸するものと考えられた。さらに、同一地点において接岸時期による水温環境の違いを調べたところ、晩期に接岸した個体の耳石酸素安定同位体比は、早期に接岸した個体より高値を示し、これは厳寒期の低水温を経験したことを反映しているものと推察された。

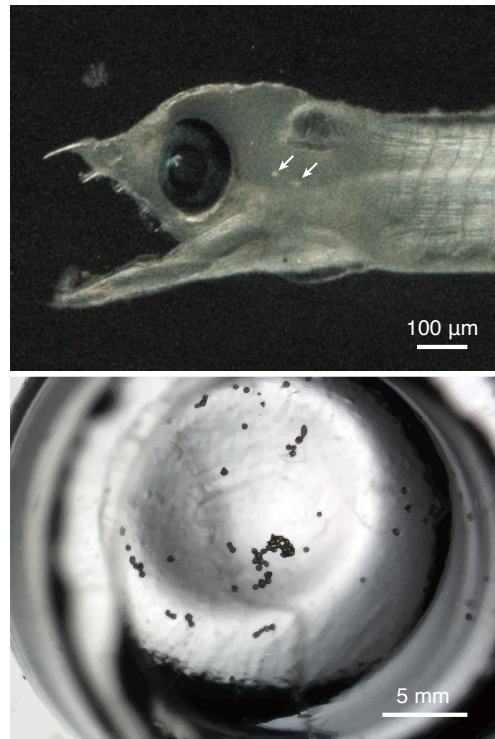


図 5 27 日齢のニホンウナギ仔魚の頭部拡大写真 (上) とマイクロシャーレの中の耳石 (下)。矢印は耳石の位置を示す

### (3) 野外調査と行動実験による好適環境条件の検討

ウナギ属魚類の複数種が同所的に分布する南西諸島の河川において生息環境の調査を実施したところ、ニホンウナギは本流に流入する砂底や礫底の農業用水路に多く出現したのに対し、主に熱帯域に分布するオオウナギは底質が岩や礫で富栄養化していない本流と支流で出現した。さらに、それぞれが生息する水温、水深、流速、濁度、底質等の観測値について主成分分析を行ったところ、同一水系内におけるウナギ属魚類の生息地の環境特性は、種によって大きく異なっていることが明らかとなった。

河川に接岸してまもないシラスウナギ稚魚の行動実験では、海水より淡水に対して嗜好性を示し、貧栄養の河水水より富栄養の農業用水に対して強い嗜好性を有することが明らかとなった (図 6)。接岸回遊生態の知見とあわせると、稚魚期の塩分や水質に対する嗜好性がその後の河川内分布に影響を与える可能性が考えられた。野外調査と行動実験の結果を総合すると、ニホンウナギの生息環境として水田や用水路等も好適な生息地であることが示唆され、こうした生息環境の維持と河口域からの連結性を確保することが本種の保全にとって重要と考えられた。

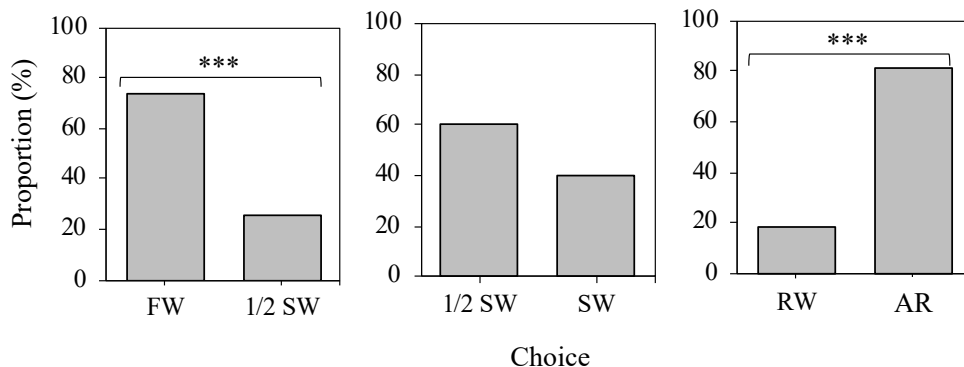


図 6 Y-maze 装置を用いた嗜好性行動実験において各実験区を選択したニホンウナギ稚魚の割合  
FW: 淡水, SW: 海水, RW: 河川水, AW: 農業用水

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 9件／うちオープンアクセス 2件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Nakae, M., Kuroki, M., Sato, M., Sasaki, K.  | 4. 巻<br>-             |
| 2. 論文標題<br>Functional significance of the lateral line system and its innervation in the Japanese eel <i>Anguilla japonica</i> (Teleostei: Elopomorpha: Anguillidae) | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Morphology  | 6. 最初と最後の頁<br>-       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/jmor.21353   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Kumai, K., Kuroki, M.  | 4. 巻<br>-             |
| 2. 論文標題<br>Salinity, freshwater, and agricultural water preferences of glass eels of the Japanese eel <i>Anguilla japonica</i> collected in southern Japan           | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Fish Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>-       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/jfb.14715  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Otake, T., Y. Amano, K. Shirai, N. Mochioka, T. Takahashi, S. Chow, H. Kurogi, D. Shouzeng, A. Yamaguchi, K. Tsukamoto                                     | 4. 巻<br>85            |
| 2. 論文標題<br>Evaluation from otolith Sr stable isotope ratios of possible juvenile growth areas of Japanese eels collected from the West Mariana Ridge spawning area   | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Fisheries Science  | 6. 最初と最後の頁<br>483-493 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s12562-019-01304-4   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>該当する          |
| 1. 著者名<br>Kuroki, M., Okamura, A., Yamada, Y., Hayasaka, S., Tsukamoto, K.   | 4. 巻<br>85            |
| 2. 論文標題<br>Evaluation of optimum temperature for the early larval growth of Japanese eel in captivity  | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Fisheries Science  | 6. 最初と最後の頁<br>801-809 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s12562-019-01317-z   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Shirai, K., Otake, T., Amano, Y., Kuroki, M., Ushikubo, T., Kita N.T., Murayama, M., Tsukamoto, K., Valley J.W. | 4. 巻<br>236           |
| 2. 論文標題<br>Temperature and depth distribution of Japanese eel eggs estimated using otolith oxygen stable isotopes         | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Geochimica et Cosmochimica Acta   | 6. 最初と最後の頁<br>373-283 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.gca.2018.03.006   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する          |

〔学会発表〕 計26件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>中江雅典, 黒木真理, 佐藤真央, 佐々木邦夫                     |
| 2. 発表標題<br>ニホンウナギ <i>Anguilla japonica</i> の側線系とその神経支配 |
| 3. 学会等名<br>日本魚類学会                                      |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>黒木真理, 早坂俊亮, 白井厚太郎            |
| 2. 発表標題<br>耳石酸素安定同位体比分析によるウナギ仔魚の水温環境の復元 |
| 3. 学会等名<br>日本魚類学会                       |
| 4. 発表年<br>2019年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>黒木真理, 岡村明浩, 山田祥朗, 早坂俊亮, 塚本勝巳 |
| 2. 発表標題<br>ニホンウナギ初期仔魚の最適水温の探索           |
| 3. 学会等名<br>日本水産学会                       |
| 4. 発表年<br>2019年                         |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>森島崇矢, 渡邊壯一                |
| 2. 発表標題<br>二ホンウナギ仔魚期成長に伴う味覚受容細胞の局在変化 |
| 3. 学会等名<br>東アジア鰻学会                   |
| 4. 発表年<br>2019年                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中江雅典, 黒木真理, 佐藤真央                         |
| 2. 発表標題<br>二ホンウナギ ( <i>Anguilla japonica</i> ) の側線系 |
| 3. 学会等名<br>日本水産学会                                   |
| 4. 発表年<br>2018年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>畔柳美月, 山田祥朗, 渡邊壯一                      |
| 2. 発表標題<br>人工二ホンウナギ仔魚の微小照明条件下での遊泳特性              |
| 3. 学会等名<br>東アジア鰻学会公開シンポジウム, うな井の未来 : 行政はウナギを救えるか |
| 4. 発表年<br>2018年                                  |

〔図書〕 計4件

|                        |                   |
|------------------------|-------------------|
| 1. 著者名<br>渡邊壯一         | 4. 発行年<br>2018年   |
| 2. 出版社<br>朝倉書店         | 5. 総ページ数<br>77-81 |
| 3. 書名<br>消化・吸収, ウナギの科学 |                   |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                             | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 渡邊 壮一<br><br>(WATANABE Soichi)<br><br>(20507884) | 東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授<br><br><br><br>(12601) |    |
| 研究分担者 | 中江 雅典<br><br>(NAKAE Masahiro)<br><br>(30462807)  | 独立行政法人国立科学博物館・動物研究部・研究主幹<br><br><br><br>(82617)   |    |
| 研究分担者 | 白井 厚太郎<br><br>(SHIRAI Kotaro)<br><br>(70463908)  | 東京大学・大気海洋研究所・准教授<br><br><br><br>(12601)           |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |