西部北太平洋で採集したウナギ目葉形仔魚の消化管内容物の観察

友田 努,^{1*} 張 成年,² 黒木洋明,³ 岡崎 誠,⁴ 安倍 大介,²
古板 博文,⁵ 松成 宏之,⁵ 長井 敏,² 横内 一樹,³ 澤山 周平,³
野村 和晴,⁵ 田中 秀樹,⁵ 須藤 竜介,⁵ 長谷川 大介,⁶ 稲葉 信晴²

(2017 年 4 月 13 日受付, 2017 年 8 月 21 日受理, 2017 年 12 月 1 日 J-STAGE 早期公開)

¹(国研)水産研究・教育機構増養殖研究所志布志庁舎, ²同 中央水産研究所横浜庁舎,

³同 中央水産研究所横須賀庁舎, ⁴同 国際水産資源研究所横浜庁舎,

⁵同 増養殖研究所南勢庁舎, ⁶同 東北水産研究所塩釜庁舎

Observations of gut contents of anguilliform leptocephali collected in the western North Pacific

TSUTOMU TOMODA,^{1*} SEINEN CHOW,² HIROAKI KUROI,³ MAKOTO OKAZAKI,⁴
DAISUKE AMBE,² HIROFUMI FURUITA,⁵ HIROYUKI MATSUNARI,⁵ SATOSHII NAGAI,²
KAZUKI YOKOUCHI,³ SHUHEI SAWAYAMA,³ KAZUHARU NOMURA,⁵ HIDEKI TANAKA,⁵
RYUUSUKE SUDOU,⁵ DAISUKE HASEGAWA⁶ AND NOBUHARU INABA²

¹Shibushi Laboratory, National Research Institute of Aquaculture, Japan Fisheries Research and Education Agency, Natsui, Kagoshima 899-7101, ²Yokohama Laboratory, National Research Institute of Fisheries Science, Japan Fisheries Research and Education Agency, Fukuura, Kanagawa 236-8648, ³Yokosuka Laboratory, National Research Institute of Fisheries Science, Japan Fisheries Research and Education Agency, Nagai, Kanagawa 238-0316, ⁴Yokohama Laboratory, National Research Institute of Far Seas Fisheries, Japan Fisheries Research and Education Agency, Fukuura, Kanagawa 236-8648, ⁵Nansei Station, National Research Institute of Aquaculture, Japan Fisheries Research and Education Agency, Nakatsuhamaura, Mie 516-0193, ⁶Shiogama Laboratory, Tohoku National Fisheries Research Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency, Shinhamacho, Miyagi 985-0001, Japan

The gut contents of anguilliform leptocephali collected by research cruises in the western North Pacific were examined in order to investigate their food sources. Gut contents of 26 leptocephali (Anguillidae, Congridae and Serrivomeridae) examined were amorphous food material containing many small spherical particles. Alcian Blue (AB)-stained aggregates containing spherical particles approximately 2–10 μm in diameter were observed in 14 leptocephali from the 2015 survey, and Coomassie Brilliant Blue (CBB)-stained aggregates containing spherical particles about 2 μm in diameter were observed in 12 leptocephali from the 2016 survey. Red autofluorescence of phytoplankton was exhibited in several sized cells in amorphous food material. Furthermore, polysaccharide-containing transparent exopolymer particles (TEP), proteinaceous Coomassie stainable particles (CSP), and pico/nano-planktonic particles about 2 μm in diameter were observed in environmental water samples. These results suggest that anguilliform leptocephali utilize phytoplankton-derived particulate organic matter (POM) as one of the food sources. Such feeding ecology makes it possible for anguilliform leptocephali to avoid food competition from predatory, zooplanktivorous and omnivorous fishes that have higher trophic positions in the oligotrophic ocean.

キーワード：ウナギ, 凝集物, 消化管内容物, 餌料, 多糖類, タンパク質, ピコ・ナノプランクトン, レプトセファルス

ニホンウナギ *Anguilla japonica* の安定供給に向けた種苗生産技術開発が長年にわたって行われ、国立研究開発法人水産研究・教育機構増養殖研究所を中心とした研究チームにより受精卵からシラスウナギまでの育成に成功した。¹⁾ しかしながら、ウナギ仔魚に与える飼餌料の性状（栄養組成、物性など）や飼育環境（温度、光条件など）が適正ではないため、極めて成長率や生残率が低く生産コストも莫大であり、未だ実用化には至っていない。^{2,3)} シラスウナギ量産化に向けて生産効率を高めるためには、調査航海で得られるウナギ目魚類における生態学的知見のフィードバックは重要である。しかし、ウナギ目魚類の自然界での繁殖生態や仔魚の餌料・生育環境には不明な点が多く、根本的な生態解明が求められている。特に、ウナギ目葉形仔魚（レプトセファルス）の食性には諸説があり、⁴⁻⁸⁾ 近年は動植物プランクトンの遺骸が主体となるマリンスノー⁹⁾などの懸濁態有機物（particulate organic matter：以下、POM）¹⁰⁾が有力な餌料源とされている。しかし、マリンスノーとは様々な起源をもつと考えられる大型のPOMについての一般的名称であり、¹¹⁻¹⁴⁾ 実際にレプトセファルスが摂食している物質の実態は依然として不明である。レプトセファルスが自然界で利用している餌料源が解明できれば、ウナギ種苗生産に重要な人工餌料の開発に資することが可能である。本研究では、水産庁漁業調査船開洋丸を用いて、2014年から2016年にニホンウナギ生態解明調査を行い、レプトセファルスおよび生息海域の海水試料を採取した。そして、レプトセファルスの消化管内容物と海水

試料を比較観察することによって、新規餌料開発のためのシーズを探索することを目的とした。

材料と方法

調査船および調査海域 本研究で用いた試料の採集は、水産庁漁業調査船開洋丸（2,630トン）による3調査航海（KY1404：2014年10月7日から11月25日，KY1504：2015年9月18日から11月9日，KY1604：2016年9月21日から11月11日）において、北緯9度から27度，東経124度30分から133度の範囲のフィリピン海において実施した（Fig. 1a, b）。

レプトセファルスの採集 レプトセファルス標本は、2調査航海（KY1504, KY1604）において、開口面積8.7 m²の10フィート型IKMT（Issac-Kid Mid-water Trawl）ネット（全長約13 m，目合0.5 mm）により採集した（Fig. 1a）。曳網は日没後から日出前の時間帯に行うことを原則とし，KY1504では深度300 mからの傾斜曳網および深度300-200 mからの1-2層階段曳網，KY1604では深度200-100 mからの1-2層階段曳網とした（Table 1）。対水船速2.0-2.5ノットを維持しながら投網を開始，ワープ繰り出し速度を0.2 m/sから徐々に0.6 m/sまで増速，ワープ長が200 m程度に達したら0.8 m/sまで増速して所定層付近まで繰り出した。ネット深度が所定層の10-20 m上に達したら，繰り出し速度をスローとし，所定層付近でウィンチを停止した。約1分待機の後，ワープのたるみをとるため0.5-0.6 m/sで巻き上げを開始し，ネットの上昇が確認され

Fig. 1 Survey area showing (a) the IKMT stations where leptocephali specimens were collected in 2015 and 2016, and (b) locations of the MS-net and submersible motor pump stations where marine snow-like material and seawater sampling were conducted between 2014 and 2016. Filled circles, shaded circles and open circles indicate the sampling stations in 2014 (KY1404 survey), 2015 (KY1504 survey) and 2016 (KY1604 survey), respectively.

Table 1 List of the collection data and total length (TL) of the leptocephali specimens in this study that contained visible objects in their intestines

Cruise*1	Sampling date	Net*2	Location	Local time	Family	Species	N	TL (mm)	Gut content*3
KY1504	26-Sep-2015	IKMT-300	09-58N, 130-59E	17:30	Serrivomeridae	<i>Serrivomer</i> sp.	1	70.5	AMP (Fig. 4a)
	29-Sep-2015	IKMT-300	16-01N, 130-57E	17:30	Congridae	<i>Ariosoma</i> sp.	1	96.8	AMP, ZPC, FP
	29-Sep-2015	IKMT-300	16-30N, 131-00E	21:25	Serrivomeridae	<i>Serrivomer</i> sp.	1	60.0	AMP
	30-Sep-2015	IKMT-300	18-02N, 131-01E	17:41	Congridae	<i>Conger</i> sp.	1	32.0	AMP, AN
	2-Oct-2015	IKMT-300	20-30N, 131-00E	22:07	Congridae	<i>Gnathophis</i> sp.	2	60.0-68.9	AMP
	2-Oct-2015	IKMT-300	20-30N, 131-00E	22:07	Congridae	<i>Conger</i> sp.	1	48.1	AMP (Fig. 4b)
	3-Oct-2015	IKMT-300	24-30N, 131-00E	21:58	Congridae	<i>Ariosoma</i> sp.	1	132.5	AMP (Fig. 4c)
	4-Oct-2015	IKMT-300	27-03N, 131-00E	17:41	Congridae	<i>Gnathophis</i> sp.	1	77.2	AMP (Fig. 4d)
	5-Oct-2015	IKMT-300	23-00N, 131-00E	17:50	Congridae	<i>Gnathophis</i> sp.	1	62.0	AMP
	7-Oct-2015	IK Step-300 (20 min at 60-64 m)	18-52N, 131-15E	17:46	Congridae	<i>Conger</i> sp.	1	41.8	AMP
	7-Oct-2015	IK Step-300 (20 min at 60-64 m)	18-52N, 131-15E	17:46	Anguillidae	<i>Anguilla marmorata</i>	2	47.7-51.6	AMP (Fig. 4e)
	9-Oct-2015	IK Step-200 (15 min at 110 m and 15 min at 50 m)	17-06N, 131-40E	17:31	Congridae	Congridae sp.	1	159.8	AMP (Fig. 4f)
KY1604	1-Oct-2016	IK Step-200 (10 min at 100 m)	14-00N, 132-00E	19:27	Anguillidae	<i>Anguilla marmorata</i>	3	14.3-25.0	AMP (Fig. 5a)
	2-Oct-2016	IK Step-200 (10 min at 100 m)	14-01N, 129-02E	19:25	Serrivomeridae	<i>Serrivomer</i> sp.	3	14.3-38.8	AMP (Fig. 5b)
	8-Oct-2016	IK Step-200 (10 min at 98 m)	21-30N, 132-53E	2:53	Congridae	<i>Gnathophis</i> sp.	3	51.5-70.8	AMP (Fig. 5c)
	1-Nov-2016	IK Step-100 (10 min at 68 m and 20 min at 59 m)	23-32N, 129-55E	18:38	Anguillidae	<i>Anguilla japonica</i>	2	47.4-48.8	AMP (Fig. 5d, e)
	6-Nov-2016	IK Step-125 (20 min at 65 m)	22-46N, 124-31E	19:32	Anguillidae	<i>Anguilla japonica</i>	1	55.5	AMP (Fig. 5f)

*1 Both research cruises were conducted by the R/V *Kaiyo Maru* of the Fisheries Agency of Japan.

*2 Collections were made using an Isaacs-Kidd Midwater trawl (IKMT) with an 8.7 m² mouth opening and 0.5 mm mesh.

IKMT-300, fished in oblique tows from a depth of 300 m to the surface.

IK Step-XXX, fished in oblique tows from a depth of XXX m to the surface with horizontal step towing at several different depths (several durations at each depth layer).

*3 AMP amorphous food material containing small spherical particles, ZPC zooplankton carcass, FP faecal pellets, AN appendicularian nauplii.

たら、巻き上げ速度を 0.1-0.3 m/s に減速した。傾斜曳網の場合はそのまま海面まで巻き上げ、階段曳網の場合は所定層で適宜ウィンチを停止させて水平曳きした。水温・深度はディプレッサーに取り付けた水温・深度レコーダー (SP2T 300, nke Instrumentation 社) で記録し、濾水量は開口部に塩ビケースで保護したフローメーター (No. 931, 4 針, 離合社) を取り付けて記録した。魚網監視装置用センサー (SS4-PVTL, SCANMAR 社: 以下, 深度センサー) および水温・深度レコーダーは CTD (911Plus, Sea-Bird Electronics 社) に取り付けてキャリブレーションを行った。

マリンスノー様物質の採集 本調査では、レプトセ

ファルスが利用しているとされる POM⁹⁻¹⁴⁾ を“マリンスノー様物質”と定義して、3 調査航海 (KY1404, KY1504, KY1604) において、その大量採集を試みた (Fig. 1b)。採集は、プランクトンネットとセジメントトラップの両機能を具備させることを想定した開口面積 1.0 m² のリング型ネット (リング直径 1.14 m, ネットの全長約 3.9 m, 目合 30 μ m, 5 L コッドエンド: 以下, MS ネット) を所定深度に一定時間据え置く方法により行った (Fig. 2)。コッドエンドには海水を満たし、シャックル付き脱落防止ネットでカバーして最下部に錘を取り付けた。この錘は、MS ネットを投入する際にコッドエンド開口部が常に上向きになり、かつネット内

Fig. 2 Schematic diagram and photographs of the Marine Snow sampler net (MS-net). A, The MS-net operation. The net is suspended at the specified water depth from R/V *Kaiyo maru* while drifting, and towed gently with differentials from surface water current. When pulling up the net, tension is applied to the short-circuit wire to prevent vertical towing; B, Structure of the MS-net. The MS-net is a 1.14-m diameter mouth-opening ring net with 30 μ m nylon mesh (3.9 m length), 5.1 m in total length, and a 5-L cod end bucket; C, Views of preparation and operation. a, the MS-net; b, 5-L cod end bucket; c, net-casting; d, net-hauling.

の空気が抜けやすくなるように沈降させるためのものである。また、MS ネット投入の際、網口に設置した 50 kg の錘をロープで引っ張っておくことで錘がネットに接触して破網することを防いだ。ネット揚収の際、所定深度層の上部水柱を鉛直曳きすることを防ぎ、かつテンション負荷による破網を防止するためのショートカットワイヤーを網口のリング上部に装備した。曳網深度は、2009 年 6 月の西マリアナ海嶺海域でのウナギ産卵場生態調査 (<http://www.fra.affrc.go.jp/bulletin/seika/211028.pdf>, 水産総合研究センター第 7 回成果発表会講演要旨, 2017 年 8 月 13 日) においてレプトセファルスが多く採集された深度帯のなかでも、マリンスノーの濃密分布が示唆された亜表層クロロフィル極大 (sub-surface chlorophyll maximum: 以下, SCM) の直下に

焦点を当て、KY1404 では深度 175 m 層, KY1504 では SCM より 10–65 m 下の深度 100–175 m の特定層を選定, KY1604 では深度 150 m 層を選定した (Table 2)。曳網には 3,000 m ウィンチを使用し、ネットに深度センサーを装着して深度をリアルタイムでモニターした。本船を停止した状態でネットを投入して線速 0.3 m/s で降下、ネット深度が所定層付近に達したらウィンチを停止した後、本船を表層でドリフトさせた状態でネットを維持した。すなわち、所定層の流れによってネットを吹き流し状態で維持することにより、マリンスノー様物質を濾し取ることを想定した。曳網開始から 45–60 分後に線速 0.2 m/s で巻き上げて、濃縮状態のマリンスノー様物質が入ったコッドエンドを回収した。

海水試料の採取 KY1604 では MS ネット曳網と同

Table 2 Proximate composition of marine snow-like material (MS) and seawater samples

Cruise ^{*1}	Sample	Sampling month	Protein	Amino acid	Sugar	Hexosamin	Lipid	Total
KY1404	MS ^{*2}	Oct 2014 (<i>n</i> =6)	2.0 (16.8)	2.2 (18.4)	1.3 (12.9)	4.6 (43.3)	0.9 (8.7)	10.9 (100.0)
KY1504	MS	Sep–Oct 2015 (<i>n</i> =9)	1.4 (10.6)	0.5 (4.5)	1.4 (13.7)	8.2 (68.6)	0.3 (2.7)	11.9 (100.0)
KY1604	MS	Oct 2016 (<i>n</i> =3)	0.9 (21.3)	1.8 (40.7)	0.8 (17.6)	0.6 (13.9)	0.3 (6.5)	4.3 (100.0)
KY1604	Seawater ^{*3}	Oct 2016 (<i>n</i> =3)	0.1 (7.4)	0.8 (44.7)	0.1 (6.1)	0.5 (31.0)	0.2 (10.9)	1.7 (100.0)

^{*1} All research cruises were conducted by the R/V *Kaiyo Maru* of the Fisheries Agency of Japan.

^{*2} Marine snow-like material (MS) was collected using the MS-net.

MS-net is a 1.14-m diameter mouth-opening ring net with 30 μ m nylon mesh (3.9 m length) and a 5-L cod end bucket.

KY1404: The research vessel was drifting for 45 or 60 min, and the net was towed horizontally at a depth of 175 m.

KY1504: The research vessel was drifting for 45 min, and the net was towed horizontally at depths of 100–175 m.

KY1604: The research vessel was drifting for 45 min, and the net was towed horizontally at a depth of 150 m.

^{*3} Seawater was pumped up from depths of 160–170 m using a submersible motor pump for deep wells.

Values are means of multiple specimens at all sampling stations of each cruise, unit: μ g/mL (%).

Fig. 3 Pumping-up system using a submersible motor pump for deep wells. a, insertion of the submersible motor pump into the deep well part; b, joint section of deep well and suction; c, end of suction; d, delivery valve of the submersible motor pump.

じ場所の深度 160–170 m 層から深井戸水中モータポンプ (32BOY761.0, 荏原製作所: 以下, 井戸ポンプ) を用いて海水試料の大量採取を行った (Fig. 1b)。井戸ポンプによる揚水システムは, 以下三つのパートで構成される。すなわち, 甲板側から順に井戸ポンプ, 深井戸およびサクシヨン管部分からなる (Fig. 3)。まず, 大口径カナラインホース (内径 $\phi 125$ mm $\times$ 20 m) を甲板上から海面下約 10 m まで垂下することで深井戸構造を形成し, 海底側の末端にはアルミニウム製異径継手を取り付けてサクシヨン管に接続可能にした。続いて, 中口径カナラインホース (内径 $\phi 38$ mm $\times$ 50 m) をポリプロピレン製カプラー・アダプターを介して 3 本接続することでサクシヨン管とし, 海底側末端の吸い込み口には大型生物などの異物混入を防ぐためのストレーナを取り付けた。最後に, 井戸ポンプを小口径カナラインホース

(内径 $\phi 32$ mm $\times$ 50 m) に接続し, 深井戸末端の異径継手部分まで挿入した。また, ポンプの過剰揚水による深井戸の渇水とポンプ空転を防止するため, 甲板上の小口径ホース先端にはバルブを取り付けて吐出水量を 20 L/min に調整した。深井戸とサクシヨン管の設置には 3,000 m ウィンチを使用し, ストレーナ部分には深度センサーを装着して深度をリアルタイムでモニターした。また, 採水深度を安定させるためにサクシヨン管を結束したワイヤーの先端には 80 kg の錘を取り付けた。深度センサーの表示深度が所定の採水深度に達した時点でワイヤーとホースの繰り出しを停止し, 井戸ポンプによる揚水を開始した。揚水の際に, 海水温の降下を確認しながらホース内に溜まった表層海水を 30 分間排出後に所定層の海水試料を採取した。

消化管内容物の観察 IKMT ネットの全採集物の中

からウナギ目レプトセファルスを抽出した。抽出した個体については、実体顕微鏡 (SZX9, OLYMPUS) で体型と色素胞を観察したのち、総筋節数 (TM) と最終垂直血管の筋節上位置 (LVBV) を計数して種査定を行った。¹⁵⁾ なお、ウナギ *Anguilla* 属と査定された個体については遺伝的種査定用に背部筋肉の一部を切り取り、 -60°C で冷凍保存し、後日、陸上施設で DNA 解析による種判別を行った。抽出した個体のうち消化管全体が内容物で充満し、肛門から容易に流れ出すような状態の個体を選別して、白金耳 (線径 $\phi 0.5\text{ mm}$, 穴内径 $\phi 1.5\text{ mm}$) で消化管を軽く圧迫しながら内容物を搾出した (Table 1)。その後、内容物の由来を特定するため、定法¹⁶⁾ に準じて Alcian blue 染色 (以下, AB 染色) および Coomassie Brilliant Blue 染色 (以下, CBB 染色) を行った。染色は、消化管内容物を約 3 倍量の滅菌海水で希釈したもの (以下, 希釈液) を準備し、 1.5 mL のマイクロチューブ (WATSON) 内で行った。希釈液と各染色液は約 1 : 1 の割合で混合した。20 分間染色後に写真撮影装置を装着した生物顕微鏡 (ECLIPSE Ci-L と DS-FI2, Nikon および BX43 と DP22, OLYMPUS) で観察した。

マリンスノー様物質と海水試料の処理 CMS ネット (改良型ノルパックネット)¹⁷⁾ の採集物を $351\text{ }\mu\text{m}$ メッシュで濾過したものや MS ネットの採集物を 300, 150, 90 および $53\text{ }\mu\text{m}$ のステンレス試験用ふるい (JIS Z8801, $\phi 150 \times 60\text{H}$, TOKYO SCREEN) を通して濾過したものには、レプトセファルスの針状幼虫に挟まったり、狭窄した咽頭部¹⁸⁾ が閉塞したりして摂食嚥下が不可能なもの、および摂食しても消化や排泄に支障をきたすサイズ・性状のコペポダ、放散虫、微細藻類などの棘状突起を持つ生物とそれら遺骸の一部である棘状の残渣が多く混在することが確認されている (張ら投稿中)。そこで、MS ネットで採集した濃縮状態のマリンスノー様物質は、上記ふるいに加えて $25\text{ }\mu\text{m}$ のステンレス試験用ふるいを通して濾過し、摂食嚥下や消化・排泄に支障を及ぼす生物とそれらの残渣を除去した。成分分析には、レプトセファルスが利用可能と考えられるサイズ・性状の POM を含む $25\text{ }\mu\text{m}$ 未満の濾過液画分を供した。なお、井戸ポンプで揚水した海水試料は濾過せずに後述の観察と成分分析に供した。

海水試料の観察 海水試料は、卓上マイクロ冷却遠心機 (Model 3520, KUBOTA) で遠心処理 ($10,000\text{ rpm} \times 15\text{ 分間}$) したのち、上・中層を除去し POM を多く含む底層画分を観察に供した。前述同様、POM の由来を特定するため、 1.5 mL のマイクロチューブ内で AB 染色および CBB 染色した。¹⁶⁾ 海水試料と各染色液は約 1 : 1 の割合で混合した。染色前にボルテックスミキサー (VORTEX GENIUS 3, IKA) で攪拌 ($2,500\text{ rpm}$

$\times 1\text{ 分間}$) した。20 分間染色後に写真撮影装置を装着した生物顕微鏡 (BX43 と DP22, OLYMPUS) で観察した。

マリンスノー様物質と海水試料の成分分析 濾過処理したマリンスノー様物質と無濾過の海水試料について一般成分の分析を行った。タンパク質は、試水にトリクロロ酢酸を加え、 $5,000\text{ rpm}$ で 5 分間遠心分離したのち、上清を取り除き水酸化ナトリウム溶液を加えて沈殿を溶解させた。その後、市販のタンパク質定量キット (Micro BCA protein assay kit, Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク質を定量した。アミノ酸は、試水にトリクロロ酢酸を加え遠心した上清を水酸化ナトリウムで中和したのち、トリニトロベンゼンスルホン酸法により定量した。¹⁹⁾ 炭水化物は、試水を塩酸により加水分解して中和したのち、MBTH 法²⁰⁾ により定量した。脂質の定量は以下のように行った。すなわち、試水に塩酸を加えて酸性に調整し、クロロホルム・メタノール混液を加えて攪拌・分離し、クロロホルム層を分別した。その後、再度クロロホルムにより 2 回脂質を抽出したのち、クロロホルムを蒸留水で洗浄した。クロロホルムを留去した脂質に硫酸を加え 200°C で 15 分加熱したのち、吸光度を測定し脂質を定量した。²¹⁾ アミノ糖 (ヘキソサミン) は、塩酸で加水分解して中和したのち、Tsuji *et al.*²²⁾ の方法により定量した。

結 果

消化管内容物 両年とも、いずれの観察個体の消化管においても、多数の微粒子を含む無定形の凝集物が内容物の大部分を占めており、動物プランクトンなどの形状や痕跡をとどめた物体はほとんど確認されなかった。2015 年に観察したノコバウナギ *Serrivomer* 属、ゴテンアナゴ *Ariosoma* 属、クロアナゴ *Conger* 属、ギンアナゴ *Gnathophis* 属、オオウナギ *Anguilla marmorata*、アナゴ Congridae 科の 6 種計 14 個体のすべての消化管には、粒径 $2\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$ と様々なサイズの微粒子と AB 染色される多糖類の凝集物が確認された (Table 1, Fig. 4)。また、2016 年に観察したオオウナギ、ノコバウナギ属、ギンアナゴ属、ニホンウナギの 4 種計 12 個体のすべての消化管には、粒径 $2\text{ }\mu\text{m}$ 前後の微粒子と CBB 染色されるタンパク質の凝集物が確認された (Table 1, Fig. 5)。これらの微粒子は、薄緑色を呈する球形または楕円球形であり、単細胞性のナノまたはピコプランクトン様のものであった。そこで、一部の採集個体について蛍光顕微鏡の G 励起フィルターおよび Texas Red フィルターで観察したところ、粒径 $2\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$ の植物プランクトンの赤色自家蛍光が確認された (Fig. 6)。また、2016 年の CBB 染色した観察標本には AB 染色では識別できなかった $1\text{ }\mu\text{m}$ 未満の微粒子が顕著に多く確認

Fig. 4 The gut contents of six species of anguilliform leptocephali collected by the IKMT between September and October 2015. Amorphous food material containing small spherical particles are stained with Alcian Blue. a, *Serriomer* sp. (70.5 mm TL); b, *Conger* sp. (48.1 mm TL); c, *Ariosoma* sp. (132.5 mm TL); d, *Gnathophis* sp. (77.2 mm TL); e, *Anguilla marmorata* (51.6 mm TL); f, Congridae sp. (159.8 mm TL). Scale bars are 10 μ m.

された。なお、2015年度に観察した14個体のうちの2個体の消化管内には、微小動物プランクトン幼生の遺骸（甲殻長45 μ m）と糞粒（幅25×長さ42 μ m）がそれぞれ1個（9月29日、ゴテンアナゴ属）、および尾虫類のオタマジャクシ型幼生（体長80 μ m）1個体（9月30日、クロアナゴ属）が凝集物に混在していた（Table 1）。

海水試料 深度150–170 mから得られた海水試料には、AB染色される透明細胞外重合体粒子（transparent exopolymer particle：以下、TEP）^{23,24}）とCBB染色されるタンパク質粒子（Coomassie stainable particles：以下、CSP）¹⁶）の凝集物と粒径2 μ m前後の微粒子が大量に混在しているのが確認された（Fig. 7）。CSPは、粘着性を有するTEPとはやや異なり、流動性を有するコロイド状を呈しており、TEPよりも存在量が顕著に多いように見受けられた。前述同様、微粒子は薄緑色を呈する球形または楕円球形のピコプランクトン様のものであり、なかには1 μ m未満のものも多く確認された。

マリンスノー様物質と海水試料の分析値 採集年と採

集点により分析値は異なるものの、生息海域の環境水中には糖類とタンパク質が高い割合で含まれていた（Table 2）。2014, 2015年に採集したマリンスノー様物質は有機物量が10.9–11.9 μ g/mLであり、共通してヘキサミンが43.6–68.6%と最も高い割合を示した。一方、2016年にニホンウナギレプトセファルスが大量採集されたステーション周辺（Fig. 1b）では有機物量が2014, 2015年より低かったものの（1.7–4.3 μ g/mL）、マリンスノー様物質および海水試料ともにアミノ酸が40.7–44.7%と最も高い割合を示した。特に、海水試料ではアミノ酸とヘキサミンを合わせると75.7%と非常に高い割合を占めていた。

考 察

本調査結果は、ウナギ目レプトセファルスが外洋に広く存在する植物プランクトン由来のPOMを餌料源のひとつとして利用していることを示唆しており、自然界での食性に関する既往知見^{4–10}）を補強するものと考えられ

Fig. 5 The gut contents of four species of anguilliform leptocephali collected by the IKMT between October and November 2016. Amorphous food material containing small spherical particles are stained with Coomassie Brilliant Blue. a, *Anguilla marmorata* (25.0 mm TL); b, *Serrivomer* sp. (38.8 mm TL); c, *Gnathophis* sp. (51.5 mm TL). Scale bars are 10 μ m. d, *Anguilla japonica*. 1 (48.8 mm TL); e, *Anguilla japonica*. 2 (47.4 mm TL); f, *Anguilla japonica*. 3 (55.5 mm TL). Scale bars are 50 μ m.

る。また、本結果はウナギ種苗生産の実用化に向けた餌料開発を進める上でも重要な情報を含んでいると考える。2009年5月のウナギ産卵場生態調査で採集されたプレレプトセファルス (<http://www.fra.affrc.go.jp/bulletin/seika/211028.pdf>, 水産総合研究センター第7回成果発表会講演要旨, 2017年8月13日) においても、本調査結果と同様に流動性を有する凝集物が消化管の大部分を占める個体が確認されている(黒木ら, 未発表)。このような無定形の凝集物は、特異な針状幼歯を持ち咽頭部が狭窄したレプトセファルス¹⁸⁾にとって摂食嚥下および消化吸収²⁵⁻²⁷⁾しやすいものなのかもしれない。

マリンスノーの起源物質のひとつとされる TEP の生成メカニズムには、溶存態有機物 (dissolved organic matter: 以下, DOM) が重合する非生物的生成や細菌による生成も確認されているが、基本的には植物プランクトン由来の酸性多糖類から生成されると考えられている。^{23,24)} また、外洋に広く存在する窒素固定性シアノバクテリア *Crocospheera watsonii*²⁸⁾ や *Synechococcus*

bacillaris,¹⁶⁾ *Prochlorococcus marinus*²⁹⁾ および真核性ピコ植物プランクトン *Micromonas pusilla*³⁰⁾ も細胞外多糖 (extracellular polysaccharides, EPS) や TEP を多量に産生することが知られる。一方、多糖類の一種であるグリコサミノグリカン (以下, GAG) はレプトセファルスの重要な体構成成分のひとつであり,³¹⁾ GAG の構成糖であるウロン酸とアミノ糖は成長とともに相対的に増加する。³²⁾ このため、本調査では消化管内容物を搾出する際にこれら多糖類が多少なりとも混入した可能性も否めないが、全観察個体において染色された内容物のすべてが魚体由来のものであるとは考えにくい。さらに、採集したマリンスノー様物質から TEP に由来すると考えられるヘキサミンが 50% 前後という高い割合で検出され (Table 2), かつ海水試料にも多糖類が確認されている (Fig. 7)。これらのことから、AB 染色された消化管内容物は環境水中に存在する TEP の凝集物に由来している可能性が高い。一方、マリンスノーなどの POM や DOM の構成要素には、単糖類 (ガラクトース, グル

Fig. 6 The gut contents of two species of anguilliform leptocephali observed using an epifluorescence microscope with excitation filter. Red autofluorescence of phytoplankton was exhibited in several sized cells in amorphous food material. a, *Anguilla japonica* (52.8 mm TL). Scale bar is 10 μ m ($\times 1000$, G-excitation filter); b, *Ariosoma* sp. 1 (83.5 mm TL). Scale bar is 10 μ m ($\times 400$, Texas Red filter). Gut contents of two *Ariosoma* sp. under bright-field (c, e) and fluorescence observation (d, f; $\times 400$, Texas Red filter). Arrow indicates the same cell. c, d, dispersed picoplanktonic cells in *Ariosoma* sp. 2 (97.8 mm TL); e, f, aggregate of many picoplanktonic cells in *Ariosoma* sp. 3 (152.0 mm TL). Scale bars are 10 μ m ($\times 400$).

コース, フコース)³³⁾やアミノ糖 (グルコサミン, ガラクトサミン)・ペプチドグリカン³⁴⁾が含まれることが知られる。すなわち, 低分子のグルコースやマルトース (二糖類) や *N*-アセチルグルコサミンを人工飼料に添加した際のニホンウナギの飼育成績向上³⁵⁾は, 天然餌料の成分組成と自然界におけるレプトセファルス³⁶⁾の栄養要求を示唆している。

レプトセファルスが利用しているとされるマリンスノーは, TEP^{23,24)}や尾虫類の放棄ハウス⁵⁾などを基質として細菌, 原生動物, 動植物プランクトンの遺骸, 糞粒, サブミクロン粒子など様々な粒子が複雑に絡まっているものと推察されている。^{4,8,9,11-14,36)}近年は, ある種の海洋細菌がゲル状粒子の凝集を促進し, マリンスノーなどの大型の POM を形成することも報告されている。³⁷⁾本調査で観察したレプトセファルス 26 個体のうち, 尾虫類の幼生や動物プランクトンの遺骸・糞粒などの形状や痕跡をとどめた物体を摂取していたのは 2 個

体のみであり, 尾虫類の放棄ハウスは全く確認されなかった (Table 1)。いずれの個体の消化管内容物とも, 大部分が多数の植物プランクトン様粒子を含む無定形の凝集物であった (Figs. 4, 5)。尾虫類の放棄ハウスがレプトセファルスの主要な餌である可能性が指摘されているものの,⁵⁾ハウスの構成成分はセルロースやタンパク質であり, 酸性ムコ多糖類を特異的に染色する Alcian blue (AB) には TEP ほど顕著には染まらないことから, 本研究で TEP に由来すると考えた凝集物に放棄ハウス, あるいはその断片が含まれた可能性は低いものと考えられる。一方, 消化管内容物の 18S rRNA メタゲノム解析結果では多様な生物が検出されており,⁶⁾これらの遺骸や糞粒が TEP に吸着し, 細菌により視認できない程度にまで分解され, 沈降していく過程でレプトセファルスに利用されていることも考えられる。ウナギレプトセファルスの消化管はタンパク質の消化能やアミノ酸の吸収能は高いものの, ムコ多糖類や脂質の消化能は

Fig. 7 The polysaccharide-containing transparent exopolymer particles (TEP) in water mass, where leptocephali were collected in 2016, stained with Alcian Blue (a, St. 1P1; b, St. 1P2; c, St. 1P3), and the protein-containing Coomassie stainable particles (CSP) in the same water samples (d, St. 1P1; e, St. 1P2; f, St. 1P3). Many small spherical particles are clearly visible after CBB staining. Scale bars are 20 μm .

低いと推測されている。²⁵⁻²⁷⁾ これらのことから、マリンスノーの構成要素とされる TEP は栄養源そのものではなく、種々栄養素の担体としての役目を担っているものと理解できよう。

本調査で観察したウナギ目レプトセファルスの消化管内に確認された多数の微粒子と無定形の凝集物は、Miller *et al.*⁸⁾ がホラアナゴ *Synphobranchinae* 亜科で観察したものと非常に似通っていた (Figs. 4, 5)。本調査海域における環境水とレプトセファルスの消化管内には、これら微粒子と同等サイズのナノおよびピコ植物プランクトン³⁸⁾ (*Micromonas pusilla*, *Mantoniella squamata*, *Nannochloropsis* sp. など) が種々存在しており (長井ら未発表)、今回の調査においても属・種は未確認であるものの、消化管内容物に植物プランクトンの赤色自家蛍光を確認した (Fig. 6)。我々の飼育研究³⁹⁾ において確認された知見、すなわち、飼育水に微細藻類を添加した際の藻体・TEP の摂取と添加濃度に伴う摂取個体率と消化管充満度の上昇は、自然界におけるレプトセ

ファルスの食性を反映しているようで非常に興味深い。また、環境水中に TEP などの多糖類と CSP などのタンパク質粒子が存在していたことは既往知見^{16,40,41)} から支持されるものであり、これらの物質がレプトセファルスの消化管内容物に反映されていることも考えられる。特に、海水試料中のタンパク質粒子の凝集物は、CBB 染色したシアノバクテリアの凝集物¹⁶⁾ やレプトセファルスの消化管内容物とも近似していたことから (Figs. 5, 7)、これまで見落とされていた餌料要素である可能性がある。TEP はこれらタンパク質粒子の担体と考えられ、栄養分を含んだ POM がレプトセファルスの餌料源のひとつではないかと推測される。

ピコプランクトン⁴²⁾ の一種であるシアノバクテリアのシネココッカス *Synechococcus* 属とプロクロロコッカス *Prochlorococcus* 属は外洋域における一次生産に多大に寄与しており、なかでもプロクロロコッカスは地球上で最大のバイオマスを占めると言われる。⁴³⁻⁴⁵⁾ これらの細胞膜はタンパク質で覆われており、⁴⁶⁾ 低分子化合物で

構成される細胞外滲出物 (extracellular exudates)⁴⁷⁾ や脂質, タンパク質, 核酸などの栄養分を多く含む細胞外小胞 (extracellular vesicles)^{48,49)} およびアミノ糖³⁴⁾ を放出している。また, 海水中にはタンパク質を豊富に含んだ大量の無定形粒子が TEP と混在していることが知られる。^{16,40,41)} これらを総合的に勘案すると, 本調査で観察したレプトセファルスの消化管内容物や海水試料中の微粒子はピコプランクトンの性状と多くの点で符合しており, 天然餌料の構成要素である可能性が高い。レプトセファルスの成長に伴う負の走光性⁵⁰⁾ と体比重⁵¹⁾ の変化および日周鉛直移動⁵²⁾ が, 産卵海域から黒潮に至る輸送戦略や捕食回避⁵³⁾ のためのみならず摂餌生態にも密接に関連していると仮定すると, ピコ・ナノプランクトンの濃密な SCM を昼夜にかけて通過する過程で前述の有機物を海水とともに摂取する⁵⁴⁾ ことにより, 効率的に栄養を摂取している可能性も考えられる。このような一次生産に伴う炭素・窒素循環が, 外洋域の微生物環¹²⁾ のみならず動物プランクトンに近い低次栄養段階⁹⁾ にあるレプトセファルスの初期生活史⁵⁵⁾ を支えているのかもしれない。すなわち, 貧栄養海域においても, このような摂餌生態であれば, より高い栄養段階の捕食性 (肉食性), 動物プランクトン食性および雑食性の魚種と餌を競合することがない。今後, これらの仮説を検証するため, レプトセファルス生息海域の深度帯別 POM と消化管内容物について原核生物の 16S rRNA 系統解析やメタボローム解析を行うことにより, 天然餌料の構成要素と成分を特定していく必要がある。

謝 辞

本調査の実施にあたり, 水産庁増殖推進部漁場資源課をはじめ寺田 靖船長, 戸石清二船長, 須田清行船長ならびに開洋丸乗組員のみなさまには多大なるご援助をいただいた。また, 本研究推進にあたり, 格段のご配慮をいただいた増養殖研究所ウナギ種苗量産研究センターの桑田 博センター長, 嶋志田正晃量産実証グループ長, 谷田部誉史技術員ならびに鈴木重則主任研究員に厚くお礼申し上げる。増養殖研究所上浦庁舎の山口寿哉博士と西岡豊弘博士には蛍光顕微鏡観察にご便宜をいただいた。瀬戸内海区水産研究所業務推進部長の日向野純也博士には, 終始熱心なご指導とご鞭撻をいただいた。ここに記して深甚なる謝意を表する。さらに, 本稿のご校閲を賜った匿名の査読者の方々ならびに担当編集委員には多くのご助言をいただいた。心から感謝申し上げます。本研究は水産研究・教育機構交付金プロジェクト研究「ニホンウナギの来遊予測に関する研究開発」の一環として実施され, また, 農林水産技術会議委託プロジェクト研究「天然資源に依存しない持続的な養殖生産技術の開発」および農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊

急展開事業 (うち先導プロジェクト)」の支援を受けた。

文 献

- 1) Tanaka H, Kagawa H, Ohta H, Unuma T, Nomura K. The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiol. Biochem.* 2003; **28**: 493–497.
- 2) Masuda Y, Imaizumi H, Oda K, Hashimoto H, Usuki H, Teruya K. Artificial completion of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, life cycle: challenge to mass production. *Bull. Fish. Res. Agen.* 2012; No. 35: 111–117.
- 3) Tanaka H. Progression in artificial seedling production of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.* 2014; **81**: 11–19.
- 4) Otake T, Nogami K, Maruyama K. Dissolved and particulate organic matter as possible food sources for eel leptocephali. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1993; **92**: 27–34.
- 5) Mochioka N, Iwamizu M. Diet of anguillid larvae: leptocephali feed selectively on larvacean houses and fecal pellets. *Mar. Biol.* 1996; **125**: 447–452.
- 6) Riemann L, Alfredsson H, Hansen MM, Als TD, Nielsen TG, Munk P, Aarestrup K, Maes GE, Sparholt H, Petersen MI, Bachler M, Castonguay M. Qualitative assessment of the diet of European eel larvae in the Sargasso Sea resolved by DNA barcoding. *Biol. Lett.* 2010; **6**: 819–822.
- 7) Terahara T, Chow S, Kurogi H, Lee S-H, Tsukamoto K, Mochioka N, Tanaka H, Takeyama H. Efficiency of peptide nucleic acid-directed PCR clamping and its application in the investigation of natural diets of the Japanese eel leptocephali. *PLoS ONE* 2011; **6**: e25715.
- 8) Miller MJ, Otake T, Aoyama J, Wouthuyzen S, Suharti S, Sugeha HY, Tsukamoto K. Observations of gut contents of leptocephali in the North Equatorial Current and Tomini Bay, Indonesia. *Coast. Mar. Sci.* 2011; **35**: 277–288.
- 9) Miller MJ, Chikaraishi Y, Ogawa NO, Yamada Y, Tsukamoto K, Ohkouchi N. A low trophic position of Japanese eel larvae indicates feeding on marine snow. *Biol. Lett.* 2013; **9**: 20120826.
- 10) Feunteun E, Miller MJ, Carpentier A, Aoyama J, Dupuy C, Kuroki M, Pagano M, Reveillac E, Sello D, Watanabe S, Tsukamoto K, Otake T. Stable isotopic composition of anguilliform leptocephali and other food web components from west of the Mascarene Plateau. *Prog. Oceanogr.* 2015; **137**: 69–83.
- 11) Alldredge AL, Silver MW. Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Prog. Oceanogr.* 1988; **20**: 41–82. doi: 10.1016/0079-6611(88)90053-5.
- 12) Azam F. Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens. *Science* 1998; **280**: 694–696.
- 13) Kjørboe T. Colonization of marine snow aggregates by invertebrate zooplankton: abundance, scaling, and possible role. *Limnol. Oceanogr.* 2000; **45**: 479–484. doi: 10.4319/lo.2000.45.2.0479.
- 14) Kjørboe T. Marine snow microbial communities: scaling of abundances with aggregate size. *Aquat. Microb. Ecol.* 2003; **33**: 67–75.
- 15) 多田田修, 望岡典隆. 葉形仔魚 (カライワシ目, ウナギ目, ソコギス目). 「日本産稚魚図鑑」(沖山宗雄編) 東海大学出版会, 東京. 1988; 15–64.
- 16) Cisternas-Novoa C, Lee C, Engel A. Transparent exopolymer particles (TEP) and Coomassie stainable particles (CSP): Differences between their origin and vertical

- distributions in the ocean. *Mar. Chem.* 2015; **175**: 56–71.
- 17) Itoh H, Mochioka N. Plankton net designs for sampling mesoplankton in coastal waters. *Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.* 2005; **60**: 179–186. (in Japanese with English abstract).
 - 18) Yoshimatsu T. Early development of preleptocephalus larvae of the Japanese eel in captivity with special reference to the organs for larval feeding. *The Bulletin of the Graduate School of Bioresources Mie University* 2011; **37**: 11–18.
 - 19) Hazra AK, Chock SP, Albers RW. Protein determination with trinitrobenzene sulfonate: A method relatively independent of amino acid composition. *Anal. Biochem.* 1984; **137**: 437–443.
 - 20) Johnson KM, Burney CM, Sieburth JM. Doubling the production and precision of the MBTH spectrophotometric assay for dissolved carbohydrates in seawater. *Mar. Chem.* 1981; **10**: 467–473.
 - 21) Holland DL, Gabbott PA. A Micro-Analytical Scheme for the Determination of protein, carbohydrate, lipid and RNA levels in marine invertebrate larvae. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 1971; **51**: 659–668.
 - 22) Tsuji A, Kinoshita T, Hoshino M. Analytical chemical studies on amino sugars. II. Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Chem. Pharm. Bull.* 1969; **17**: 1505–1510.
 - 23) Passow U. Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. *Prog. Oceanogr.* 2002; **55**: 287–333.
 - 24) Verdugo P, Alldredge AL, Azam F, Kirchman D, Passow U, Santschi P. The oceanic gel phase: a bridge in the DOM–POM continuum. *Mar. Chem.* 2004; **92**: 67–85.
 - 25) Pedersen BH, Ueberschar B, Kurokawa T. Digestive response and rates of growth in pre-leptocephalus larvae of the Japanese eel *Anguilla japonica* reared on artificial diets. *Aquaculture* 2003; **215**: 321–338.
 - 26) Kurokawa T, Suzuki T. Developmental process of digestive system in Japanese eel larvae. *Bull. Fish. Res. Agen.* 2006; **suppl. 5**: 57–61. (in Japanese with English abstract).
 - 27) Hsu HY, Chen SH, Cha YR, Tsukamoto K, Lin CY, Han YS. *De novo* assembly of the whole transcriptome of the wild embryo, preleptocephalus, leptocephalus, and glass eel of *Anguilla japonica* and deciphering the digestive and absorptive capacities during early development. *PLoS ONE* 2015; **10**: e0139105.
 - 28) Sohm JA, Edwards BR, Wilson BG, Webb EA. Constitutive extracellular polysaccharide (EPS) production by specific isolates of *Crocospheera watsonii*. *Front. Microbiol.* 2011; **2**: Article 229. doi: 10.3389/fmicb.2011.00229.
 - 29) Iuculano F, Mazuecos IP, Reche I, Agusti S. *Prochlorococcus* as a possible source for transparent exopolymer particles (TEP). *Front. Microbiol.* 2017; **8**: Article 709. doi: 10.3389/fmicb.2017.00709.
 - 30) Lonborg C, Middelboe M, Brussaard CPD. Viral lysis of *Micromonas pusilla*: impacts on dissolved organic matter production and composition. *Biogeochemistry* 2013; **116**: 231–240.
 - 31) Kawakami Y, Nomura K, Tanaka H. Growth promoting effect of hyaluronan synthesis promoting substances on Japanese eel leptocephali. *PLoS ONE* 2014; **9**: e98688.
 - 32) Tanaka H, Nomura K, Yamamoto T, Oku H. Development of artificial diets and rearing systems for eel larvae—The first success of production of glass eel in captivity—*Bull. Fish. Res. Agen.* 2006; **suppl. 5**: 63–69. (in Japanese with English abstract).
 - 33) Skoog A, Alldredge AL, Passow U, Dunne J, Murray J. Neutral aldoses as source indicators for marine snow. *Mar. Chem.* 2008; **108**: 195–206.
 - 34) Benner R, Kaiser K. Abundance of amino sugars and peptidoglycan in marine particulate and dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* 2003; **48**: 118–128.
 - 35) Okamura A, Horie N, Mikawa N, Yamada Y, Tsukamoto K. Recent advances in artificial production of glass eels for conservation of anguillid eel populations. *Ecol. Freshw. Fish* 2014; **23**: 95–110.
 - 36) Koike I, Hara S, Terauchi K, Kogure K. Role of sub-micrometre particles in the ocean. *Nature* 1990; **345**: 242–244.
 - 37) Yamada Y, Fukuda H, Tada Y, Kogure K, Nagata T. Bacterial enhancement of gel particle coagulation in seawater. *Aquat. Microb. Ecol.* 2016; **77**: 11–22. doi: 10.3354/ame01784.
 - 38) Buitenhuis ET, Li WKW, Vaulot D, Lomas MW, Landry MR, Partensky F, Karl DM, Ulloa O, Campbell L, Jacquet S, Lantoin F, Chavez F, Macias D, Gosselin M, McManus GB. Picophytoplankton biomass distribution in the global ocean. *Earth. Syst. Sci. Data.* 2012; **4**: 37–46. doi: 10.5194/essd-4-37-2012.
 - 39) Tomoda T, Kurogi H, Okauchi M, Kamoshida M, Imaizumi H, Jinbo T, Nomura K, Furuita H, Tanaka H. Hatchery-reared Japanese eel *Anguilla japonica* larvae ingest various organic matters formed part of marine snow. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2015; **81**: 715–721 (in Japanese with English abstract).
 - 40) Long RA, Azam F. Abundant protein-containing particles in the sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 1996; **10**: 213–221.
 - 41) Tanoue E, Ishii M, Midorikawa T. Discrete dissolved and particulate proteins in oceanic waters. *Limnol. Oceanogr.* 1996; **41**: 1334–1343.
 - 42) Zeidner G, Preston CM, Delong EF, Massana R, Post AF, Scanlan DJ, Béjà O. Molecular diversity among marine picophytoplankton as revealed by psbA analyses. *Environ. Microbiol.* 2003; **5**: 212–216.
 - 43) Falkowski P. The power of plankton. *Nature* 2012; **483**: S17–20.
 - 44) Liu H, Nolla HA, Campbell L. *Prochlorococcus* growth rate and contribution to primary production in the equatorial and subtropical North Pacific Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* 1997; **12**: 39–47.
 - 45) Flombaum P, Gallegos JL, Gordillo RA, Rincón J, Zabala LL, Jiao N, Karl DM, Li WKW, Lomas MW, Veneziano D, Vera CS, Vrugt JA, Martiny AC. Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013; **110**: 9824–9829.
 - 46) Strom S, Bright K, Fredrickson K, Brahamsha B. The *Synechococcus* cell surface protein SwmA increases vulnerability to predation by flagellates and ciliates. *Limnol. Oceanogr.* 2016; doi: 10.1002/lno.10460.
 - 47) Seymour JR, Ahmed T, Durham WM, Stocker R. Chemotactic response of marine bacteria to the extracellular products of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*. *Aquat. Microb. Ecol.* 2010; **59**: 161–168.
 - 48) Biller SJ, Schubotz F, Roggensack SE, Thompson AW, Summons RE, Chisholm SW. Bacterial Vesicles in Marine Ecosystems. *Science* 2014; **343**: 183–186.

- 49) Scanlan DJ. Bacterial Vesicles in the Ocean. *Science* 2014; **343**: 143–144.
- 50) Yamada Y, Okamura A, Mikawa N, Utoh T, Horie N, Tanaka S, Miller MJ, Tsukamoto K. Ontogenetic changes in phototactic behavior during metamorphosis of artificially reared Japanese eel *Anguilla japonica* larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2009; **379**: 241–251.
- 51) Tsukamoto K, Yamada Y, Okamura A, Kaneko T, Tanaka H, Miller MJ, Horie N, Mikawa N, Utoh T, Tanaka S. Positive buoyancy in eel leptocephali: an adaptation for life in the ocean surface layer. *Mar. Biol.* 2009; **156**: 835–846.
- 52) Kudo K. Genetic algorithm for vertical migration strategy of Japanese eel. *JAMSTECR* 2001; **43**: 133–141. (in Japanese with English abstract).
- 53) Miller MJ, Dubosc J, Vourey E, Tsukamoto K, Allain V. Low occurrence rates of ubiquitously present leptocephalus larvae in the stomach contents of predatory fish. *ICES J. Mar. Sci.* 2015; **72**: 1359–1369.
- 54) Ahn H, Lee KM, Inokuchi M, Watanabe S, Okamura A, Tsukamoto K, Kaneko T. Observations of initial water ingestion and ion absorption in the digestive tract of Japanese eel larvae. *Fish. Sci.* 2015; **81**: 283–290.
- 55) Miller MJ. Ecology of Anguilliform Leptocephali: Remarkable Transparent Fish Larvae of the Ocean Surface Layer. *Aqua-BioSci. Monogr.* 2009; **2**(4): 1–94. doi:10.5047/absm.2009.00204.0001.