

戦略的プロジェクト研究推進事業

「持続可能な養殖・漁業生産技術の開発」

平成28年度 最終年度報告書

中課題番号	11105379
中課題名	シラスウナギの安定生産技術の開発

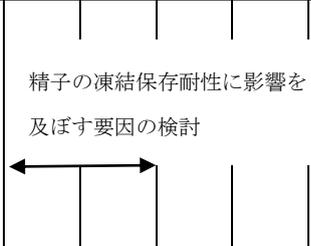
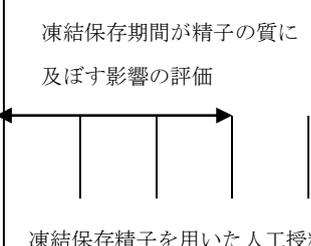
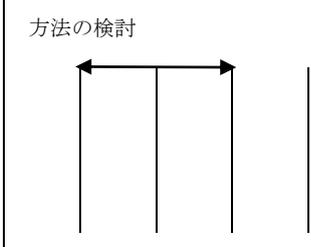
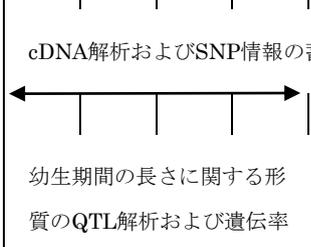
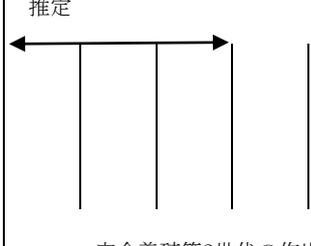
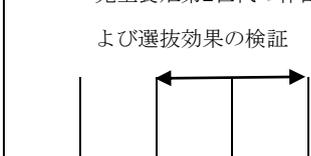
研究実施期間	平成24年度～平成28年度（5年間）
代表機関	国立研究開発法人 水産研究・教育機構 増養殖研究所
研究開発責任者	田中 秀樹
研究開発責任者 連絡先	TEL : 0596-66-1830
	FAX : 0596-66-1962
共同研究機関	国立研究開発法人 水産研究・教育機構 （増養殖研究所、中央水産研究所、西海区水産研究所）
	静岡県水産技術研究所 浜名湖分場
	近畿大学農学部
	慶應義塾大学 自然科学教育研究センター
普及・実用化 支援組織	

農林水産省内 本事業担当	農林水産技術会議事務局研究開発官（基礎・基盤、環境）室 代表：03-3502-8111（内線5870）
-----------------	--

<別紙様式3. 平成28年度の最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室		
	24	25	26	27	28	機関	研究室	
1. ウナギにおける催熟技術の高度化 (1) ウナギ成熟誘導ホルモン等を利用した人為催熟技術の高度化								
						増養殖研究所	育種研究センター	
						増養殖研究所	育種研究センター 自然科学教育研究センター 浜名湖分場	
						増養殖研究所 慶應義塾大学 静岡県水産技術研究所	育種研究センター 自然科学教育研究センター 浜名湖分場	
						静岡県水産技術研究所 増養殖研究所	浜名湖分場 育種研究センター	
						増養殖研究所	育種研究センター ウナギ種苗量産研究センター	
						増養殖研究所	育種研究センター ウナギ種苗量産研究センター	
						近畿大学 静岡県水産技術研究所	農学部 浜名湖分場	
	2. 仔魚からシラスウナギまでの飼養技術の高度化 (1) 適正な人工飼料と給餌方法の開発						増養殖研究所	養殖システム研究センター ウナギ種苗量産研究センター

<p>(2) ウナギにおけるマーカー選抜育種の基盤となる遺伝的基礎情報の整備</p>	<p>精子の凍結保存耐性に影響を及ぼす要因の検討</p> 	<p>増養殖研究所 近畿大学</p>	<p>ウナギ種苗量産研究センター</p>
	<p>凍結保存期間が精子の質に及ぼす影響の評価</p> 	<p>増養殖研究所 近畿大学</p>	<p>ウナギ種苗量産研究センター 農学部</p>
	<p>凍結保存精子を用いた人工授精方法の検討</p> 	<p>増養殖研究所 近畿大学</p>	<p>ウナギ種苗量産研究センター 農学部</p>
	<p>高密度遺伝連鎖地図の作製</p> 	<p>増養殖研究所 中央水産研究所</p>	<p>ウナギ種苗量産研究センター 育種研究センター 水産生命情報研究センター</p>
	<p>cDNA解析およびSNP情報の蓄積</p> 	<p>増養殖研究所 中央水産研究所</p>	<p>ウナギ種苗量産研究センター 育種研究センター 水産生命情報研究センター</p>
	<p>幼生期間の長さに関する形質のQTL解析および遺伝率推定</p> 	<p>増養殖研究所</p>	<p>ウナギ種苗量産研究センター 育種研究センター</p>
	<p>完全養殖第2世代の作出および選抜効果の検証</p> 	<p>増養殖研究所</p>	<p>ウナギ種苗量産研究センター 育種研究センター</p>

I-2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
研究開発責任者	増養殖研究所	ウナギ種苗量産研究センター	◎ 田中秀樹
1. ウナギにおける催熟技術の高度化 (1) ウナギ成熟誘導ホルモン等を利用した人為催熟技術の高度化	増養殖研究所	育種研究センター	○ 風藤行紀
	増養殖研究所	育種研究センター	△ 風藤行紀 尾崎雄一 (2016.5～) 今泉 均 神保忠雄 樋口理人 (2016.4～) 田中秀樹 野村和晴 須藤竜介 (2016.4～) 尾崎雄一 (2014.4～ 2016.4)
2. 仔魚からシラスウナギまでの飼養技術の高度化 (1) 適正な人工飼料と給餌方法の開発	慶應義塾大学 静岡県水産技術研究所 近畿大学	自然科学教育研究センター 浜名湖分場 農学部	田中寿臣 青島秀治 太田博巳 (2016.4～)
	増養殖研究所	ウナギ種苗量産研究センター	○ 田中秀樹
(2) 新たな飼育システムによる種苗量産技術の開発	増養殖研究所	養殖システム研究センター	△ 古板博文 村下幸司 松成宏之 澁野拓郎 田中秀樹 野村和晴 須藤竜介 (2016.4～) 今泉 均 神保忠雄 樋口理人 (2016.4～) 増田賢嗣 谷田部誉史 (2015.4～) 友田 努 黒木洋明 (~2016.3) 嶋志田正晃 栗田 博 島 康洋 (2016.4～) 黒木洋明 (2016.4～)
	中央水産研究所	資源管理研究センター	照屋和久 小林真人 (~2016.3) 小磯雅彦 (2016.4～)
(2) 新たな飼育システムによる種苗量産技術の開発	西海区水産研究所	亜熱帯研究センター	
	増養殖研究所	ウナギ種苗量産研究センター	△ 田中秀樹 野村和晴 須藤竜介 (2016.4～) 今泉 均 神保忠雄

<p>3. ウナギの優良形質を備えた家系作出に向けた育種技術の開発</p> <p>(1) 大規模の受精が可能なウナギ精子の大量凍結保存技術の開発</p> <p>(2) ウナギにおけるマーカー選抜育種の基盤となる遺伝的基礎情報の整備</p>	中央水産研究所	資源管理研究センター	樋口理人 (2016.4～) 増田賢嗣 谷田部誉史 (2015.4～) 友田 努 黒木洋明 (~2016.3) 嶋志田正晃 栗田 博 島 康洋 (2016.4～) 黒木洋明 (2016.4～)
	西海区水産研究所	亜熱帯研究センター	照屋和久 小林真人 (~2016.3) 小磯雅彦 (2016.4～)
	増養殖研究	ウナギ種苗量産研究センター	○ 野村和晴
	増養殖研究	ウナギ種苗量産研究センター 育種研究センター	△ 野村和晴 風藤行紀
	近畿大学	農学部	太田博巳
	中央水産研究所	ウナギ種苗量産研究センター 育種研究センター 水産生命情報研究センター	△ 野村和晴 田中秀樹 須藤竜介 (2016.4～) 今泉 均 神保忠雄 樋口理人 (2016.4～) 尾崎照遵 尾島信彦 藤原篤志 中村洋路 甲斐 渉 (~2014.3) 岩崎裕貴 (2014.4～) 西木一生 (2014.4～) 松原和純 (2015.4～)

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

)

中課題番号	11105379	研究期間	平成24～28年度
大課題名	持続可能な養殖・漁業生産技術の開発		
中課題名	シラスウナギの安定生産技術の開発		
代表機関・研究開発責任者名	国立研究開発法人 水産研究・教育機構・田中秀樹		

I-1. 研究目的

ウナギは、我が国の食文化を特徴づける重要な水産生物であり、近年の国内の養殖生産量は約2万トンに達し、その生産額は500億円を超え、水産業における重要性は言うまでもない。ウナギの養殖はその種苗を天然のシラスウナギの採捕に依存しているため、種苗の供給は不安定であり、種苗価格はシラスウナギの来遊量により大きく変動する。そのため、人工種苗に対する期待は非常に高く、1960年代から研究が続けられており、2002年に初めて人工種苗生産に成功したが、安定的な種苗量産技術は開発されていない。今後とも安定的に種苗を供給するために、シラスウナギの安定的な人工種苗生産技術を開発することを目的とする。

このため、本研究では、

1. ウナギにおける催熟技術の高度化
2. 仔魚からシラスウナギまでの飼養技術の高度化
3. ウナギの優良形質を備えた家系作出に向けた育種技術の開発

により、人為催熟技術・安定採卵技術を高度化し、初期餌料の開発、飼育容器等の機器開発等を通して飼養技術を高度化するとともに、精子の大量凍結保存技術を開発し、将来の選抜育種の発展に必要な基盤を整備することなどにより、1万尾のシラスウナギを安定的に生産可能なシステムの開発を目標とする。

その結果、

1. 良質なウナギ受精卵・仔魚の安定的な供給
2. ウナギ人工種苗量産技術の進展
3. ウナギの遺伝的改良の基盤整備

が期待される。

I-2. 研究結果

ウナギの催熟技術の高度化については、組換えウナギ生殖腺刺激ホルモン (rGTH) の哺乳類細胞を用いた大量生産系を確立した。様々な実験系を用いて得られた2種類のrGTHの配偶子形成における役割に関して解析すると共に、明らかとなった知見を基にウナギにおける催熟技術を高度化した。雄に関しては、人工授精および誘発産卵による採卵に適した催熟法を明らかにし、従来法の問題点を概ね解決した。雌に関してもrGTHを用いた新たな催熟・採卵法を試み、従来法以上の成果を収めた。

適正な人工飼料と給餌方法の開発については、ウナギ仔魚の消化酵素活性の変動を調べ、撰

餌開始1週間頃に大きく落ち込む時期があることを明らかにするとともに、鶏卵黄や魚粉をベースとした飼料により、シラスウナギまで飼育可能なことを明らかにした。さらに、飼料の改良を重ね、サメ卵飼料よりも成長、生残性の優れるスラリー状飼料を開発することができた。

また、新たな飼育システムによる種苗量産技術の開発では、従来は小型水槽で少数の仔魚しか飼育できなかったところ、1 t規模の水槽でシラスウナギまでの飼育を実現し、省力化の可能性を示すとともに、20L規模の小型水槽での効率的飼育法を開発することによって、10m²の飼育室で9ヶ月間に約400尾のシラスウナギの生産を実現し、200m²の飼育施設があれば年間10,000尾のシラスを生産することが可能となる技術を実証した。

育種技術の開発では、ウナギ精子の凍結保存に適した基本条件を明らかにするとともに、大型ストロー容器による大量凍結保存技術を確立した。また、凍結精子で受精可能な卵量や凍結精子由来の仔魚に発生や成長過程に問題がないことを確認し、実用的な精子の凍結保存技術ならびに利用技術を確立した。さらに、仔魚期特性に関する遺伝的基礎情報の一端を明らかにするとともに、ゲノム情報を利用した効率的な育種の基盤となる連鎖地図等を整備した。

I-3. 今後の課題

組換えウナギFSHではホルモン活性にばらつきが生じており、効率的な生産の妨げとなっていることから、今後ホルモン産生細胞のクローン化を行うことにより、良質なホルモンの安定供給を可能とすることが必要である。また、催熟方法に関しては、投与するホルモンの種類、構造、投与方法などさらなる改善が望まれる。

サメ卵飼料に代わる新規飼料が開発されたが、栄養成分、物性の改善により今後より高性能の飼料に改良していく必要がある。また、今後の大量生産に向けて水を汚さない飼料形態への改良も必要である。様々なマリンスノー様餌料を作製し、それを摂餌させることは可能となったが、成長させるには至っておらず、ウナギ仔魚を成長させる栄養価を持つマリンスノー様餌料の開発とともに、ウナギ仔魚の摂餌生態を解析し、浮遊餌料を活発に摂餌する飼育環境の開発も必要である。

大型水槽でのシラスウナギまでの飼育は可能となったが、さらに飼育効率を高めるための技術開発が必要である。小型水槽での飼育では、機械化等省力化が必要である。また、低コストでの安定的な量産のためには早期に形態異常を持たないシラスに変態させる技術および変態を同期させる技術の開発が必要である。

ウナギの遺伝的特性やシラスウナギへの変態機構の一端が明らかになり、ゲノム情報を利用した育種の基盤整備が進んだので、今後は、さらに遺伝育種学的な研究を推進するとともに、変態期の総合的な理解に向けた研究やゲノム情報基盤の高度化を進め、選抜育種による仔魚期間の短縮に向けた実践的な取り組みが必要となる。

中課題番号	11105379	研究期間	平成24～28年度
小課題番号	E-1	研究期間	平成24～28年度
中課題名	シラスウナギの安定生産技術の開発		
小課題名	ウナギにおける催熟技術の高度化		
小課題責任者名・研究機関	風藤行紀・国立研究開発法人水産研究・教育機構増養殖研究所		

1) 研究目的

遺伝子工学的手法により、成熟促進効果の高い組換えウナギ成熟誘導ホルモン（生殖腺刺激ホルモン:GTH）の大量生産系を確立し、産業レベルでの安定供給を可能にすることにより、組換えウナギGTH（rGTH）等を利用した安定して良質卵を得ることが出来る新たなウナギ人為催熟技術の確立を試みる。

2) 研究成果

(1) 組換えGTHの効率的大量生産系の開発（平成24年度）

先ず、ウナギGTH β （FSH β あるいはLH β ）鎖、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）のC-末端配列（hCTP）、ウナギ糖タンパク質ホルモン α 鎖およびヒスチジンタグを連結した一本鎖GTH（FSH-hCTP あるいは LH-hCTP）をコードする発現ベクターを構築し、これまでのヒト腎臓293細胞を用いた一過性発現系に加えて、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）を用いたウナギFSH-hCTPおよびLH-hCTPの恒常発現系を確立した。次に、樹立した恒常発現株を培養する際の細胞密度、培養液、培養液に添加するサプリメントを最適化した後、大量培養し、精製した（図1）。

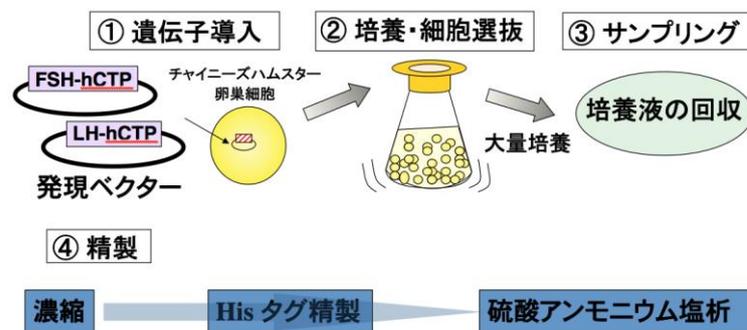


図1. 組換えGTHの効率的大量生産系

本系で作製し、精製を試みたGTH-hCTPをSDS-PAGEにより解析した結果、50kDa 強の一本のバンドと30-50kDa付近のスメアーなバンドが検出され、これらをウェスタンブロットにより解析したところ、50kDa 強のバンドは各サブユニットいずれの抗体にも陽性反応を示さなか

ったのに対し、30-50kDa付近のスミアーなバンドは対応するサブユニット抗体に対してのみ陽性反応を示した。このことから、得られたGTH-hCTPは粗精製品であることが明らかとなった。また、酵素免疫測定法で調べたところ、粗精製GTH-hCTPの精製度は50-60%であった。恒常発現系によるGTH-hCTPの産生量は10-15mg/L-培養液程度で、一過性発現系の約5mg/L-培養液に対し2-3倍の高値を示し、単位量のGTH-hCTPの産生に必要なコストは10-20分の1となった。

(2) 分子構造の改良による生物活性の高い組換えGTHの開発(平成25~26年度)

これまでの組換えGTHでは精製の効率化のためにHisタグを用い、且つタンパク質の生体内寿命の延長化に関与するO-型糖鎖結合部位(hCTP)を組換えGTHに1つのみ挿入していたが、HisタグのC-末端側に更にStrepタグを加え、且つ、hCTPを2つあるいは4つ挿入したFSHおよびLHを恒常的に発現する哺乳類細胞株の樹立を試み、成功した。また、各細胞株に対し、細胞の密度、培養液へ添加するサプリメントの種類、培養期間等、培養条件の最適化を行い、1-2リットル規模で培養後、Strepタグを利用してアフィニティー精製を行った結果、全ての組換えGTHが非常に高い純度で精製された。また、FSH、LH共に、hCTPの数を増やすにつれ、hCTP1つあたり5kDa程度分子量が大きくなったことから、各組換えGTHは設計通り正しく発現していると考えられた。

(3) 組換えGTHの配偶子形成における役割の解析(平成24~27年度)

恒常発現系および一過性発現系で作製したGTH-hCTPの生物活性をレポーターアッセイにより比較した結果、恒常発現系で作製したFSH-hCTPおよびLH-hCTPはともに、一過性発現系で作製したものと同等またはそれ以上に対応するGTH受容体(GTHR)を活性化する能力があった。

GTHのウナギ未熟精巣における精子形成誘起ステロイド(11-ketotestosterone:11-KT)産生に及ぼす影響を、一過性発現系で作製した組換えFSHおよびLHにより調べた結果、FSHとLH添加群は、いずれも培養液中の11-KT量が有意に増加したが、濃度依存的効果について検討した結果では11-KT産生を有意に促すFSHの最低有効濃度は300ng/mlであったのに対し、LHでは30ng/mlであり、ウナギ精巣においてはLHがFSHより11-KT産生誘導能が顕著に高いことが明らかとなった。

未熟な雄ウナギ各群4個体にhCG、恒常発現系で作製したFSH-hCTPあるいはLH-hCTPを週1回、12週間投与し、精液採取の可否、投与開始8、10、12週に得られた精液の採精量およびスパマトクリット値、運動精子率を調べたところ、全実験群においてホルモン投与4回以降で精液が得られ、投与開始8週目以降、得られる精液の量はLH-hCTP群で他群に比べ10倍以上で、スパマトクリット値は有意に低値を示した。また、各群で得られた精子の運動開始20分後の運動精子率は実験期間を通してLH-hCTP群が他群に比べ有意に高値を示した。以上の結果、恒常発現系で作製したGTH-hCTPは未熟雄ウナギへの高い成熟促進効果を有し、従来のhCG投与による人為催熟に比べて、質の高い精液を大量に得ることが可能であることが強く示唆された。さらに、LH、hCG単独、FSHおよびLH複合投与、FSH投与後8週目以降、LHあるいはhCGに投与を変更する群を比較したところ、LHの単独投与が成熟促進効果、排精量および精子の運動能のいずれの指標も優れていることから、雄ウナギの人為催熟法として最も適していることが示された。

雌ウナギの配偶子形成におけるFSHおよびLHの役割分担に関する知見を得るため、未熟雌ウナギに対し、FSHあるいはLHを週1回、10週投与した後、最終投与から1週間後のタイミングで適宜血液および卵巣のサンプリングを行い、血液から遠心分離により調製した血清中の卵黄形成誘起ステロイド(Estradiol-17 β :E2)量を時間分解蛍光免疫測定法により調べた。ま

た、各発達段階の卵巢から分離した30個の最大卵群の卵濾胞からcDNAを調製し、生殖関連遺伝子の発現を解析した。その結果、組換えGTH投与で人為催熟した雌ウナギでは、卵巢の発達に伴い血中E2量が増加したが、FSH群とLH群で有意な差は認められなかった。また、各発達段階の卵濾胞における生殖関連遺伝子の発現を解析したところ、概ね全ての遺伝子でGTH投与開始後に発現量が有意に高まり、卵黄形成中期あるいは後期に最高値に達した後、減少することがわかった。



図2.組換えFSHで催熟した雌ウナギ

(4) 組換えLHで催熟した雄ウナギを用いた誘発産卵による採卵技術（平成26～27年度）

これまで誘発産卵に用いる雄ウナギはhCGにより催熟を行って来たが、精子活性の良い十分な排精量を示す優良親魚の割合は3割程度しか得られなかったため、優良雄親魚の確保には多くの雄を催熟する必要があり、多大な労力を要した。一方、LHで雄ウナギを催熟すると、hCGの場合に比べ、運動活性の高い精子を含む大量の精液を排精する優良親魚の出現率が非常に高い事が明らかとなったので、hCGとLHを用いて催熟した雄ウナギを用いて誘発産卵を行い、両者の比較を行った。雌供試魚には16尾の天然ウナギを使用し、従来のサケ脳下垂体および最終成熟誘起ステロイドホルモン（17 \cdot -hydroxyprogesterone:OHP）を用いて人為催熟、排卵誘導を行い、8尾ずつをhCGあるいはLHにより催熟した雄との誘発産卵（雌1尾：雄1尾）に供した。雄供試魚は養鰻60尾を用い、hCGおよびLH投与（各群30尾）で催熟した際の成熟率はそれぞれ90% および 100%、精子量が0.3ml以上採取可能で活発に運動する精子の割合が75%以上の優良親魚率は45% および 97% であった。産卵雌親魚の体重当たりの産卵数および受精卵数を比較すると、hCG群およびLH群に有意な差は認められなかったものの、受精卵数に関してはLH群で高い傾向にあった。また、得られた卵の受精率、ふ化率、3日後生残率および7日後生残率を調べた結果、両群間で有意差は認められなかったものの、受精率は LH 群が、その他に関しては hCG群が高い傾向にあった。

誘発産卵においては雌雄の排卵、排精のタイミングを一致させることが重要であるが、これまでに得られている LH 投与による排精量および精子運動活性の結果は、LH 投与 24 時間後に調べられたものであるため、誘発産卵に用いる雄親魚への LH の追い打ちの適切なタイミングは不明であった。そこで、LH 投与後の精子運動活性および精液採取量の経時的変化を調べたところ、LH投与後の精子運動活性は投与6 時間後には比較的低かったものの、9時間後には上昇し、その後、30時間後程度まで高い状態を維持した後に、時間の経過に伴い低下した。一方、精子採取量はLH投与6時間後には低値を示したものの、時間の経過と共に徐々に増加し、21-30時間後で最も高く、その後減少する傾向が認められた。27年度に実施したさらに

詳しい実験の結果、質の高い精液が輸精管に多量に貯留されるのは、LH投与18～24時間後である事が証明された。雌の排卵はOHP投与14-15時間後であるため、雄ウナギのLH最終投与は、雌ウナギへのOHP投与の概ね6-8時間程度前に行うのが適当であると考えられた。

その結果を基に、雄ウナギへのホルモン投与の時間を変えて実際に誘発産卵を行い、その採卵成績を比較・検証した。雌は天然親魚を従来のサケ脳下垂体および最終成熟誘起ステロイドホルモン（17・ α -hydroxyprogesterone:OHP）を用いて人為催熟、排卵誘導を行い、雄には養殖雄ウナギを用い、hCGあるいはLHで人為催熟を施して優良親魚を選別し、誘発産卵時に投与するホルモンの種類および時間を変えて4つの実験区を設けた。各区催熟雄ウナギを用いた誘発産卵の結果、雌親魚の体重当たりの総採卵数には雄をhCGで催熟した区とLH催熟区で大きな差が認められないものの、受精卵数はLH催熟区で多くなる傾向が認められた。また、得られた卵の受精成績も有意差は認められないものの今回新しく設定したLHで催熟し、雌のOHP投与の6時間前（産卵20時間前）に雄にLHを投与する区で最も高く、受精率は70%以上、ふ化率、3日後生残率および7日後生残率も50%以上の高値を示し、従来法に比べ2倍程度の値となった。

（5）組換えGTH投与による雌ウナギの成熟促進効果（平成25年度）

未熟雌ウナギに対し、FSH、LHあるいはサケ脳下垂体抽出液（SPE）を週1回、毎週投与し、成熟促進効果を比較した。その結果、SPE投与群では魚体重が一旦減少した後、増加して投与7-8週目でピーク（110%程度）に達したのに対し、GTHでは催熟期間を通して体重の減少は認められず、FSH群では5週目までは体重増加が緩やかであったが、その後著増して8週目には140%以上となった。一方、LH投与群における体重増加は非常に早く、3週目から著増し、5週目には既に130%程度で最高値となった。FSH投与群では、主に4週目で卵黄形成中期、8週目で核移動期に達するのに対し、LH群では2週目および4週目で、それぞれ同ステージとなった。一方、SPE群では、核移動期の個体は7-10週目で認められた。また、各発達段階におけるGSIを比較したところ、核移動期と過熟でFSH群がLH群およびSPE群に比べ有意に高値を示した。各群の卵濾胞径の頻度分布を比較すると、FSH群では卵黄形成後期以降から大きく且つ明瞭な一つの最大卵群を形成するのに対し、LH群およびSPE群では、2つの卵群や明瞭な卵群を示さない卵巣等が多く認められた。以上の結果から、雌ウナギの卵巣発達において、FSHとLHは異なる作用を有することが明らかとなり、LHが非常に高い成熟促進効果を有する一方で、FSHでは均一な状態の最大卵群を多量に有する卵巣発達を誘導することから、両GTHを使い分ける事により、短期間で状態の揃った卵を多量に得る事が可能と考えられた。

（6）組換えGTH投与により人為催熟した雌ウナギからの採卵および人工授精（平成25～28年度）

GTH投与によって催熟した雌ウナギからの採卵および人工授精技術を開発するために、未熟雌ウナギにSPE、FSHあるいはLHを週1回投与し、投与開始時の体重に対して比体重が110%に達した時点で、投与する成熟誘導ホルモンをSPEあるいはLHに変更した後、常法に従って排卵誘導し、搾出により得た卵を人工授精に供した。その結果、GTH投与群で高い成熟誘導率が得られたが、SPEを用いた従来法の試験区で他の区に比べ高い受精率および孵化率を示し、本試験の最終成熟・排卵の誘導方法（タイムスケジュール等）がこれまでにSPEで成熟誘導した個体に対して最適化したもので有る事が一因と考えられた。

そこで投与するホルモンやタイムスケジュールについて詳細に検討した結果、rFSH投与で雌ウナギを催熟し、水曜日11時にLH投与した後、木曜日11時にLHとOHPの複合投与によって排卵誘導を行う方法が、人工授精法においてふ化率、3日後および7日後の仔魚生残率に関して

最も好成績につながることを明らかにした。

(7) 組換えGTH投与により催熟した雌雄のウナギを用いた誘発産卵による採卵(平成28年度)
GTH投与で催熟した雌親魚からの誘発産卵による採卵の試みとして、これまでに人工授精のために最適と考えられる条件によりGTHで催熟した雌親魚を用いて採卵実験を行い、従来のサケ脳下垂体抽出液(SPE)催熟雌を用いた場合と比較した。天然雌親魚(水温15℃管理)を用い、毎週月曜日にSPEあるいはFSHを注射することにより催熟し、卵濾胞径が750・ μ mに達した個体には、水曜日14時にLH(水温20℃に昇温)を、木曜日14時に更に17 α -hydroxy-progesterone(OHP)投与した後、水温を22℃に昇温して排卵誘導処理した。雄は養殖ウナギを用い、LHを週1回、毎週月曜日に注射することにより催熟を施し、雌のOHP投与の6時間前(水曜日8時)に再度LH投与した後、雌と同じタンクに移槽した。誘発産卵は雌雄1:1で行い、SPE群およびFSH群の雌親魚体重500g当りの総採卵数、受精卵数を算定すると共に、プレート法により受精率、ふ化率、3日後生残率及び7日後生残率を調べた。誘発産卵の結果、FSH群の雌親魚の体重当たりの総採卵数・受精卵数ともにSPE群に比べて多い傾向が認められ、得られた卵の受精率は平均約80%、ふ化率、3日後生残率及び7日後生残率も60%程度以上の高値を示し、SPE群に比べ1.4-1.6倍の値となった。以上の結果から、人工授精による採卵のための条件を基にGTHで催熟・排卵誘導した雌ウナギで誘発産卵を行うことで、従来のSPE催熟雌を用いる以上の採卵成績が得られることが示された。

3) 成果活用における留意点

確立された組換えウナギ生殖腺刺激ホルモン(rFSH および rLH)の哺乳類細胞を用いた産業レベルでの大量生産技術については特許を出願したのち、ライセンス契約により民間企業への技術移転を行い市販化に至っているが、ウナギ種苗生産技術開発において競合する恐れのある国外への流出には注意が必要である。

4) 今後の課題

rGTHの恒常発現哺乳類細胞株を樹立し、これを用いてrGTHの大量作製を行っているが、特にrFSHではホルモン活性にばらつきが生じており、効率的な生産の妨げとなっている。細胞は一つ一つ糖鎖構造やホルモン活性の異なるrGTHを産生していることから、今後ホルモン産生細胞のクローン化を行うことにより、良質なホルモンの安定供給が可能となると考えられる。また、誘発産卵に用いる雄の催熟方法に関しては、組換えGTH、特にLHの効果の持続時間が短い事に起因して、早朝の作業を含む煩雑なホルモン処理が必要であり、改良の余地があるのが現状である。これは最終投与するホルモンの種類、構造、投与方法を工夫する事により対応できると考えられる。

中課題番号	11105379	研究期間	平成24～28年度
小課題番号	E-2	研究期間	平成24～28年度
中課題名	シラスウナギ安定生産技術の開発		
小課題名	仔魚からシラスウナギまでの飼養技術の高度化		
小課題責任者名・研究機関	田中秀樹・国立研究開発法人 水産研究・教育機構増養殖研究所		

1) 研究目的

サメ卵飼料をウナギ仔魚に適正な組成に改良するとともに、サメ卵に代わり安定的に利用できる原料を探索し、新たなウナギ仔魚用飼料を開発する。さらに量産化に対応できる新規飼料および給餌法を開発する。飼育環境条件の改善、飼育装置の改良、仔魚斃死要因の解明と制御によって、さらなる成長・生残の向上を実現する技術を開発するとともに、小規模水槽を多数配置し、飼育管理の効率化を図る方法および、水槽規模を拡大し、その規模の水槽での最適な飼育管理手法を開発する方法の2つのアプローチによって種苗量産技術の開発を目指す。

2) 研究成果

(1) 適正な人工飼料と給餌方法の開発

(1) 仔魚の発育に伴う消化酵素活性の変動と飼料原料の消化性評価 (平成 24～26 年度)

ウナギ仔魚の発育に伴う消化酵素活性の変動を明らかにするために、5-35 日齢まで経時的に給餌前にサンプリングして、消化酵素 (トリプシン、キモトリプシン、リパーゼ、アミラーゼ) 活性およびそれらの遺伝子発現を測定した。その結果、各酵素とも個体あたりの消化酵素活性は発育とともに概ね増大していったが、いずれの消化酵素でも日齢 11-13 頃に停滞する時期がみられた (図 1)。特に、リパーゼは日齢 12-13 で急減した後、回復した。タンパク質あたりの活性は、いずれの酵素でも日齢 10-14 あたりに大きく変動する時期がみられた。消化酵素遺伝子も、日齢 11-12 日頃に発現量が急減し、その後回復した。

この知見をもとに、乾燥サメ卵および鶏卵黄、脱脂したサメ卵および鶏卵黄を主原料とし、大豆ペプチド、オキアミ分解物およびビタミンを添加した 4 種類の飼料を作製し、飼育試験を行った。その結果、脱脂鶏卵黄区、乾燥サメ卵区はそれぞれ脱脂しない区に比べて生残、成長ともに優れており、脱脂により栄養価が改善することが分かった。

安定的に供給できる飼料原料探索のために、サメ卵飼料で飼育した 52 日齢の仔魚から抽出、粗精製した消化酵素を用いて、サメ卵、鶏卵黄、脱脂粉乳およびカゼインを 28℃ で 2 時間人工消化し、消化性を評価した。タンパク質の消化により増加する遊離アミノ基の濃度により消化性を比較したところ、サメ卵が鶏卵黄よりもやや消化されるようであった。一方、脱脂粉乳はサメ卵および鶏卵黄よりもよく消化され、脱脂粉乳中の主タンパク質であるカゼイン

も同じような消化性を示したことから、カゼインはウナギ仔魚が利用しやすいタンパク質であることが示唆された。

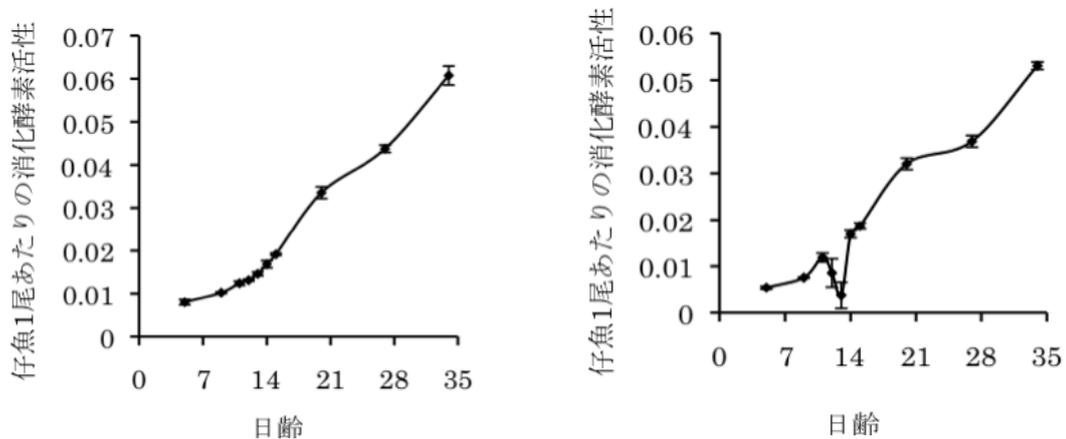


図1. 発育に伴うウナギ仔魚の消化酵素活性の変動 (左側：トリプシン；右側：リパーゼ)

(2) サメ卵飼料の改良 (平成 25～26 年度)

ウナギ仔魚用飼料に糖を添加することによって成長が促進されるとの報告があるので、ブドウ糖、麦芽糖を 10%ずつ添加したサメ卵飼料を作製し、6 日齢より水温 25℃で飼育試験を実施したところ、対照区およびブドウ糖あるいは麦芽糖を添加した区は 15 日齢まで高い生残率を示し、ブドウ糖および麦芽糖を添加した区は対照区よりも有意に高い成長を示したことから、サメ卵飼料へのブドウ糖あるいは麦芽糖の添加は仔魚の成長促進に効果があると考えられた。次に、ブドウ糖を 0、5、10、20、30%添加したサメ卵飼料を作製し、適正添加量について検討を行ったところ、30%区は生残率が低下し、成長は 10%区が最も優れていたことから、サメ卵飼料への糖の添加量は 10%程度が良いと考えられた。

サメ卵飼料へのオキアミ分解物添加の必要性を検討するために、サメ卵飼料からオキアミ分解物を除いた飼料と、それに大豆ペプチドを増量した飼料、さらにオキアミに含まれる相当量のタウリンを補足した飼料を作製し、通常のサメ卵飼料を対照に 5～40 日齢まで飼育試験を行ったところ、タウリンを補足すればオキアミ分解物を使わなくても成長・生残ともに遜色なかったが、オキアミ分解物あるいは大豆ペプチドの添加量の多少によって飼料の物性が変化することに注意が必要であることがわかった。

(3) サメ卵に依存しない飼料の開発 (平成 24～28 年)

鶏卵黄、魚肉分解物、大豆ペプチド、オキアミ分解物、フィードオイル等からなる飼料により、長期飼育を 2 回実施し、それぞれ 3 尾、2 尾のシラスウナギを育成することができたことから、鶏卵黄飼料でもシラスウナギまで飼育可能であることが分かった。

鶏卵黄飼料のさらなる改良を目指して、鶏卵黄、脱脂粉乳、大豆ペプチド、フィードオイル等からなる飼料を作製し、サメ卵飼料を対照に 20 日齢までの飼育試験を複数回実施したところ、20 日齢での成長はサメ卵飼料にやや劣ったが、生残率はサメ卵飼料と遜色なく、いずれも安定的に飼育できた。この結果をもとに、サメ卵区、タウリン無添加の鶏卵黄・脱脂粉乳飼料 (対照区)、対照区にオキアミ分解物 (YOP-C) を加えた YOP-C 区、対照区にタウリンを加えたタウリン区、タウリン区の鶏卵黄と脱脂粉乳飼料の比率を変更した比率変更区、タウリン区から脱脂粉乳を除いた鶏卵黄区の 6 試験区を設定し、水温 23℃で変態を開始するまで長期飼育を行った。いずれの区も飼育初期に大きく減耗し、対照区と YOP-C 区で生残率の低下が大きかった。比率変更区は、初期は他の区よりも高い生残率を示したが、途中で過

密によると思われる斃死が増加し、生残率が低下した。成長は対照区と鶏卵黄区が他の区に比べて悪かったが、残りの区はサメ卵区と比べて遜色ない成長を示した。なお、比率変更区の初期成長が悪いのは、生残が良かったことによる過密の影響と考えられ、密度が低下した後期はサメ卵区等と同等の成長を示した。いずれの飼料でも変態個体が現れ、これらの飼料により飼育開始から変態まで飼育可能であることがわかった（図2）。

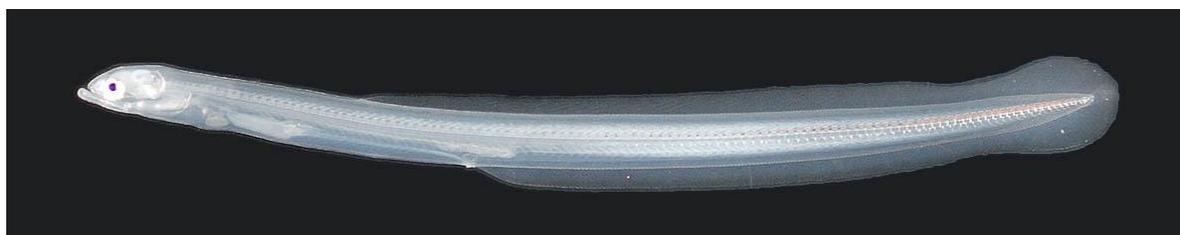


図2. 鶏卵黄・脱脂粉乳飼料で育成されたシラスウナギ

また、酵素処理魚粉にオキアミ、シラス等を加えて作製した飼料（FM区）、およびFMに大豆ペプチドを加えた飼料（FM-P区）での長期飼育でもシラスウナギに変態する個体が得られ、酵素魚粉飼料によっても飼育開始から変態まで飼育可能であることがわかった。

28年度には、鶏卵黄・脱脂粉乳飼料の推定される問題点を改善した飼料①、②の2種類を試作し、サメ卵飼料、鶏卵黄・脱脂粉乳飼料（鶏卵飼料）とともに長期の飼育試験を行った。飼料①、②ともに飼育初期よりサメ卵飼料、鶏卵飼料よりも高い成長・生残を示し、シラスウナギまでの飼育が可能であった。

（4）量産化に対応できる飼餌料および給餌法の開発（平成24～28年度）

大量培養が可能なスナワムシ科の極小ワムシであるプロアレスのウナギ仔魚用飼料としての有効性を調べるため、安定培養条件を検討し、サメ卵およびインディペプラスによる栄養強化を行った。栄養強化により、プロアレス中のDHA含量が増加し、栄養強化が可能であったが、飼育試験では積極的な摂餌は観察されず、無給餌区に比べて僅かな延命効果が認められたものの、成長はみられなかった。このため、仔魚は被甲・膜に包まれた餌料生物の内部から栄養を摂取することができないのではないかと考えられた。

自然界におけるウナギ仔魚の餌はマリンスノー状物質である可能性が示唆されているため、西マリアナ海嶺海域でマリンスノー採集ネットを用いてマリンスノー状物質を採集し、混入した大型のプランクトン等をスクリーニングしたものを仔魚に与えて摂餌性を調べたところ、活発に摂餌し、消化管を速やかに通過したことから餌料として利用可能でないかと考えられた。そこで、75日齢の仔魚に11日間にわたり水温24℃でネット採集物を給餌する飼育試験を行い、サメ卵飼料と比較したところ、数日間はサメ卵と同様の生残率を示したが、その後急激な生残率の低下がみられ、終了時にはサメ卵区78%に対し、マリンスノー区16%と著しく劣った。マリンスノー区の瀕死魚を観察したところ、腸管後端・肛門部の壊死がみられ、その原因として混入した放散虫やマイクロコペポダ等の誤飲の影響が疑われた。また、生存個体の安定同位体比を調べたが、ネット採集物の同化を示す結果は得られなかった。

26年度にマリンスノー採集ネットによる採集物を53μm篩でスクリーニングして得たマリンスノー様物質の中には、モヤモヤした透明ゲル状物やそれに微粒子が絡まった凝集物が多く含まれていた。それらをalcian blue染色してみたところ、藻類由来の透明細胞外重合体粒子（通称、TEP）を確認でき、人工ウナギ仔魚に与えたところ摂餌は良好であり、前年度のような腸管閉塞が原因と考えられる死亡は見られなかった。また、調査定点で採集したノコ

バウナギ科仔魚の腸管内容物にも粒径 10 μ m 前後の微細藻類細胞と藻類由来と考えられる TEP を確認できたことから、クロロフィル極大層から潤沢に降り注いでくる TEP がマリンスノーの起源物質である可能性が高いことがうかがわれた。人工マリンスノー作製のため、微細藻類、尾虫類、大型海藻などを用いて TEP を生成する方法を検討するとともに、TEP の栄養価を高めるため、生物餌料の栄養強化剤やオキアミ分解物と TEP を混合して栄養素を付着させることを試み、生成物を仔魚に摂餌させたところ、腸管に取り込まれたものの、腸管充満度は低く、効率的に摂餌させる条件探索が必要と考えられた。

(2) 新たな飼育システムによる種苗量産技術の開発

(1) 仔魚の成長・生残をさらに向上させる飼育技術の開発 (平成24~28年度)

ウナギ仔魚の成長を促進する可能性のある条件として、高水温 (28 $^{\circ}$ C) での給餌回数 (5回、9回)、給餌間隔 (2時間、1時間)、飼料物性の影響などを調べたが、日間成長量0.5mm/day前後の高い値が得られた例があるものの、結果に再現性がなく、仔魚の成長を促進する条件を絞り込むことは困難であった。

飼育水の処理が及ぼす影響について、砂ろ過海水と限外ろ過膜処理海水で99~114日齢までの15日間飼育して比較したところ、砂ろ過区に比べ限外ろ過区の生残率が高かったことから、限外ろ過膜処理海水は生残率を向上させる可能性が示唆された。また、限外ろ過膜処理海水と塩素処理海水で6~20日齢まで飼育した結果でも、生残率、成長ともに限外ろ過膜処理海水が優れていた。

ウナギ仔魚の飼育に塩分17psuに希釈した海水を用いると初期の生残率が高まることが報告されているので、ウナギ仔魚飼育における希釈海水の有効性を検証することを目的として、塩素除去した水道水とろ過海水を1:1に混合して23 $^{\circ}$ Cに加温した半海水と23 $^{\circ}$ C調温ろ過海水を飼育用水として用いてウナギ仔魚の初期飼育 (5~20日齢) を行い、成長および生残を比較した。全海水区では収容直後に大量斃死が見られたが、半海水区では大量斃死は見られなかった。20日齢における生残率は全海水区23.0%に対し半海水区は72.6%となり、半海水区の生残率がおおよそ3倍であったが、成長に関しては半海水区がやや劣っていた。

(2) 新たなコンセプトを取り入れた飼育法および飼育水槽の開発 (平成24~28年度)

水槽交換の省力化のためにデカント法を検討し、その結果を踏まえて回転によって2つの槽を交互に使用する落花生型水槽 (図3. 左) を試作し、飼育試験を行ったところ、100日齢以上まで良好な飼育結果が得られ、水槽交換に要する時間と手間も大幅に削減が可能であった。また、水槽交換を行わず、代わりに水槽壁面・底面を拭浄する飼育試験を行い、その結果を踏まえて円盤型で、20 $^{\circ}$ の傾斜を与え、傾斜を反転させて最深部と最浅部を入れ替えて水槽を半面 (浅部) ずつ拭浄することにより水槽交換を省略する円盤型水槽 (図3. 中) を試作して飼育試験を行った。円盤型水槽では148日齢までの生残が確認されたが、生残率は低かった。さらに、2個の槽を1日毎に交互に使用し、非使用側を拭浄することによって水槽内の清潔さを維持する構造の不透明で半円筒型 (蒲鉾型) の蒲鉾型連結水槽 (図3. 右) を考案し飼育試験を行ったところ、不透明な水槽では初めて20日齢までの飼育に成功し、20日齢までの生残率は19.9%であった。



図3. 新たなコンセプトにより開発された飼育水槽

ウナギ仔魚飼育において実績が有るクライゼル水槽（湛水量 19L）を小型化したミニクライゼル水槽 Ver. 1（湛水量 2.3L）を試作し、その飼育特性を把握するために、日齢 6 から日齢 250 まで給餌飼育を行った結果、シラスウナギまでの飼育が可能であり、全期間を通じて、従来の方式で飼育した場合と遜色の無い成長を示すことが確認された。また、20L ハーフパイプ水槽と比較したところ、変態開始の日齢はミニクライゼル水槽での飼育で有意に早く、ハーフパイプ水槽に比べて、仔魚期の飼育期間が短縮される何らかの効果があったことが示唆された。さらに、上部開口部を円筒状にして新旧水槽をソケットで連結し、持ち手を持って固定したまま 180° 天地を緩やかに反転することで飼育水ごと仔魚を移槽する方式（デカント方式）を可能にすることによって水槽交換作業を簡略化する改良を加えたミニクライゼル水槽 ver. 2（湛水量 3.6L）を試作した。ミニクライゼル水槽 ver. 2 を用いた長期飼育の結果、10% を超える変態開始率が得られ、全期間を通じて従来の方式で飼育した場合と遜色の無い成長を示すことが確認された。

従来使用されていたアクリル樹脂製ハーフパイプ水槽の問題点を改善することを目的に、注水ノズルを水槽上部に設置し、湛水部分の断面形状をより真円に近づけることによって、より乱れの少ない水流を形成することを目指した一体成形の PET 樹脂製改良型ハーフパイプ水槽（湛水量約 22L）を試作し、7 日齢仔魚約 1,100 尾を収容して飼育試験を行ったところ、水槽内によどみが生じ難くなって残餌の堆積を低減することができ、250 日齢までに 63 尾が変態を開始し、効率的な飼育が可能であることが示された。

（3）個別飼育法および自動飼育装置の開発（平成24～26年度）

飼育管理効率化のためにウナギ仔魚を小規模な容器に個別に隔離して管理する飼育法を考案し、50ml ファルコンチューブを改造した試作版の飼育容器を用いて 82 日齢から 90 日間の給餌飼育を行い、生残や成長について検証したところ、安定した給餌飼育が可能であり、良好な成長が見られた。また、最大伸長期のレプトであっても飼育可能であり、シラスウナギへの変態誘起も可能であることも明らかとなった。ただ、50ml 容器による飼育では初期の生残が不安定であったため、容量の大きな 2 種類の容器（100ml および 250ml）について、飼育特性を検証するとともに、1 つの容器に複数尾の仔魚を収容し適宜収容密度を調整しながら飼育する方法について検討した。5L ボウル型水槽との比較試験によって、個別飼育法による方が従来の 5L 水槽による飼育よりも仔魚を効率よく成長させることが可能であることが判明した。また、1 個の飼育容器に複数尾収容する方法での飼育が可能であり、100ml 容器よりも 250ml 容器で小分けにしながら飼育する方が安定した飼育が可能であった。

250ml容器での個別飼育法は機械化に適すると考えられたので、給餌及び残餌の洗浄を自動的に行うターンテーブル式自動飼育装置を試作した(図4)。初期の仔魚について自動飼育装置の適用が可能かどうか明らかにするため、通常の5Lボウル水槽を対照として日齢7、21、35からそれぞれ14日間給餌飼育を行ったところ、日齢7-20の飼育では生残率が著しく低下し、日齢21-34の飼育でも成長が劣ったことから、250ml容器を用いた自動飼育は、日齢35以降(全長およそ13 mm以上)の仔魚において適用可能であり、それ以前の仔魚への適用は難しいと考えられた。



図4. 試作したターンテーブル式自動飼育装置. 36個×6列で最大216個の容器を並べることが出来る

ターンテーブル式自動飼育装置を用いることで、24時間給餌が容易となり、その効果を実験的に検証することが可能となったので、夜間も含めた多回給餌により仔魚の成長促進が可能であるか否かについて検証した。自動飼育装置を用いた給餌パターンの異なる3試験区(2時間8分毎に6回、9回、11回給餌)に対照区(2時間毎に5回給餌)を加えた計4試験区で日齢70から20日間給餌飼育を行った結果、自動飼育装置を用いた試験区では試験開始から3-7日目にかけて大幅な減耗がみられ、それ以降は比較的安定した飼育が可能であったが、給餌頻度を増やしても顕著な成長促進効果は認められなかった。また、給餌間隔を変えた場合や給餌頻度を減らした試験では、6回給餌で給餌間隔を変えても顕著な成長の改善はみられず、また給餌頻度を1日4回に減らしても成長の鈍化は認められなかった。これらの結果から、少なくとも日齢70(全長およそ23 mm)以上の仔魚においては、給餌頻度を増やしても成長の改善は期待できず、1日4回程度の給餌回数で十分であることが示唆された。

(4) 飼育水槽の拡大による種苗量産の試み(平成25~28年度)

種苗量産を目指して、24年度に試作した蒲鉾型連結水槽を拡大した1kL規模の蒲鉾型連結水槽を作製し、飼育試験を行った(図5)。5日齢の仔魚27,965尾を收容し、水温23℃でサメ卵主体懸濁態飼料を1日5回給餌して514日齢まで飼育を継続した結果、441尾のシラスウナギを得ることができた。水槽の形状や照明を改善した2回目の飼育では5日齢に20,993尾の仔魚を收容して480日齢まで飼育を継続し、190尾のシラスウナギを得た。得られたシラスウナギの平均全長は1回目が51.2mm、2回目が47.8mmであった。また1回目の飼育では、得られたシラスウナギのうち351尾(79.6%)が正常で、53尾(12.0%)に下顎の異常が認められた。その後も生残率の改善のために給餌量や注排水など様々な工夫を行ったが、28年度末までに第1回目の飼育成績を超える結果は得られなかった。

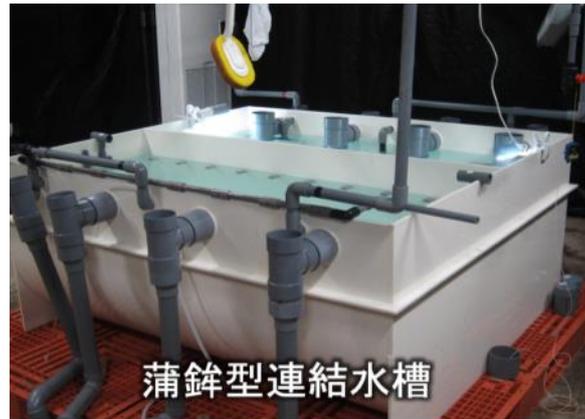


図5. 1kL規模の蒲鉾型連結水槽. 1トン規模の水槽で初めて長期・大量飼育に成功した.

(5) 飼育効率の改善による種苗量産の試み (平成24～27年度)

従来の小型水槽での飼育は生残率を高めることを第1目標としていたため、成長差が出てもすべての個体を継続して飼育してきたが、小型個体が十分に摂餌できないためにさらなる成長差を生み、高密度による成長鈍化や個体干渉によって傷つくことなど様々な問題があつて、シラスウナギまでの生残率を低下させていた恐れがあつた。そこで、一定のスペースでシラスウナギ生産尾数を増加させることを目的として、サイズによって選別分槽するとともに、成長不良個体や形態異常個体は随時除去する選別分槽飼育法を考案した。また、選別分槽するとともに、全長約 55mm 以上に達した個体は2週間程度の絶食処理を行うことにより変態誘起を試みた。餌の粘度や給餌量は仔魚のサイズや収容尾数に応じて適宜調節した。その結果、有効床面積約 10 m²の飼育室で9面の20Lハーフパイプ水槽を用いて、平成26年度は465尾、平成27年度は4月～12月までに412尾のシラスウナギが得られ、安定して効率的な飼育が可能であることが示された。本飼育法によって、200 m²の飼育施設があれば年間10,000尾のシラスウナギが生産可能となることが示唆された。

3) 成果活用における留意点

開発された新規スラリー状飼料は完成されたものではないため、実用化に向けた改善が必要である。1t規模の蒲鉾型連結水槽およびターンテーブル式自動飼育装置については特許出願中であり、商業的な利用にあたっては注意が必要である。

4) 今後の課題

サメ卵飼料に代わる新規飼料が開発されたが、ベースとなる組成ができたのみで、今後より高性能の飼料に改良していく必要がある。特に、初期に比べて後期に成長が低下するため、栄養成分、物性の両面からの改善が必要である。また、サメ卵飼料同様の飼料形態であることから、水質を悪化させやすく、環境を維持するために大量の飼育水が必要となるため、今後の大量生産に向けて水を汚しにくいような改良も必要である。

新たな形態の飼餌料開発については、様々なマリンスノー様餌料を作製し、それを摂餌させることは可能となったが、成長させるには至っていない。ウナギ仔魚を成長させるためには、ウナギ仔魚が利用可能な栄養成分を持った餌料を十分量摂餌させることが必要である。

このため、ウナギ仔魚を成長させる栄養価を持つマリンスノー様餌料の開発とともに、ウナギ仔魚の摂餌生態を解析し、浮遊餌料を活発に摂餌する飼育環境の開発も必要である。

大型水槽でのシラスウナギまでの飼育は可能となったが、湛水量あたりの生産量は小型水槽に及ばないため、今後は飼育効率を高めるための技術開発が必要である。一方、小型水槽での飼育では、量産のためには多くの労力が必要とされるので、機械化等省力化が必要である。また、早期に形態異常を持たないシラスに変態させる技術および変態を同期させる技術は開発されておらず、今後さらなる取り組みが必要である。

中課題番号	11105379	研究期間	平成24～28年度
小課題番号	E-3	研究期間	平成24～27年度
中課題名	シラスウナギ安定生産技術の開発		
小課題名	ウナギの優良形質を備えた家系作出に向けた育種技術の開発		
小課題責任者名・研究機関	野村和晴・国立研究開発法人 水産研究・教育機構増養殖研究所		

1) 研究目的

優良形質を有する遺伝資源の保存および有効利用を可能にするため、精子の大量凍結保存技術を開発し、量産規模での凍結精子の利用技術を確立する。また、高密度遺伝連鎖地図の整備やcDNAのカタログ化、幼生期間の短縮に繋がる表現形質に関わるメジャージーンのQTLマッピングや遺伝的パラメータ推定など、将来のゲノム情報を利用した選抜育種（マーカー選抜育種）の発展に必要な基盤を整備する。

2) 研究成果

(1) 大規模の受精が可能なウナギ精子の大量凍結保存技術の開発

(1) 凍結保存方法の検討（平成24～25年度）

ウナギ属の精子の凍結保存方法については、これまでにニホンウナギとヨーロッパウナギで先行研究があるが、これらはいずれも凍害防御剤として10%DMSOを用いている。比較検証するため、これらの凍結方法をニホンウナギ精子で追試したが、解凍後に精子運動を確認することはできなかったため、ニホンウナギ精子の凍結保存に適切な凍害防御剤の種類について検討した。hCG投与した雄から採精後、人工精漿で培養し、凍害防御剤（DMSOまたはMeOH）を10%含む凍結用保存液で希釈後、250 μ Lストローに封入した。液体窒素液面上の種々の高さにストローを固定して-50 $^{\circ}$ Cまで冷却した後、液体窒素に浸漬した（図1）。解凍後の運動率を活性化液（450mM NaCl液）で希釈15秒後に測定した。その結果、DMSOを10%の濃度で加えた保存液で希釈した精子は、冷却速度に関わらず解凍後に運動する精子は認められなかったが、MeOHを同濃度で加えた保存液で希釈した精子は、5～25 $^{\circ}$ C/分の冷却速度内で凍結したものについては解凍後に30%以上の運動率を示し、およそ15～23 $^{\circ}$ C/分の間では安定して高い運動率が得られた。10%MeOHを含む凍結用保存液で希釈して凍結した精子が高い解凍後運動率を示すのに対し、先行研究で報告されていた10%DMSOを用いた凍結保存液では、解凍後運動率はほぼ0%を示す原因を明らかにするため、10%MeOH保存液、10%DMSO保存液のいずれかで希釈のみを行い、時間経過に伴う運動能力の変化を調べた。その結果、MeOH保存液で希釈した精子は希釈後90分までは有意な運動率の低下は示さなかったのに対し、DMSO保存液に希釈した精子は、希釈30秒後に既に運動率が半分以下となり、1分後以降は運動可能な精子がみられなくなったことから、ウナギ精子に対するDMSOの強い毒性が、凍結・解凍後の精子運動率の低下の主因と考えられた。

液体窒素液面上にストローを固定して冷却する際に、同じ高さで冷却した時のストロー内の冷却速度は、凍結毎に5～15℃/分程度の変動を示し、不安定であった。これは冷却時のチャンパー内の気相温度が蓋の開閉等により大きく変動するためと考えられたので、冷却速度を安定化する手法について検討した。その結果、高い解凍後運動率が得られる15～23℃/分の冷却速度が得られるのは液面から11cmの距離に固定した場合であり、ストロー内が0℃の時点のストロー外の気相温度が-17～-35℃の範囲内であれば、適切な冷却速度となることが明らかとなった。また、冷却用チャンパー内の気相温度は、マグネットスターラーを用いて低速で液体窒素を継続的に攪拌することにより、安定化させることが可能であることが明らかとなった。この方法により、一定の高さにおけるストロー個体間の冷却速度のバラツキを低減することが可能となった。

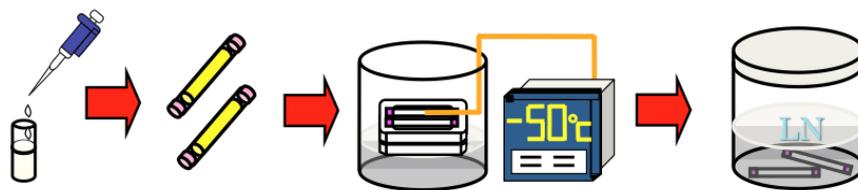


図1. ウナギ精子の凍結保存方法

これまで、液体窒素中で保存した容器を解凍する際は、室温（およそ20℃）の淡水中に容器を素早く浸漬する方法を取ってきたが、解凍速度が凍結保存精子の運動活性に及ぼす影響について検討するために、浸漬する淡水の温度を0～70℃に設定し、その淡水中にストロー内の温度が0℃に達するまで浸漬し、それぞれの解凍速度と精子の解凍後運動率を測定した。その結果、解凍時にストローを浸漬する水温に応じ、解凍速度は395℃/分（0℃水）～3,820℃/分（70℃水）までの広い範囲を示したが、いずれの解凍速度においても有意な運動率の変化は認められなかった。従って、一定の狭い範囲への制御が必要であった冷却速度に比べ、解凍時に浸漬する水温やそれに伴う解凍速度が融解後の運動精子率に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

採精した精子を人工精漿で30分以上培養することにより、精子の運動開始率が上昇することが知られているが、この培養が精子の凍結保存効果に影響するか否か調べるために、培養前、並びに種々の時間培養した後の凍結保存前後の運動率の相対比を測定したところ、人工精漿で1時間培養することにより、凍結保存後の運動率と凍結前の運動率の相対比で求める凍結保存耐性は有意な上昇をみせた。この現象は培養30分後から数時間は維持されたが、その後は培養前と差異は認められなくなった。この結果から、人工精漿で1時間程度培養してから凍結保存を行うのが効率的と考えられた。

（2）大量保存が可能な精子凍結方法の検討（平成25～26年度）

大量の卵の受精に必要な量の精子の凍結保存を可能とするために、容量が2ml以上で、冷却速度が至適範囲内に維持され、容器内の冷却速度の部位差が小さく、液体窒素中でも壊れない素材である大型保存容器の探索を行った。クライオチューブ（2ml、4.5ml）とマクロチューブ（4.5ml（直径5mm、長さ24cm））について検討したところ、クライオチューブは容器が肉厚なため、冷却速度が低速で、解凍後の相対運動率は低い値を示したのに対し、マクロチューブはウナギ精子の至適冷却速度内で比較的均一な冷却が可能と考えられ、対

照とした250 μ lストローでの凍結と解凍後精子運動率に差は認められなかったことから、大容量のウナギ精子の凍結保存容器として有用と考えられた。

また、精子を保存液で希釈する際の希釈比が低いほど1つの容器内に保存可能な精子量は増大するので、1つの容器当たりの解凍後に運動可能な精子数を最大化できる希釈比を検討することを目的として、2倍希釈から64倍希釈までの種々の希釈比で希釈した精液を250 μ lストローに封入し、凍結・解凍後の運動率を調べた。その結果、2倍希釈では解凍後の運動率が著しく低い値を示し、希釈比の増加とともに運動率は上昇する傾向を示したが、4倍以上では希釈比率間に有意な差は認められなかったため、ウナギ精子を無駄なく大容量で凍結保存するためには、4倍程度の希釈比が適していると考えられた。

(3) マクロチューブを用いた精子凍結と人工授精（平成26年度）

大容量の凍結保存容器として有効であることが明らかとなったマクロチューブを用いて精子を凍結保存し、その受精能力を確認した。また、解凍後・媒精前に、精子の運動活性を低減させる保存液を洗浄することが受精成績に及ぼす影響を調べた。リコンビナントLHの投与により催熟した雄ウナギより採取した精液に3通りの処理（非凍結対照群、マクロチューブにより凍結・解凍した群、凍結・解凍・洗浄した群）を行い、1尾の雌より得た卵を10gずつ小分けして人工授精を行い、卵割率、正常胞胚率、ふ化率を測定した。凍結前の精子運動率は65%を示したのに対し、凍結・解凍した精子は15%程度まで低下し、卵割率で判定した受精率、正常胞胚率、ふ化率では、新鮮精子に比べて凍結精子は低下する傾向がみられたものの、有意差は認められなかった。また、解凍後に洗浄した精子の方が受精成績の全ての値で解凍のみの精子よりも高い数値を示した。以上の結果から、マクロチューブで凍結保存した精子は非凍結精子に比べ、解凍後の運動率は低下するものの、正常な受精能力を有しており、胚の発生過程やふ化後の生残、形態異常等には影響しないこと、また、解凍後、人工授精に用いる前に保存液から人工精漿に置き換えることが受精成績の向上に有効である可能性が考えられた。さらに、凍結精子による受精可能な卵数を推定するため、運動精子：卵の比率と受精率について、Piecwise linear regression解析による2相直線回帰と未知の変化点探索を行ったところ、希釈・凍結・解凍精液量250 μ lに対して3.54~6.60gの卵への媒精が可能と推定されたことから、4.5mlマクロチューブ1本の精子で63.7~118.8gの卵量（およそ12.7万~23.8万個）への人工授精に対応が可能であると考えられた。

(4) 凍結保存期間が精子の質に及ぼす影響の評価（平成24~26年）

凍結保存期間が保存精子の品質に及ぼす影響を定量的に検証するため、6個体の精子サンプルを250 μ lストローを用いて同じ方法で凍結した。保存開始1、7、30、90、180、365、730日後に各個体4本ずつのストローを解凍し、精子運動率を追跡調査した。その結果保存開始2年目までの精子の解凍後運動率には有意な差は認められず、液体窒素中での保存期間が凍結保存精子の解凍後運動率に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。また、凍結精子による受精に由来する仔魚をシラスウナギにまで育成し、発生や成長に問題がないことを確認した。

以上の成果により、大量受精に対応可能な実用的な精子の凍結保存技術ならびに利用技術確立し、従来よりも計画的かつ柔軟な交配を行うことを可能にした。

(2) ウナギにおけるマーカー選抜育種の基盤となる遺伝的基礎情報の整備

(1) QTL解析および連鎖地図作製の解析家系の構築（平成24年度）

幼生期間の長さに関する形質についてのQTL解析および遺伝連鎖地図作製の材料となる供試家系を構築するために、台湾および愛知県で採捕されたシラスウナギを淡水養成した

雌雄のウナギを交配親魚とし、それぞれ催熟処理を行い、台湾加入群由来（♂）×愛知加入群由来（♀）の1対1の組み合わせで交配を行った。なお、これらのシラスウナギを10尾ずつ耳石解析に供したところ、台湾加入群の方が愛知県加入群よりも平均の幼生期間が短かった（台湾：日齢90-132、平均106.0±16.8；愛知：日齢104-196、平均150.8±39.2）。日齢6に5L水槽×21基に約500尾ずつ、計10,358尾を収容し、日齢7から日齢450まで飼育した結果、シラスウナギへの変態開始尾数は287尾となり、十分な規模の家系を構築できた（表1）。

表1 QTL解析用家系F₁の飼育結果のまとめ

飼育期間:	2011年7月30日～2012年10月15日 (日齢7から日齢450まで)
飼育開始尾数:	10,358尾
変態開始尾数:	287尾 (変態開始率: 2.77%)
未変態尾数:	10尾
変態完了:	276尾
飼育:	80尾
取り上げ:	196尾
変態開始時日齢	
平均	292.03日
標準偏差	51.76日
最小	186日
最大	447日
中央値	285日
変態完了時形態データ	
全長	53.21±4.69 mm
体重	235.23±76.50 mg

* 飼育に回した80尾は次世代の親魚候補として養成。半数を雌化処理。

(2) 高密度遺伝連鎖地図の作製 (平成24～26年度)

24年度に作出した解析用家系の雌雄親魚およびそのF₁子孫92尾を材料に、ddRAD法により得たSNPマーカーおよびマイクロサテライトマーカーを高密度に配置した雌雄の遺伝連鎖地図(図2)を作製するとともに、公開されているニホンウナギのドラフトゲノムデータと統合し、約13%にあたる塩基配列(151Mb相当)について連鎖地図上の位置を推定した。26年度に新たに追加したSSRマーカーを含めて、雌雄の連鎖地図は、雌連鎖地図がマーカー数1,850座(SSR420座+SNP1,430座)、総遺伝距離が1792.2 cMとなり、雄連鎖地図がマーカー数1,659座(SSR415座+SNP1,244座)、総遺伝距離が1404.4 cMとなった。座乗するSSRマーカー数が大幅に増えたことにより、本種における標準的な遺伝連鎖地図としての利用価値が増したと考えられた。

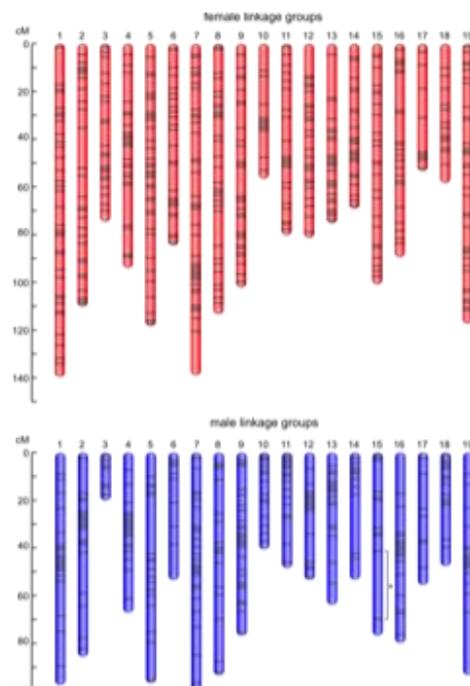


図2. ニホンウナギの遺伝連鎖地図

(3) 幼生期間の長さに関するQTL解析（平成26～27年度）

前年度までに構築した解析用家系においてシラスウナギへ変態した287尾のうち、早期に変態開始した46尾と晩期に変態した46尾を材料に、作製した遺伝連鎖地図を用いて変態開始までの日齢等に関する形質についてQTL解析を実施した。QTL解析の結果、変態開始および変態完了時の日齢については、ゲノム全体で有意となったQTLが1つ、連鎖群内で有意となったQTLが2つ、合計3つのQTLがそれぞれ別の連鎖群に検出された。このうち、最もLOD値が高かったQTLは雌側連鎖群1に検出され、LOD値は連鎖群の端部にピークを示した。全表現型分散に占める各QTLの寄与率は、変態開始時日齢でそれぞれ、15.1%、12.3%、8.6%となり、表現型に占める効果の大きいQTLが検出された。変態完了時、すなわち体型がシラスウナギ型になった時の外部形態についてもQTL解析を実施したところ、上記の3つとは異なる領域にQTLがのべ3つ検出された。このことから、シラスウナギに到るまでの期間とシラスウナギになった時の大きさや重さといった形質が、それぞれ独立した複数の遺伝子によって支配されていることを示唆すると考えられた。

(4) 幼生期間の長さに関する遺伝率推定のための半きょうだい家系の構築（平成26～27年度）

半きょうだい間での相関関係より幼生期間の長さ等に関する表現形質の遺伝率を推定するために、10尾の雌（台湾由来4尾、日本由来6尾）と14尾の雄（台湾由来9尾、日本由来5尾）を用いて、合計104通りの組み合わせで半きょうだい家系を構築し、シラスウナギに変態するまで飼育した。その結果、合計で802尾が変態を開始し、766尾が変態を完了した。これらの個体について親子鑑定を実施し、318個体中293個体（92.1%）について、雄親を決定し血縁関係を再構築した。これらのデータセットから変態開始および完了時の日齢や体サイズに関する遺伝的なパラメータを推定した結果、暫定的な遺伝率の推定が可能であった。変態開始時および変態完了時の日齢は、狭義の遺伝率は低いものの、広義の遺伝率は高かった。一方で、変態開始時の全長は広義・狭義の遺伝率ともに高く、固定可能な遺伝効果が高い効率で選抜できることが示唆された。

(5) 変態前後における遺伝子発現差異の解析（平成24～26年度）

変態期の前後において発現遺伝子の網羅的な解析を行うために、人工的に生産した最大伸長期のレプトセファルス幼生（日齢314、全長50～60 mm）及びシラスウナギ（日齢285、全長44～58 mm）各3尾からpolyA RNAを精製した。個別にcDNAライブラリーを作製し、次世代シーケンス解析により各個体2千万リード以上を取得した。本課題で整備した参照cDNA配列を用いてRNA-Seq解析を行い、変態前後における遺伝子発現レベルを網羅的に比較した。その結果、レプト期とシラス期における発現が推定された全43,572遺伝子のうち、5,790個の遺伝子が有意な発現変動遺伝子（Differentially Expressed Gene, DEG）と判定された。また、各期で特異的に高発現している遺伝子のオンロジー解析を行ったところ、レプト期では細胞性防御応答の調節に関連する遺伝子等が多かったのに対し、シラス期では走化性に関連する遺伝子等が多く、自然免疫応答が亢進していることが推測された。

以上の成果により、仔魚期特性に関する遺伝的基礎情報の一端を明らかにするとともに、ゲノム情報を利用した効率的な育種の基盤となる連鎖地図等を整備した。

3) 成果活用における留意点

いずれの成果も知財化はしておらず、活用について特に留意する点はない。

4) 今後の課題

本小課題の成果により、これまで未知だったニホンウナギの仔魚期特性に関する遺伝的な特性やシラスウナギへの変態機構の一端を明らかにするとともに、ゲノム情報を利用した育種の基盤整備が進んだ。今後は、さらに遺伝育種学的な研究を進展させるとともに、変態期の総合的な理解に向けた研究やゲノム情報基盤の高度化に取り組んでいく必要がある。同時に、選抜育種による仔魚期間の短縮に向けた実践的な取り組みも進展させることで、ニホンウナギの人工種苗生産技術の実用化を加速化することが期待される。

成果等の集計数

課題番号	学術論文		学会等発表(口頭またはポスター)		出版図書	国内特許権等		国際特許権等		報道件数	普及しうる成果	発表会の主催(シンポジウム・セミナー等)	アウトリーチ活動
	和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得				
11105379	8	8	39	7	5	3	0	1	0	74	0	0	27

(1)学術論文

区分: ①原著論文、②その他論文

整理番号	区分	機関名	タイトル	著者	掲載誌	巻(号)	掲載ページ	発行年	発行月
1	①	水産研究・教育機構	水温・給餌回数・飼育密度の調整によるウナギ <i>Anguilla japonica</i> 仔魚期間の短縮	増田賢嗣ら	日本水産学会誌	79(2)	198-205	2013	3
2	①	水産研究・教育機構	ウナギ仔魚飼育における水槽交換作業の簡略化の可能性について	増田賢嗣ら	水産技術	6(1)	33-38	2013	11
3	①	水産研究・教育機構	給餌開始日齢が初期のウナギ仔魚の成長および生残に及ぼす影響	神保忠雄ら	水産増殖	61(4)	403-406	2013	12
4	①	水産研究・教育機構	シーソー式水槽によるニホンウナギ仔魚の飼育手法の簡略化	増田賢嗣ら	水産技術	6(2)	169-174	2014	2
5	①	水産研究・教育機構	市販材料を用いた微小ワムシ <i>Proales similis</i> 栄養強化の試行	友田 努ら	水産技術	6(2)	179-184	2014	2
6	①	水産研究・教育機構	ウナギ仔魚はマリンスノー様物質を摂餌する	友田 努ら	日本水産学会誌	81(4)	715-721	2015	7
7	①	水研機構	Access Array™システムとIon PGM™システムを組み合わせたSTRマーカーの迅速なジェノタイピング手法の開発	野村和晴ら	DNA鑑定	7	51-61	2016	1
8	①	水産研究・教育機構	魚肉タンパク分解物を主原料とする飼料によってニホンウナギ <i>Anguilla japonica</i> 仔魚のシラスウナギまでの飼育が可能である	増田賢嗣ら	日水誌	82	131-133	2016	3

9	①	水産研究・教育機構	Partial characterization and ontogenetic development of pancreatic digestive enzymes in Japanese eel <i>Anguilla japonica</i> larvae.	Murashita Kら	Fish Physiology and Biochemistry	39(4)	895-905	2013	8
10	①	近畿大学、水研機構	Administration of 17 α -hydroxyprogesterone into mature male Japanese eel reduces sperm motility by decreasing potassium ion concentrations in the seminal plasma.	Miura Aら	Aquaculture	414-415	217-223	2013	8
11	①	水産研究・教育機構	A step forward in development of fish protein hydrolysate-based diets for larvae of Japanese eel <i>Anguilla japonica</i> .	Masuda Yら	Fisheries Science	79(4)	681-688	2013	9
12	①	水産研究・教育機構	Characterization of thyroid hormone receptors during early development of the Japanese eel (<i>Anguilla japonica</i>)	Kawakami Yら	General and Comparative Endocrinology	194	300-310	2013	12
13	①	水研機構	A ddRAD-based genetic map and its integration with the genome assembly of Japanese eel (<i>Anguilla japonica</i>) provides insights into genome evolution after the teleost-specific genome duplication.	Kai Wら	BMC Genomics	15	233-	2014	4
14	①	水産研究・教育機構	Decreasing dietary lipids improves larval survival and growth of Japanese eel <i>Anguilla japonica</i>	Furuita Hら	Fisheries Science	80(3)	581-587	2014	5
15	①	水産研究・教育機構	Vertical distribution of transparent exopolymer particle (TEP) concentration in the oligotrophic western tropical North Pacific	Kodama Tら	Marine Ecology Progress Series	513	29-37	2014	10
16	②	水産研究・教育機構	Progression in artificial seedling production of Japanese eel <i>Anguilla japonica</i>	Tanaka H	Fisheries Science	81(1)	11-19	2015	1

(2)学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	誘発産卵処理に伴う雄ウナギの精液性状の変化.	三浦頭ら	近畿大学、水産研究・教育機構	日本水産学会	2012	3
2	ウナギの人工種苗生産に関する研究	田中秀樹	水産研究・教育機構	平成24年度日本農学賞受賞講演会	2012	4
3	ウナギ完全養殖と今後の展開	増田賢嗣	水産研究・教育機構	海洋生物活性談話会	2012	5
4	ウナギの種苗生産と展望	田中秀樹	水産研究・教育機構	第10回因島種苗生産技術交流会	2012	8
5	酵素処理魚粉を用いた懸濁態飼料のウナギ仔魚に対する餌料価値	神保忠雄ら	水産研究・教育機構	日本水産学会秋季大会	2012	9

6	日本のウナギ種苗生産技術開発の歴史と現状	田中秀樹	水産研究・教育機構	人工種苗生産技術に関する国際ワークショップ	2012	10
7	シラスウナギ安定生産に向けた取り組み～ウナギ完全養殖達成の意義～	今泉均	水産研究・教育機構	平成24年度宮崎県高等学校教育研究会地理歴史公民科研究会第48回地理研究会中部支部大会	2012	11
8	Effect of 17 α -hydroxyprogesterone administration on the ionic composition of seminal plasma in artificially matured male Japanese eel <i>Anguilla japonica</i> .	Miura Aら	近畿大学、水産研究・教育機構	第10回日韓・韓日水産増殖シンポジウム	2012	12
9	ウナギ仔魚に対するサメ卵および鶏卵黄の脱脂による栄養価改善	古板博文ら	水産研究・教育機構	日本水産学会春季大会	2013	3
10	鶏卵黄主体飼料を給餌したウナギ仔魚の成長、生残および変態	永尾次郎ら	水産研究・教育機構	日本水産学会春季大会	2013	3
11	組換えウナギ生殖腺刺激ホルモンを恒常発現する哺乳類細胞株の樹立および得られたホルモンの生物活性の検討	風藤行紀ら	水産研究・教育機構、近畿大学、東京海洋大学	平成24年度水産学会春季大会	2013	3
12	ウナギ精子の凍結保存後の運動活性におよぼす凍害防御剤と冷却速度の影響	辻吉晃ら	近畿大学、水産研究・教育機構	日本水産学会	2013	3
13	雄ウナギの誘発産卵方法が精液性状と受精成績に及ぼす影響	三浦頭ら	近畿大学、水産研究・教育機構	日本水産学会	2013	3
14	ddRADseq法による効率的なSNPジェノタイピング –ニホンウナギのSNPジェノタイピング–	甲斐渉ら	水産研究・教育機構	日本水産学会	2013	3
15	Ion PGMTMシステムを用いた水産生物のSNPおよびSTRマーカー開発	甲斐渉ら	水産研究・教育機構	Ion Torrentユーザーグループミーティング	2013	7
16	ニホンウナギ完全養殖の展望	田中秀樹	水産研究・教育機構	国際漁業学会2013年度大会 シンポジウム	2013	8
17	組換えウナギ生殖腺刺激ホルモン投与による雄ウナギ人為催熟および得られた精液の性状解析	尾崎雄一ら	水産研究・教育機構	平成25年度水産学会秋季大会	2013	9
18	濾胞刺激ホルモンおよび黄体形成ホルモンの雌ウナギにおける成熟誘起作用の解析	伊藤理紗ら	水産研究・教育機構、静岡水技研、東京海洋大学	平成25年度水産学会秋季大会	2013	9
19	ウナギ精巣からの新たな17 β -水酸基脱水素酵素のクローニングおよびその特性解析	鈴木博史ら	水産研究・教育機構、東京海洋大学	平成25年度水産学会春季大会	2013	9
20	鰻と穴子のはなし～産卵場の解明、資源の現状と適切な利用のために	黒木洋明	水産研究・教育機構	横研協・研究フォーラム	2013	11
21	ニホンウナギ精子の凍結保存と凍結前精子の調整方法	辻吉晃ら	近畿大学、水産研究・教育機構	日本水産学会	2014	3
22	大型ストロー容器によるニホンウナギ精子の凍結保存技術の開発	野村和晴ら	近畿大学、水産研究・教育機構	日本水産学会	2014	3

23	ウナギ人工授精時の精子の質と量の測定方法	太田博己ら	近畿大学、水産研究・教育機構	日本水産学会	2014	3
24	1kL規模の水槽によるウナギ仔魚飼育法の開発	増田賢嗣ら	水産研究・教育機構	平成26年度日本水産学会春季大会	2014	3
25	Mass production of Japanese eel recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone by a stable expression system: They fully induced ovarian development at a differential mode.	Kazeto Y. ら	水産研究・教育機構、東京海洋大学	10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish.	2014	5
26	Evaluation of spermatogenesis and milt quality in the Japanese eel matured by recombinant eel gonadotropin injections.	Ozaki Y. ら	水産研究・教育機構、東京海洋大学	10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish.	2014	5
27	ニホンウナギ完全養殖技術の開発	田中秀樹	水産研究・教育機構	前立腺生物学シンポジウム伊勢志摩2014	2014	6
28	ニホンウナギ17 β -水酸基脱水素酵素 type 7 のクローニングおよびその特性解析	伊藤理紗ら	水産研究・教育機構、東京海洋大学	平成 26 年度水産学会秋季大会	2014	9
29	ウナギ仔魚の体成分および消化酵素活性に及ぼす飼料の影響	古板博文ら	水産研究・教育機構	日本水産学会秋季大会	2014	9
30	集積流体回路技術とNGSによるSSRマーカーのハイスループットジェノタイピングの可能性	野村和晴ら	水産研究・教育機構	日本動物遺伝育種学会	2014	10
31	シラスウナギ大量生産に向けた取り組み	今泉均	水産研究・教育機構	日本水産学会九州支部例会 シンポジウム	2014	11
32	Mass production of recombinant Japanese eel follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone: their differential actions on gametogenesis in vivo.	Kazeto Y. ら	水産研究・教育機構、東京海洋大学、静岡水技研	International Conference on Frontiers in Comparative Endocrinology and Neurobiology 2014	2014	11
33	アクセスアレイとIon PGMを用いたSSRマーカーの迅速なジェノタイピング手法の開発	野村和晴ら	水産研究・教育機構	DNA鑑定学会	2014	12
34	ニホンウナギの幼生期間および変態後の形態に関するQTL解析	野村和晴ら	水産研究・教育機構	日本水産学会	2015	3
35	ウナギ変態期における比較トランスクリプトーム解析	尾島信彦ら	水産研究・教育機構	日本水産学会	2015	3

36	魚肉タンパクを原料とする飼料によって、サメ卵を用いずにウナギ仔魚の飼育に成功	増田賢嗣	水産研究・教育機構	日本水産学会秋季大会	2015	9
37	ウナギの種苗生産技術の進展	増田賢嗣	水産研究・教育機構	鹿児島県ウナギ資源増殖対策協議会勉強会	2015	10
38	ウナギの種苗生産技術の進展	増田賢嗣	水産研究・教育機構	第8回北陸合同バイオシンポジウム	2015	10
39	Development of diets for larvae of Japanese eel <i>Anguilla japonica</i> in captivity	Furuita H	水産研究・教育機構	Danish Life Science Seminar	2015	9
40	Mapping of quantitative trait loci (QTL) associated with timing of metamorphosis from leptocephali to glass eels in Japanese eel (<i>Anguilla japonica</i>)	Nomura Kら	水産研究・教育機構	Plant and animal genome XXIV	2016	1
41	ニホンウナギの遺伝育種に関する基礎研究	野村和晴ら	水産研究・教育機構	日本水産学会	2016	3
42	ニホンウナギ雄へのリコンビナントLH投与後の時間経過に伴う射精量と精液性状の変化	太田博巳ら	水産研究・教育機構、近畿大学	平成28年度水産学会春季大会	2016	3
43	不透明な1kL水槽1基によりシラスウナギ441尾の生産に成功	増田賢嗣ら	水産研究・教育機構	平成27年度日本水産学会秋季大会	2015	9
44	ウナギの種苗生産技術の進展	増田賢嗣	水産研究・教育機構	第29回海洋生物活性談話会	2016	5
45	組換えウナギ濾胞刺激ホルモンと黄体形成ホルモンの割合を変化させて催熟した場合の卵濾胞の発達に及ぼす影響	田中寿臣ら	静岡水技研、水産研究・教育機構	平成28年度日本水産学会秋季大会	2016	9
46	Sexual maturation in male Japanese eel injected with recombinant eel gonadotropins.	Ozaki Y. ら	水産研究・教育機構、東京海洋大学	22th International Congress of Zoology.	2016	11

(3) 出版図書

区分：①出版著書、②雑誌(注)(1)学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
1	④	シラスウナギの量産技術開発の現状と課題	増田賢嗣	水産研究・教育機構	農林水産技術情報協会	2012	10
2	①	うな井の未来:ウナギの持続的利用は可能か～ウナギ人工種苗生産技術への取り組み - 経過と現状	田中秀樹	水産研究・教育機構	青土社	2013	11
3	②	進展するウナギの種苗生産技術	増田賢嗣	水産研究・教育機構	生物研究社	2015	2
4	④	ニホンウナギの仔魚飼育に大型水槽で成功	増田賢嗣	水産研究・教育機構	農林水産・食品産業技術振興協会	2015	5
5	②	人工種苗生産技術の産業化までの見通し～大型水槽開発、新規飼料原料利用などによる進展とこれから～	増田賢嗣	水産研究・教育機構	緑書房	2015	11

(4) 国内特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日
1	ウナギ仔魚の飼育方法および飼育装置並びに飼育用の容器	野村和晴, 田中秀樹, 古板博文	水産総合研究センター	水産研究・教育機構	特許権	特願2013-264791	2013年12月24日	
2	光によって水槽底部に集まる性質を持つ仔魚の飼育方法及び装置	増田善嗣、神保忠雄、今泉均	水産総合研究センター	水産研究・教育機構	特許権	特願2013-051696	2013年3月14日	
3	ウナギ仔魚の飼育方法及び装置	増田善嗣、神保忠雄	水産総合研究センター	水産研究・教育機構	特許権	特願2013-263898	2013年12月20日	

(5) 国際特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	出願国
1	Procédé et dispositif pour cultiver des larves eel	増田善嗣、神保忠雄	水産総合研究センター	水産研究・教育機構	特許権	PCT/JP2014-83852	2014年12月22日		

(6)報道等

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名等	掲載年	掲載月	掲載日	機関名	備考
②	世界と日本 大図解シリーズNo.1039 日本人とうなぎ	東京新聞・中日新聞	2012	4	15	水産研究・教育機構	
③	スーパー特報 22日は春の土用の丑 ウナギ高騰 蒲焼きが消える!? スーパーニュース	東海テレビ	2012	4	16	水産研究・教育機構	
③	まるトクZIP! す・またん! ZIP	よみうりテレビ	2012	4	20	水産研究・教育機構	
③	ちちんぷいぷい	毎日放送	2012	5	18	水産研究・教育機構	
④	つぼイノリオの聞けば聞くほど	CBCラジオ	2012	5	28	水産研究・教育機構	
③	ニッポンの正念場 激減!ウナギ文化を守れ! 山浦ひさしのトコトン!1スタ	テレビ愛知	2012	6	5	水産研究・教育機構	
③	“ウナギ高騰”に異変 ワールドビジネスサテライト	テレビ東京	2012	6	11	水産研究・教育機構	
②	ウナギふ化率向上 県水技研 浜名湖分場 20→50%稚魚量産希望の光	中日新聞	2012	6	22	静岡水技研	
②	生活調べ隊 大量生産へ 進む生態解明 河川環境改善で保護活動も	読売新聞	2012	7	10	水産研究・教育機構	
③	ウナギ激減本当の理由と完全養殖への道のり 報道特集	TBSテレビ、CBCテレビ	2012	7	14	水産研究・教育機構	
③	あなたの知らないウナギの話! サキどり↑	NHK総合	2012	7	15	水産研究・教育機構	
④	気になる“ウナギ”の値段 その影に知られざる生態 ラボラジオ	NHKラジオ	2012	7	16	水産研究・教育機構	
②	ニュースなう うなぎ値上がりか心配	CHUNICHIこどもウィークリー	2012	7	21	水産研究・教育機構	
②	ウナギ「完全養殖」本腰 高騰抑制切り札なるか 水産庁方針 5年後、稚魚1万匹めざす	中日新聞	2012	7	26	水産研究・教育機構	
③	食卓からウナギが消える～産地の苦闘と資源保護の最前線	NHK総合	2012	7	26	水産研究・教育機構	
③	土用の丑の日 うなぎが高騰でも..かんさい情報ネットten!	よみうりテレビ	2012	7	27	水産研究・教育機構	
②	稚魚の完全養殖実用化計画 期待もウナギ上り 不漁で価格高騰 給餌の省力化、プランクトン培養	東京新聞	2012	7	27	水産研究・教育機構	
③	まるごと生活情報局 やじうまテレビ	テレビ朝日	2012	7	27	水産研究・教育機構	
③	ウナギはどこへ行った? サイエンスZERO	NHK Eテレ	2012	8	19	水産研究・教育機構	

②	TOKAIワイド ひと輝いて 壁乗り越え 世界初の稚魚飼育に成功	毎日新聞	2012	10	2	水産研究・教育機構	
②	TOKAIワイド ひと輝いて 大・小規模の水槽で実用化を模索 理想の養殖、天然と人工の両立で	毎日新聞	2012	10	9	水産研究・教育機構	
②	科学 ウナギ 餌はマリンスノー 「完全養殖」量産化に期待	読売新聞	2012	12	13	水産研究・教育機構	
②	ニホンウナギ 絶滅危惧種 環境省指定 乱獲やダム影響 希少ウナギ 影響は 絶滅危惧種指定 価格高騰懸念も 三重の増養殖研「人工量産 研究急ぐ」	毎日新聞	2013	2	1	水産研究・教育機構	
④	TOKYO MORNING RADIO(ナビゲーター:別所哲也)KONICA MINOLTA MORNING VISION	J-WAVE	2013	2	7	水産研究・教育機構	
④	不思議の海 「旅するウナギの謎」日経サイエンス編集部編	別冊日経サイエンス	2013	6	19	水産研究・教育機構	
③	おはよう日本	NHK総合	2013	7	6	水産研究・教育機構	
③	ニュース キャッチ!	中京テレビ	2013	7	15	水産研究・教育機構	
②	「ウナギ瀬戸際 それでも食卓へ」	日本経済新聞	2013	7	16	水産研究・教育機構	
④	福井謙二のグッモニ	文化放送	2013	7	16	水産研究・教育機構	
④	私も一言夕方ニュース	NHKラジオ	2013	7	17	水産研究・教育機構	
③	ドデスカ!	メーテレ	2013	7	19	水産研究・教育機構	
③	ウェークアップ! ぷらす	よみうりテレビ	2013	7	20	水産研究・教育機構	
③	Nスタ	TBSテレビ	2013	7	22	水産研究・教育機構	
③	みのもんたの朝ズバッ!	TBSテレビ	2013	7	22	水産研究・教育機構	
④	武内裕之That's On Time	KBCラジオ	2013	8	1	水産研究・教育機構	
④	「ウナギが食卓から消える? 危機的な資源量を回復させる方法を考える」	ニュートン 2013年8月号	2013	8	7	水産研究・教育機構	
②	「ウナギを守れ 完全養殖 量産技術磨く」	読売新聞	2013	8	23	水産研究・教育機構	
②	「社説 ウナギの語りかけること」	中日新聞	2013	8	25	水産研究・教育機構	

④	中西一清 スタミナラジオ	RKBラジオ	2013	8	26	水産研究・教育機構	
②	「SUNDAY NIKKEY サイエンス ウナギ、絶滅から守れ 生態に迫り対策を探る」	日本経済新聞	2013	9	1	水産研究・教育機構	
③	ニュース5ちゃん	福岡放送	2013	9	6	水産研究・教育機構	
①	大型水槽によるニホンウナギ仔魚の飼育が可能になりました！	水産総合研究センター	2014	2	12	水産研究・教育機構	
②	ニホンウナギ仔魚飼育 大型水槽で成功	日刊工業新聞	2014	2	13	水産研究・教育機構	
③	大型水槽でシラスウナギの生育に成功、大量生産に光	静岡放送	2014	2	13	水産研究・教育機構	
②	人工ふ化したウナギ仔魚 大型水槽で育成成功	伊豆新聞	2014	2	15	水産研究・教育機構	
②	大型水槽で仔魚飼育可能に	日本養殖新聞	2014	2	25	水産研究・教育機構	
③	シラスウナギの最新事情	日本テレビ	2014	3	10	水産研究・教育機構	
③	主要産地でシラスウナギ豊漁！？今年のウナギは安くなる？	TBS	2014	3	11	水産研究・教育機構	
④	日本最先端のアタマの中身 日本人のソウルフードに異変アリ！ ウナギ	ケトル誌	2014	4	10	水産研究・教育機構	
③	ニュース キャッチ！	中京テレビ	2014	6	12	水産研究・教育機構	
③	ワイドニュース	三重テレビ	2014	6	18	水産研究・教育機構	
③	かんさい情報ネット ten！	よみうりテレビ	2014	6	20	水産研究・教育機構	
②	「ウナギ好き日本の切り札 学者ら結束、増やす道探る」	日本経済新聞	2014	6	27	水産研究・教育機構	
②	「完全養殖 安定供給の切り札 ウナギとマグロ 天然に頼らない」	産経新聞	2014	7	14	水産研究・教育機構	
③	くらし☆(きらり)解説	NHK総合	2014	7	24	水産研究・教育機構	
②	「完全養殖 ウナギ救うか 食文化の危機に光」	東京新聞	2014	7	27	水産研究・教育機構	
②	「研究進むウナギ完全養殖 安定供給と自然保護両立 実用化、飼育法など課題」	産経新聞	2014	7	28	水産研究・教育機構	
②	「ウナギ、完全養殖で救え 孵化は成功、ただし値段は・・・」	朝日新聞	2014	7	28	水産研究・教育機構	
②	「ウナギ完全養殖広がれ」	中日新聞	2014	7	29	水産研究・教育機構	

④	午後のまりやーじゅ	NHKラジオ	2014	7	31	水産研究・教育機構	
③	未来シアター	日本テレビ	2014	8	22	水産研究・教育機構	
③	UP!	メーテレ	2014	9	19	水産研究・教育機構	
③	ニュートンのリンゴ	青森放送	2014	12	7	水産研究・教育機構	
④	旅するウナギの謎をとく	化学と工業	2015	7	1	水産研究・教育機構	
③	BS1スペシャル ウナギ 未来への旅	NHK BS1	2015	7	18	水産研究・教育機構	
③	新クイズ面白ゼミナール	NHK BS1	2015	7	23	水産研究・教育機構	
②	鰻仔魚飼育の大型水槽初公開	日本養殖新聞	2015	8	25	水産研究・教育機構	
②	赤ちゃんウナギ 魚粉で育成	静岡新聞	2015	9	25	水産研究・教育機構	
③	金とくスペシャル ウナギを未来へ～神秘の魚を絶滅から守れ	NHK総合	2015	9	25	水産研究・教育機構	
②	魚粉ベースの資料で レプトからシラスに	日本養殖新聞	2015	10	15	水産研究・教育機構	
②	ふしぎ科学館 ウナギの謎を追え!	読売新聞	2016	3	5	水産研究・教育機構	
③	世界が驚いたニッポン! スゴイデスネ視察団!!	テレビ朝日	2016	7	9	水産研究・教育機構	
③	ピタゴラスイッチ「こんなところにシーソーがあります」	NHK Eテレ	2016	12	24	水産研究・教育機構	
②	<まる見えレポート>ウナギの完全養殖 量産化に期待	伊勢新聞	2017	1	16	水産研究・教育機構	

(7) 普及に移しうる成果

区分: ①普及に移されたもの、製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの

区分	成果の名称	機関名	普及(製品化) 年月	主な利用場面	普及状況
	該当無し				

(8)発表会の主催の状況
(シンポジウム・セミナー等を記載する。)

整理番号	発表会の名称	年月日			開催場所	参加者数	機関名	備考
	該当無し							

(9)アウトリーチ活動の状況

当事業の研究課題におけるアウトリーチ活動の内容は以下のとおり。

区分：①一般市民向けのシンポジウム、講演会及び公開講座、サイエンスカフェ等、②展示会及びフェアへの出展、大学及び研究所等の一般公開への参画、

③その他(子供向け出前授業等)

整理番号	区分	アウトリーチ活動	年月日			開催場所	参加者数	主な参加者	機関名	備考
1	①	一色うなぎ漁業協同組合研究会「シラスウナギ生産技術の現状と展望」	2012	5	22	吉良観光ホテル		養鰻業者、加工・流通関係者	水産研究・教育機構	
2	①	全国鰻蒲焼商組合連合会 研修会「完全養殖の最新情報」	2012	6	6	三笠会館		蒲焼き商、加工・流通関係者	水産研究・教育機構	
3	①	全国養鰻漁業協同組合連合会 第10回通常総会講演「シラスウナギ安定生産に向けた取り組み」	2012	6	8			養鰻業者、加工・流通関係者	水産研究・教育機構	
4	①	東海地域生物系先端技術研究会 平成24年度第2回セミナー「ウナギの完全養殖技術の開発」	2012	10	23	ウインクあいち(愛知県産業労働センター)		一般、企業関係者	水産研究・教育機構	
5	①	なごや環境大学～地域ブランドを訪ねて「ウナギの完全養殖技術」	2012	11	7	ウィルあいち(愛知県女性総合センター)		一般	水産研究・教育機構	
6	③	テクノオーシャン主催こどもシンポジウム“新発見海のせかい教室”中のセッション“大回遊する生き物のふしぎ”「ウナギ仔魚の大回遊と大変身」	2012	11	18	神戸国際展示場		児童	水産研究・教育機構	
7	①	シニア自然大学校 森里海連環の時代を拓くI-生き物に見る森里海のつながり-「川と海を往復するウナギの生活史を飼育実験より探る」	2013	2	9	大阪市立環境学習センター 生き生き地球館		一般	水産研究・教育機構	
8	①	ナレッジキャピタル『THE 世界一展』「絶滅危惧!? ニホンウナギを救う“完全養殖技術”」	2013	5	7	グランフロント大阪		一般	水産研究・教育機構	

9	①	ミュージアムパーク茨城自然博物館 第58回企画展「ぎょ・魚・漁-淡水魚の知られざる生態を追って-」記念講座「ウナギの完全養殖への挑戦」	2013	7	13	ミュージアムパーク茨城自然博物館	一般	水産研究・教育機構
10	①	東アジアウナギ資源協議会 公開シンポジウムEASEC Japan 2013. 「ウナギ人工種苗生産技術への取り組み-経過と現状」	2013	7	22	東京大学農学生命科学研究科 弥生講堂一条ホール	養鰻業者、蒲焼き商、加工・流通関係者、学生、研究者、一般	水産研究・教育機構
11	①	第34回ウナギ供養祭「ニホンウナギ完全養殖の現状」	2013	10	18		養鰻業者、加工・流通関係者	水産研究・教育機構
12	①	ウナギ資源保護・増殖のための勉強会「ウナギ人工種苗生産技術への取り組みと今後の展望」	2013	10	18		養鰻業者、加工・流通関係者	水産研究・教育機構
13	①	全国養鰻業者青壮年部連合会全国大会「ウナギ人工種苗生産技術の現状と課題」	2013	10	22	ホテルアソシア豊橋	養鰻業者、加工・流通関係者	水産研究・教育機構
14	①	中日懇話会『「ウナギ完全養殖」の成功 ～天然資源に依存しないウナギの生産～』	2013	10	30	名古屋東急ホテル	一般	水産研究・教育機構
15	①	全蒲連研修会「うなぎの完全養殖の進捗状況・量産化は何時」	2013	11	6	三笠会館	蒲焼き商、加工・流通関係者	水産研究・教育機構
16	①	特別講座「ウナギ産卵場の謎に挑戦～海洋調査の実際、その意義」	2013	11	19	埼玉県立上尾鷹の台高等学校	学生	水産研究・教育機構
17	①	第3回食と健康に関するシンポジウム～進化する鹿児島島の食材～「シラスウナギ安定生産に向けた取り組み～完全養殖の展望～」	2013	11	19	鹿児島大学稲盛会館	一般、学生、研究者、企業関係者	水産研究・教育機構
18	①	全鰻連総会「シラスウナギ大量生産を目指す取り組みの現状」	2014	6	13	KKRホテル熊本	養鰻業者、加工・流通関係者	水産研究・教育機構
19	①	東アジアウナギ資源協議会 公開シンポジウムEASEC Japan 2014. 「人工種苗生産技術への取り組み」	2014	7	27	東京大学農学生命科学研究科 弥生講堂一条ホール	養鰻業者、蒲焼き商、加工・流通関係者、学生、研究者、一般	水産研究・教育機構
20	①	テクノオーシャン2014 オーガナイズドセッション ウナギ研究最前線「ウナギ完全養殖までのあゆみ」	2014	10	3	神戸国際展示場	一般、学生、研究者	水産研究・教育機構

21	①	テクノオーシャン2014 オーガナイズドセッション ウナギ研究最前線「ウナギ仔魚飼育のこれから」	2014	10	3	神戸国際展示場		一般、学生、研究者	水産研究・教育機構	
22	①	日本技術士会水産部会講演会・研究発表会「ウナギ人工種苗生産にかかわる技術開発」	2014	11	8	葺手ビル		水産技術士	水産研究・教育機構	
23	③	夢のたまご塾「ウナギの謎を解き明かし完全養殖の実用化を目指す」	2015	8	8	飛騨流葉山荘		児童・生徒	水産研究・教育機構	
24	①	社会貢献への歩み講座「ウナギ人工種苗量産への取り組み」	2015	10	27	勤労青少年水上スポーツセンター		児童・生徒・一般	水産研究・教育機構	
25	①	鹿児島県ウナギ資源増殖対策協議会勉強会「ウナギの種苗生産技術の進展」	2015	10	29			養鰻業者、加工・流通関係者	水産研究・教育機構	
26	①	全日本持続的養鰻機構新春講演会「うなぎの人工種苗～研究の歴史と量産の見通しについて」	2016	1	29	ANAクラウンプラザホテル		養鰻業者、加工・流通関係者	水産研究・教育機構	
27	①	平成28年度一色うなぎ漁業協同組合研究会「人工種苗生産の現状と展望」	2016	5	24	吉良観光ホテル		養鰻業者、加工・流通関係者	水産研究・教育機構	