

## 冷水病に強く、良く釣れる人工産アユ種苗の開発と利用

### 冷水病耐病性、釣獲特性、遺伝的特性の系統間差

桑田知宣, 景山哲史, 大原健一, 原徹, 斉藤 薫

Increased resistance to an infectious cold-water disease and the improved catchability on “TOMO-ZURI” angling, using selective breeding in ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*)

Difference in the resistance to cold-water disease, catchability on “TOMO-ZURI” angling and genetic profile among the three strains

TOMONORI KUWADA, KAGEYAMA TETSUSHI, OHARA KENICHI, TORU HARA, AND KAORU SAITO

岐阜県のアユ (*Plecoglossus altivelis*) 漁獲量は1992年の1,726tをピークに減少し、2005年には461tまで落ち込んだ。<sup>1)</sup> このアユ漁業不振の原因の一つとして、河川における冷水病の発生が挙げられる。<sup>2)</sup> 冷水病は冷水病菌 (*Flavobacterium psychrophilum*) を原因とする感染症であるため、<sup>3)</sup> その被害を軽減するためには、保菌種苗の移植放流を中止し、河川内への冷水病菌の持ち込みを防止することが重要である。<sup>4)</sup> 実際、冷水病菌を保菌していない人工産種苗を上流河川に単独で放流することにより、友釣り解禁日までは冷水病の発生を抑制できることが示されている。<sup>5-9)</sup> しかし、おとりアユの移動などによって水域間のアユの移動が活発になる友釣り解禁後については、感染を防止して冷水病の発生を抑制することは困難である。<sup>6,9)</sup> 従って、冷水病被害を軽減するためには、防疫による感染防止策だけではなく、感染の拡大を前提とした被害抑制策が必要である。アユの冷水病に対する耐病性には系統差があるため、<sup>10-15)</sup> 被害抑制策の有力な選択肢として耐病性系統の利用が考えられる。しかし、耐病性を有するとされる海産系人工産種苗は、漁期前半から中盤にかけての釣獲特性が劣るため、その放流効果は他種苗と比べて必ずしも高くない。<sup>6)</sup> そこで2004年より冷水病耐病性と優れた釣獲特性を併せ持つ系統の選抜育種に着手した。<sup>14,15)</sup> ただし、選抜された系統は天然遡上アユと遺伝的に異なり、交雑を介して天然アユ資源に悪影響を及ぼす可能性があるため、<sup>16,17)</sup> その放流は慎重に行なわなければならない。このため、当所は、選抜育種により作出した種苗の放流は複数のダムにより天然遡上アユの産卵場と隔離された閉鎖性水域に限定するという方針のもと、新規人工産種苗の開発に取り組んでいる。

選抜によって作出されたこのような種苗を放流魚として利用する場合には、(1)放流種苗としての有用性の確認、(2)天然アユ資源に遺伝的な影響を及ぼさない利用方法の確立、(3)放流によるリスクの回避方法およびその管理に関する流域の関係者の合意形成の三点が必要である。ここでいう有用性とは、開発した種苗が既存種苗より優れた生残性、釣獲特性を有し、高い放流効果を示すことである。本研究では、室内における冷水病の感染試験により新規に開発したアユ種苗 (第4代) の耐病性の評価を行い、さらに、実際の河川に放流して、新規開発種苗の河川における冷水病耐病性と釣獲特性を既存種苗と比較した。一方、天然アユ資源に遺伝的な影響を及ぼさないという点では、ダム上流域の閉鎖性水域に放流するというだけでは、放流されたアユがダム下流へと流下

する可能性を否定できない。そのため、放流エリアの限定に加えて、放流種苗の移動動態を調査することにより、それらが天然アユの産卵場に到達しないことを確認する必要がある。放流種苗の移動動態を調査するためには、追跡したい種苗と他の種苗や天然遡上アユを判別する技術が必要となる。天然遡上アユと人工産種苗は、外部形態<sup>18,19)</sup> 耳石の形態<sup>20)</sup>または微量元素分析<sup>21,22)</sup>、遺伝マーカーによる手法<sup>23)</sup>などによって識別できるが、今回のケースでは、人工産種苗の中から更に特定の種苗を判別できなければならない。そのためには、生息環境履歴が同様であっても判別可能な遺伝マーカーによる手法が適している。近年、マイクロサテライト DNA マーカーを用いた帰属性解析により、河川で採捕したアユの由来を個体毎に推定できるようになった。<sup>23)</sup> この手法を応用すれば、現在開発中の新規種苗と既存の人工産種苗を個体別に判別できると考えられる。そこで本研究では、6種類のマイクロサテライト DNA マーカーを用いて新規に開発中の種苗、既存の種苗、天然遡上アユの遺伝的特性を調査した。

キーワード：アユ、冷水病、耐病、種苗放流、遊漁、選抜育種、マイクロサテライト DNA

## 方 法

### 1. 実験感染による冷水病耐病性評価

#### 供試魚の作出履歴

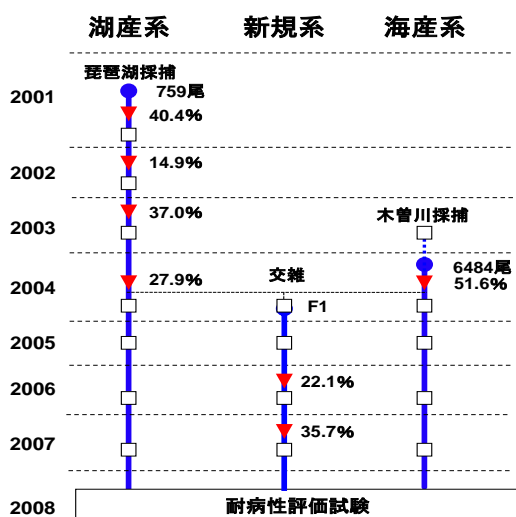
供試魚には、2007年9月～10月に岐阜県河川環境研究所で作出し養成した3種類の種苗を用いた。各種苗の作出履歴を第1図に示した。湖産系人工産種苗（以下湖産系）は琵琶湖において捕獲されたアユを起源とし、F4世代までは毎世代冷水病の生残魚群、F5世代（2005年）以降は冷水病未感染魚群を親魚に用いて継代した種苗（F7世代）である。海産系人工産種苗（以下海産系）は木曾川採捕アユを起源とし、F2世代作出時には冷水病の生残魚群、F3

世代（2005年）以降は冷水病未感染魚群を親魚に用いて継代した種苗（F5世代）である。新規系人工産種苗（以下新規系）は2004年10月に湖産系雌（F3）と海産系雄（F1）を交雑し、その群を起源として、F3世代（2006年）以降に人為感染により冷水病菌を感染させて生残した魚群を親魚に用いて継代した種苗（F4世代）である。

#### 実験感染による耐病性評価

種苗ごとに感染区3区と対照区1区の全12区を設けた。感染区の人為感染は、凍結病魚を用いた冷水病人為感染法<sup>24)</sup>により行った。すなわち、冷水病死亡魚を垂下した上部水槽で湖産系種苗を飼育し、その排水を各感染区水槽に導入することにより冷水病菌を感染させた。対照区の上部水槽には死亡魚を垂下しなかった。実験水槽には中央部から排水されるように加工した容量100Lの丸型タライ水槽

（直径65cm）を用いた。飼育水には井戸水（水温16.6±0.1℃）を用い、上部水槽から各試験水槽への注水量を50ml/秒、水深を16cmとした。供試魚は平均体重が5gとなるように調整し、水槽ごとに25尾ずつ収容した。観賞魚用の小型自動給餌器を用いて、水槽ごとに5g/日の配合飼料を給餌した。なお、感染区については冷水病の発生によって生残魚が減少するため、各区の死亡状況に併せて若干量の餌が残る程度に適宜給餌量を減じた。系統ごとに供試魚と同一飼育群のアユ30尾の鰓を用いて冷水病の保菌検査を行ったが、冷水病菌は検出されなかった。感染区の上部水槽に冷水病死亡魚を垂下して試験を開始した。試験開始から30日間の死亡状況を水槽ごとに記録するとともに、全ての死亡魚の腎臓および脾臓を用いて冷水病検査を行った。30日後に全ての水槽の生残魚を全て取り上げて腎臓および脾臓を用いて冷水病の保菌検査を行った。検査は、検査部位を改変サイトファーガ寒天培地<sup>25)</sup>に塗抹、4℃で



第1図 各系統の作出履歴

● 導入を表す ▼ 選抜を表す □ 継代を表す

図中の数値は導入尾数と選抜時の生残率を表す。

ユを起源とし、F2世代作出時には冷水病の生残魚群、F3

培養後、発現した黄色コロニーから DNA を熱抽出し、抽出した DNA を鋳型にプライマー *fpPPIC1*<sup>26)</sup> を用いた PCR を行い、電気泳動によって増幅産物を確認することによって行った。

### データ解析

種苗間の冷水病耐病性の差異を評価するために、各感染区の試験開始 30 日後の生残率を逆正弦変換した後に、種苗の違いが生残率に及ぼす影響を一元配置分散分析により確認後、各種苗間の平均生残率の違いについて Tukey の方法より多重比較を行った。

## 2. 標識放流による残留特性および釣獲特性評価

### 調査河川と放流種苗

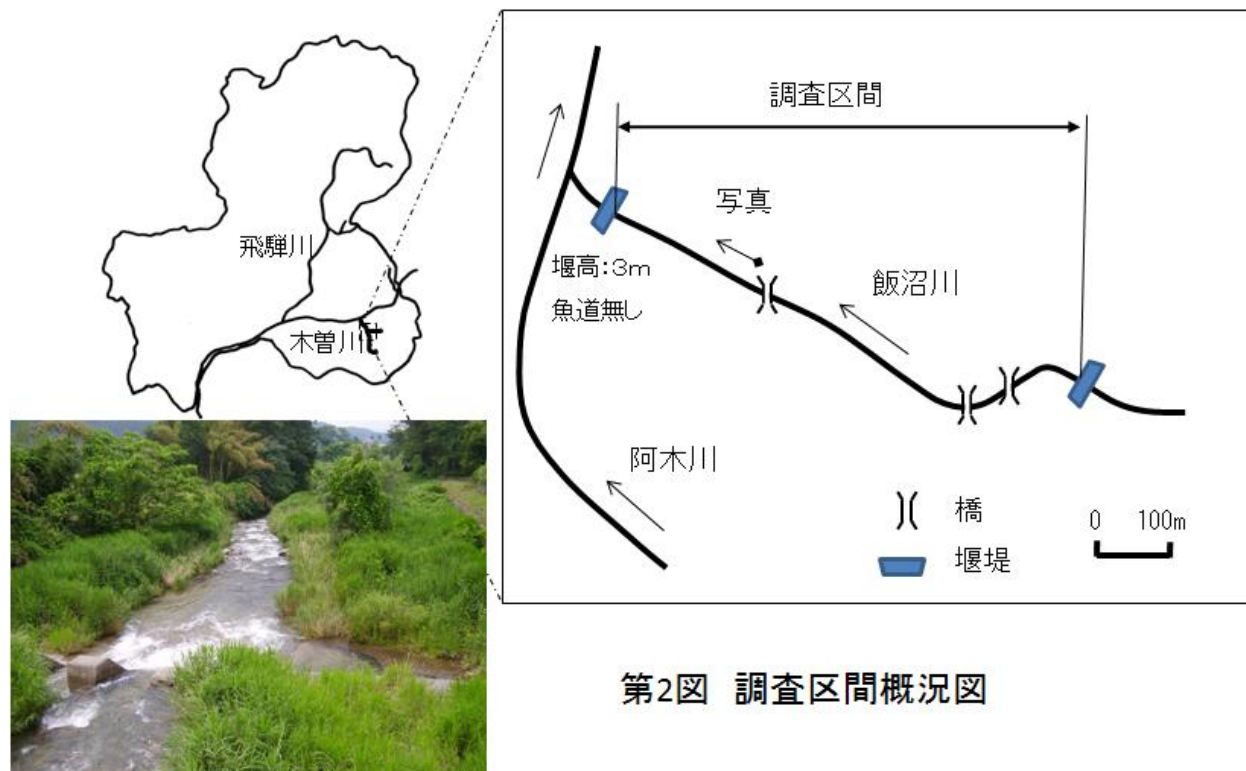
木曾川水系阿木川支流の飯沼川において調査を行った(第 2 図)。調査河川と天然遡上アユの産卵場との間には 5 つのダム(最大貯水量の合計は 20,873 万トン)が存在した。調査区間の流程は 715m で平均川幅は 9.3m であり、調査区間の下限および上限にはアユの遡上が困難な堰堤が存在する。自記式水温計により調査河川の水温を記録した。また、調査河川流域の雨量については国土交通省根の上雨量観測所の観測データを用いた。<sup>27)</sup> 放流魚には岐阜県河川環境研究所で生産した 2 種類の人工産種苗(海産系、新規系)と(財)岐阜県魚苗センターで生産した人工産種苗(湖産系)を用いた。海産系と新規系は前述の冷水病耐病性評価試験に用いた供試魚と同一の飼育群である。一方、

湖産系は、2002 年に岐阜県河川環境研究所産湖産系の受精卵を(財)魚苗センターに移送し、以後、同センターで継代飼育された種苗である。湖産系は脂鰭を、海産系は脂鰭と左腹鰭を、新規系は脂鰭と右腹鰭を切除して標識した。6 月 5 日に湖産系 333 尾、海産系 666 尾、新規系 333 尾を調査区間内の 2 地点に放流した。各系統の平均体重はそれぞれ湖産系が 6.7 g、海産系が 6.6 g、新規系が 6.8 g であり、系統間に有意差は認められなかった(一元配置分散分析  $F_{(2,89)} = 1.0$   $P > 0.05$ )。調査区間の放流密度は 0.15 尾/m<sup>2</sup>であった。放流魚の冷水病菌の保菌状況を調べるために、系統ごとに 30 尾を保菌検査に供したが、冷水病菌は検出されなかった。

なお、調査河川の友釣り解禁日は 7 月 10 日であり、調査区間およびその上流に本試験放流魚以外のアユは放流されていなかった。しかし、放流日(6/5)にはすでに他河川における友釣り漁が解禁されており、調査河川流域にはすでにおとりアユとして他河川で釣獲されたアユが蓄養されていた。

### 採捕方法と保菌検査

2007 年 7 月 10 日、9 月 3 日にエレクトリックショッカー(LR-24 ELECTRO FIFHER ; Smith-Root 社製)を用いて放流魚を採捕した。また、2007 年 7 月 13 日、7 月 30 日、8 月 21 日に友釣りにより放流魚を採捕した。7 月 10 日の採捕魚を除く全ての採捕魚を研究所に持ち帰り個体別に



第2図 調査区間概況図

体重を測定後、冷水病菌の保菌検査に供した。放流魚および採捕魚の保菌検査は、鰓および腎臓を用いて耐病性評価試験と同じ方法で行った。また、冷水病菌が検出された場合には、吉浦らの方法<sup>26)</sup>により検出された冷水病菌の遺伝子型判定を行った。

#### データ解析

採捕日の違いが各種苗の採捕割合に及ぼす影響および採捕方法の違いが各種苗の採捕割合に及ぼす影響を Fisher の正確確率検定により検定した。採捕方法ごとに各種苗の再捕率（累積再捕尾数／放流尾数×100）を求めるとともに、各種苗の釣られやすさ指数（友釣り累積再捕尾数／電気ショック累積再捕尾数）を求め、それらに関する種苗間の違いを Bonferroni の方法により有意水準を補正した Fisher の正確確率検定により検定した。

### 3. マイクロサテライト DNA 分析による遺伝的特性評価 供試魚およびサンプリング

2008年9月～10月に河川環境研究所で作出した湖産系（F8世代）、海産系（F6世代）、新規系（F5世代）のそれぞれ31、32、30個体を分析に用いた。サンプリングは2009年2月に行い、系統ごとに飼育池から採集した仔魚を99.5%エタノール中で分析まで保存した。一方、比較のための天然集団として、2006年3月～5月に長良川河口堰の魚道で採捕した遡上アユ66尾を分析に用いた。採捕個体の腹鰭を個体別に採取し、99.5%エタノール中で分析まで保存した。

#### マイクロサテライト DNA の検出

採取、保存した仔魚または腹鰭から、Gentra Puregene Cell Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。マイクロサテライト DNA 分析には、アユが開発された6ローカス (*Pal-5*、*Pal-6*、*Pal-42*、*Pal-191*、*Pal-194*、*Pal-199*) を用いた。<sup>28, 29)</sup> ローカスごとに5'末端に蛍光標識したリバースプライマーを用いた (D2、D3、D4)。PCRは全量10 $\mu$ lの反応液で行い。反応液は、0.25unit Taqポリメラーゼ (TaKaRa EX Taq Hot Start Version, TaKaRa)、1 $\mu$ l 10×PCR Buffer、0.8 $\mu$ l 25mM dNTP Mixture 0.1 $\mu$ l プライマー (1pmol/ $\mu$ l)、DNA溶液 1 $\mu$ l、6.95 $\mu$ l 超純水の計10 $\mu$ lとした。増幅装置には TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa) を用いた。温度条件は、94℃で1分間の変性後、94℃で30秒変性、54℃ (*Pal-5*、*Pal-6*、*Pal-199*) または 58℃ (*Pal-42*、*Pal-191*、*Pal-194*) で30秒アニーリング、72℃で30秒伸張のサイクルを35回行い、72℃で7分の伸張とした。電気泳動は、CEQ™8000 (BECKMAN COULTER) により行った。泳動サンプルの調整、電気泳動条件等

は添付のマニュアルに従った。CEQ サイズスタンダード 400 (BECKMAN COULTER) を同時に泳動し、CEQ™8000 Series Genetic Analysis System Software Ver. 9.0 (BECKMAN COULTER) により、フラグメント解析を行い、アリルのサイズを決定した。

#### データ解析

各標本集団におけるアリル頻度、ヘテロ接合体率の観察値 ( $H_o$ ) と期待値 ( $H_e$ ) の算出、およびハーディーワインベルグ ( $H \cdot W$ ) 平衡からの逸脱の有無の検討については GENEPOP4.0<sup>30)</sup> により行った。アリル頻度の均一性の検定および  $H \cdot W$  平衡からの逸脱に関する検定ではマルコフ連鎖法のパラメーターを 1,000 Dememorization、100 batches、1,000 iterations per batch に設定した。また、Allelic richness を FSTAT2.9.3.2<sup>31)</sup> により計算した。各標本集団間の Pairwise  $F_{st}$  値を ARLEQUIN3.11<sup>32)</sup> により計算した。アリル頻度の均一性、 $H \cdot W$  平衡からの逸脱に関する検定、および Pairwise  $F_{st}$  値の有意性について検定を行う場合には、Bonferroni の方法により有意水準を補正した。

#### 帰属性解析による判別

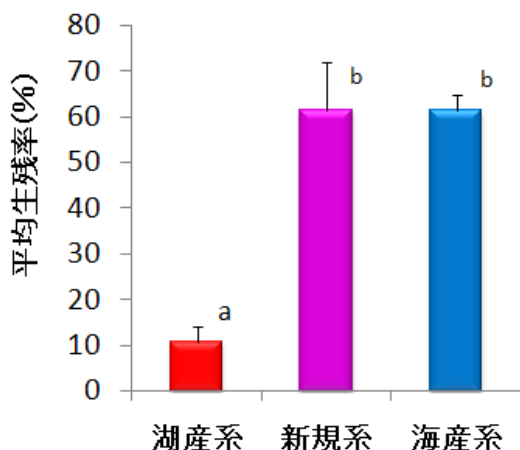
帰属性解析は GeneClass2<sup>33)</sup> により行った。遺伝情報に基づく帰属性解析により、任意の2組の標本集団の解析サンプルが混合した場合を想定し、遺伝情報に基づく帰属先と本当の由来を比較して、標本集団の組み合わせごとに判別率を求めた。

## 結 果

### 1. 実験感染による冷水病耐病性評価

試験期間中の対照区の死亡は、全水槽を通じて2尾のみであり、対照区に冷水病は発生しなかった。また、試験終了時の対照区の魚からも冷水病菌は検出されなかった。感染区では全水槽で冷水病が発生した。感染区の死亡魚の94% (118/125) から冷水病菌が検出された。また、感染区の試験終了時の生残魚の冷水病菌検出率は、湖産系が75% (6/8)、新規系が24% (11/46)、海産系が15% (7/46) であった。冷水病による死亡は、試験開始8日後より始まり、17日後まで多発したが、以後散発的になり、26日後以降は認められなかった。死亡の開始時期、盛期、終息時期に系統間で大きな違いは認められなかった。これに対して試験開始30日後の各系統の平均生残率は、海産系 F7 (61.3%)、新規系 F4 (61.3%)、湖産系 F5 (10.7%) の順で高く (第3図)、湖産系と海産系および新規系との間に有意な差が認められた (Tukey の方法  $P$

<0.05)。



第3図 冷水病実験感染30日後の各種苗の平均生存率

垂線は標準偏差を表す。  
同じアルファベット間には有意差がないことを示す (Tukeyの方法:  $P>0.05$ )。

第1表 電気ショックによる各種苗の採捕割合

採捕日	採捕尾数(尾)			計
	湖産系	新規系	海産系	
7月10日	4	9	18	31
9月3日	1	8	24	33
計	5	17	42	64
採捕割合 (%) *1	7.8	26.6	65.6	
電気ショック再捕率 (%) *2	1.5 <sup>a</sup>	5.1 <sup>b</sup>	6.3 <sup>b</sup>	

\*1 採捕割合は、全採捕尾数に占める各種苗の割合

\*2 電気ショック再捕率 (%) = 電気ショックによる累積採捕尾数 / 放流尾数 × 100  
同じアルファベット間には有意差がないことを表す (Bonferroniの方法により有意水準を補正したFisherの正確確率検定  $P>0.05$   $k=3$ )

第2表 友釣りによる各種苗の採捕割合

採捕日	採捕尾数(尾)			計
	湖産系	新規系	海産系	
7月13日	8	3	2	13
7月30日	8	3	6	17
8月21日	2	1	1	4
計	18	7	9	34
採捕割合 (%) *1	52.9	20.6	26.5	
友釣り再捕率 (%) *2	5.4 <sup>a</sup>	2.1 <sup>ab</sup>	1.4 <sup>b</sup>	
釣られやすさ指数 *3	3.6 <sup>a</sup>	0.4 <sup>b</sup>	0.2 <sup>b</sup>	

\*1 再捕割合は、採捕尾数に占める各系統の割合

\*2 友釣り再捕率 (%) = 友釣りによる累積再捕尾数 / 放流尾数 × 100

\*3 釣れやすさ指数 = 友釣りによる累積再捕尾数 / 電気ショックによる累積再捕尾数 × 100  
同一行内の同じアルファベット間には有意差がないことを表す (Bonferroniの方法により有意水準を補正したFisherの正確確率検定  $P>0.05$   $k=3$ )

## 2. 標識放流による残留特性および釣獲特性評価

### 調査河川の水況

調査河川の流域では6月20日から24日にかけて累積181mm、6月29日に累積74mm、8月23日から24日にかけて累積52mm、8月28日から30日にかけて累積77mmのまとまった雨が観測された。調査期間中の日間平均水温は、最低16.1℃、最高23.0℃であり、7月14日から8月29日まで47日間にわたり20℃以上の平均水温が続いた。

### 保菌検査結果

7月10日(13個体中12個体)および7月30日(17個体中1個体)に友釣りで採捕したアユより、遺伝子型A型の冷水病菌が検出された。8月21日(4個体)、9月3日(33個体)の採捕魚からは冷水病菌は検出されなかった。

### 電気ショック採捕結果

調査日ごとの電気ショックによる採捕尾数を第1表に示した。電気ショックによる採捕調査では、友釣り解禁前の7月10日に31尾、網解禁後の9月3日に33尾の放流魚を採捕した。採捕日の違いが各種苗の採捕割合に及ぼす影響は有意ではなかった ( $P=0.25$ )。全ての採捕魚に占める各種苗の割合は、湖産系7.8% (5/64)、新規系26.6% (17/64)、海産系65.6% (42/64)であった。電気ショック再捕率は、海産系6.3% (42/666)、新規系5.1% (17/333)、湖産系1.5% (5/333)となり、新規系の電気ショックによる再捕率は、海産系との間に有意差が認められず、湖産系より有意に高かった ( $P<0.05$ ,  $k=3$ )。

### 友釣り採捕結果

調査日ごとの各系統の採捕尾数を第2表に示した。7月13日に13尾、7月30日に17尾、8月21日に4尾の放流魚を採捕した。採捕日の違いが各種苗の採捕割合に及ぼす影響は有意ではなかった ( $P=0.85$ )。全ての採捕魚に占める各種苗の割合は、湖産系52.9% (18/34)、新規系20.6% (7/34)、海産系26.5% (9/34)となり、電気ショックによる採捕割合との間に有意な差が認められた ( $P<0.001$ )。各種苗の友釣り採捕率は、湖産系5.4% (18/333)、新規系2.1% (7/333)、海産系1.4% (9/666)となり、湖産系は海産系より有意に高かったものの ( $P<0.01$ ,  $k=3$ )、新規系と湖産系および海産系との間には有意な差が認められなかった ( $P>0.05$ ,  $k=3$ )。各系統の釣られやすさ指数は、湖産系3.6、新規系0.4、海産系0.2となり、湖産系は新規系および海産系より有意に高いものの ( $P<0.01$ ,  $k=3$ )、新規系と海産系との間には有意な差が認められなかった ( $P>0.05$ ,  $k=3$ )。

## 採捕魚の体サイズ

電気ショッカーによる採捕魚の平均体重は、湖産系が24.0g、新規系が21.1g、海産系が24.7gであり、種苗による平均体重の違いには有意差が認められなかった（一元配置分散分析  $F_{(2,61)}=0.55$   $P>0.05$ ）。

友釣りによる採捕魚の平均体重は、湖産系が27.8g、新規系が28.8g、海産系が24.8gであり、種苗による平均体重の違いにも、有意差が認められなかった（一元配置分散分析  $F_{(2,31)}=0.45$   $P>0.05$ ）。

## 3. マイクロサテライト DNA 分析による遺伝的特性評価 遺伝的変異性

各集団の遺伝的変異性について第3表に示した。全ての標本集団において、解析した全てのローカスで多型が検出された。Allelic richness の平均値と平均ヘテロ接合体率の期待値は、天然遡上アユでそれぞれ0.632、0.578、人工産種苗で0.315~0.415、0.448~0.554の値を示し、いずれの人工産種苗も天然遡上アユに比べて遺伝的変異性が低下していた。H-W 平衡からの逸脱については、全ての標本集団の全てのローカスにおいて、有意な逸脱は認められなかった ( $P>0.05$ 、 $k=24$ )。

### 遺伝的差異

ローカスごとの各集団のアレル頻度について第4図に、全ての標本集団間における Pairwise  $F_{st}$  値を第4表に示した。全ローカスを対象とした標本集団間のアレル頻度の差異に関する検定では、全ての標本集団間において有意な差が認められた ( $\chi^2=\text{infinity}$ 、 $P<0.001$ 、 $k=6$ )。標本集団間の Pairwise  $F_{st}$  値は、全ての組み合わせにおいて0より有意に大きく ( $P<0.001$ 、 $k=6$ )、いずれの標本集団間にも遺伝的分化が認められた。

### 帰属性解析

いずれの標本集団間においても、アレル頻度が有意に異なり、Pairwise  $F_{st}$  値に基づく遺伝的分化が認められたことから、全ての標本集団を対象に任意の2つの標本集団が混合した場合の遺伝情報に基づく帰属性解析の判別率を求め第5表に示した。標本集団の組み合わせによって異なるものの、帰属性解析による判別によって、84~100%の割合で正しい由来を判定できた。

## 考 察

### 1. 実験感染による冷水病耐病性評価

新規系の冷水病発生後の生残率は、海産系と同等で、湖産系より有意に高く、冷水病耐病性が高いという新規

系の優位性を確認することができた。新規系 (F4) の冷水病耐病性は、交雑の母系統である海産系と同レベルに達したが、このことが選抜限界への到達を示すわけではない。なぜならば、海産系に対する耐病選抜は過去に1回実施されたのみであり、海産系の冷水病耐病性自体が選抜限界に達していない可能性があるからである。つまり、新規系の冷水病耐病性にはまだ改善の余地が残されていると考えられるため、有用性の高い種苗の開発を目指して、更に選抜を継続する必要があると考えられる。

本研究に用いた3系統の冷水病耐病性は、毎世代同じ実験感染方法で評価されており、2世代前の平均生残率<sup>14)</sup>は、海産系 (F3) で52%、新規系 (F2) で2%、湖産系 (F5) で6%、前世代のそれ<sup>15)</sup>は、海産系 (F4) で62.5%、新規系 (F3) で37.5%、湖産系 (F6) で17.5%、本研究におけるそれは、海産系 (F5) で61.3%、新規系 (F4) で61.3%、湖産系 (F7) で10.7%あった。この間、毎世代、冷水病の未感染魚群を親に用いて継代した海産系と湖産系では、世代間の平均生残率の違いが最大でも11.5%と小さく、世代交代による生残率の変化についても一定の傾向は認められなかった。一方、毎世代冷水病の感染耐過魚群を親魚に用いて継代した新規系では、世代を経るごとに生残率が向上し、2世代の選抜により2%<sup>14)</sup>から61.3%へと冷水病耐病性が向上した。これらの結果より、冷水病耐病性は、冷水病感染耐過魚を用いた個体選抜法により改善できることが示された。

本研究結果より、冷水病耐病性は、系統によって異なり、その違いは遺伝し、選抜育種によって改善出来ることが示された。アユの冷水病耐病性に系統差があることは、広島県、<sup>10,11)</sup> 岡山県、<sup>12)</sup> 群馬県<sup>13)</sup> の人工産種苗においても知られており、いずれの冷水病耐病系統も海産アユと血縁があることが報告されている。本研究においても、海産アユと血縁のある新規系と海産系は、高い冷水病耐病性を示したのに対して、血縁のない湖産系は、4回にわたる耐病選抜の履歴があるにも関わらず、冷水病耐病性が低かった。これらの結果から、冷水病耐病系統を作出するためには、海産アユと血縁のある種苗を選抜母群として選定することが重要であると考えられる。

### 2. 標識放流による残留特性および釣獲特性評価

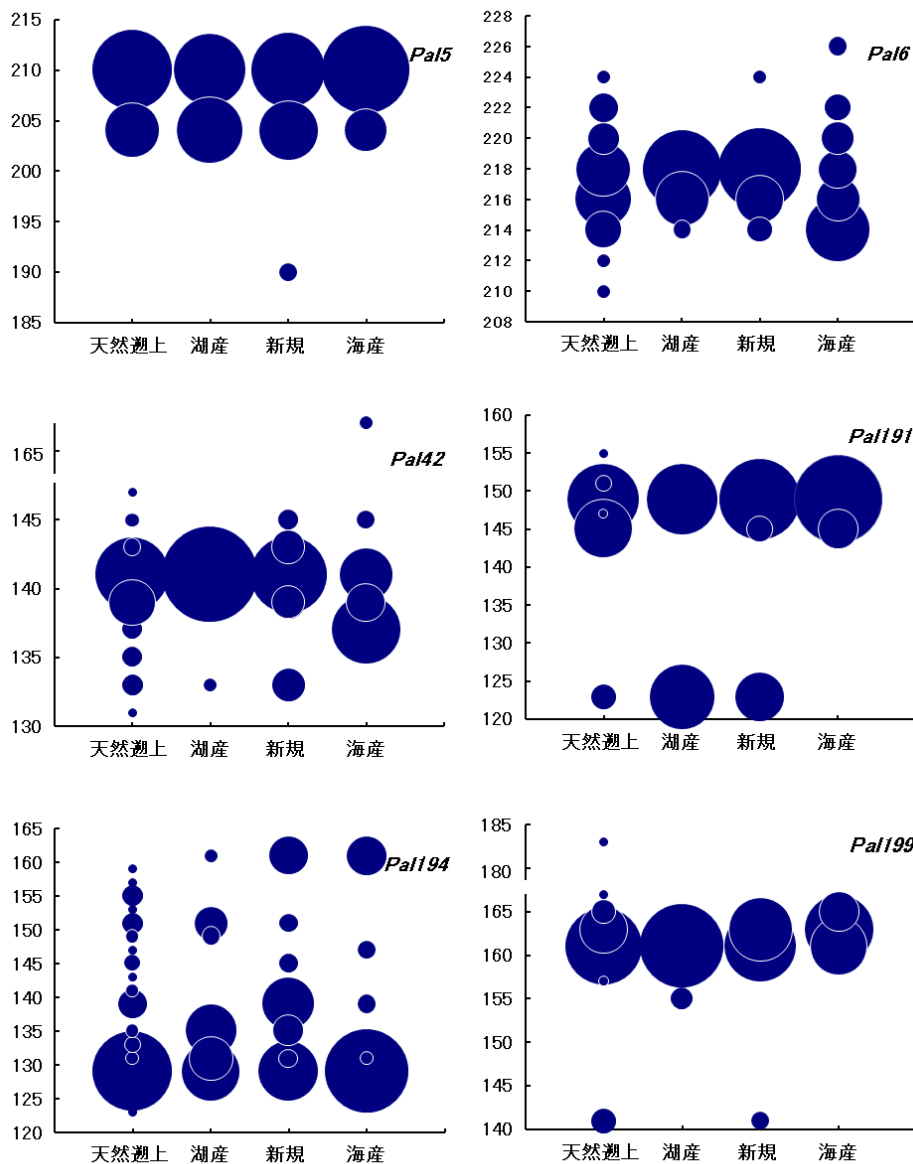
アユから分離された冷水病菌は、大部分が遺伝子型A型に、在来魚から分離された冷水病菌は全てB型に分類される。<sup>26,35)</sup> また、在来魚の持つ冷水病菌は、河川におけるアユ冷水病の流行に対して重要な役割を負っていないという事例が報告されている。<sup>34)</sup> このためアユ冷水病菌の蔓



第3表 各標本集団の遺伝的変異性

サンプル	n	A	Na	Ho	He	Ho/He
天然遼上	66	8.00	6.32	0.614	0.578	1.062
湖産系	31	3.17	3.15	0.425	0.448	0.948
新規系	32	4.17	4.15	0.583	0.554	1.053
海産系	30	3.83	3.83	0.506	0.502	1.007

nはサンプル数、Aは平均アリル数、NaはAllelic richnessの平均値、Hoは平均ヘテロ接合体率(観察値)、Heは平均ヘテロ接合体率(期待値)。



第4図 各集団のローカスごとのアリル頻度

縦軸はアリルのサイズを示し、円の面積はアリルの頻度を表す。  
 天然遼上は天然遼上アユ、湖産は湖産系人工産種苗、  
 新規は新規系人工産種苗、海産は海産系人工産種苗を表す。

第4表 各集団間のPairwise Fst値

	天然遡上	湖産系	新規系
湖産系	0.119*		
新規系	0.067*	0.065*	
海産系	0.099*	0.276*	0.159*

\* $P < 0.001$  Bonferroni補正後  $k=6$

第5表 遺伝型に基づく帰属性解析による各集団間の判別率

	天然遡上	湖産系	新規系
湖産系	89%		
新規系	92%	84%	
海産系	96%	100%	98%

延状況を把握するためには、在来魚由来の冷水病菌とアユ由来の冷水病菌を分けて調査しなくてはならない。そこで本調査では冷水病菌の遺伝子型判定を行った結果、解禁日に採捕した92%のアユから、遺伝子型A型の冷水病菌が検出された。従って、本調査河川ではすでに解禁の時点でアユ冷水病菌が蔓延していたと考えられる。本調査河川の流域には、放流時から他河川で釣獲されたアユが蓄養されており、しかも、近隣の既解禁河川では6月中旬より冷水病が発生していた（漁業協同組合からの聞き取り）ことから、人工産種苗を単独放流したにも係わらず解禁時にアユ冷水病菌が蔓延したのは、流域への釣獲アユの蓄養が原因である可能性が高い。一方、解禁日以降は、冷水病菌の検出率が大幅に低下した。水温20℃以上の高水温が続くと河川内においても冷水病は自然に治癒することが知られているため、<sup>36)</sup> この検出率の低下は、7月中旬以降の高水温により冷水病が終息したためと考えられる。従って、本調査は、放流から解禁までの間に冷水病が発生し、その後、冷水病が終息した河川における各種苗の特性評価であると位置付けられる。

電気ショッカー再捕率は、種苗によって異なっていた。電気ショッカー再捕率の種苗差は、各種苗の調査区間内への残留状況の違いを表していると考えられる。本調査では、放流から調査開始日までに2度の出水があり、しかも、友釣り解禁日までにアユ冷水病菌が蔓延していた。冷水病の発生に出水が重なると、河川内のアユの生息密度が大幅に低下することが経験的に知られている。このような環境下において、新規系と海産系の残存率が湖産系に比べて相対的に高かったことは、両系統が、実験感染だけではなく、

冷水病発生河川内においても優れた生残特性を発揮することを示唆している。従って、高生残という観点から種苗性を評価すると、新規系ならびに海産系は、湖産系に比べて有用であると考えられる。

各系統の友釣りによる釣られやすさの違いは、友釣り再捕率、釣られやすさ指数に反映される。新規系と湖産系の友釣り再捕率には有意差がみられないが、釣られやすさ指数で比べると、新規系のそれは湖産系より有意に低いため、新規系の釣られやすさは、湖産系に及ばないと考えられる。一方、新規系と海産系の両指標値には、共に有意差がなく、新規系と海産系の釣られやすさの違いを検出することは出来なかった。このように釣獲特性については、新規系の優位性を確認することが出来なかった。新規系と海産系は同等の冷水病耐病性を有することから、新規系の釣獲特性が海産系より優れていなければ、海産系に変えて新規系を利用する価値はない。以前に岐阜県飛騨川水系の竹原川で行われた調査では、漁期前半には湖産系（F4）が、漁期中盤には新規系（湖産系と海産系の交雑 F1）が、漁期後半には海産系（F2）が多く漁獲された。<sup>6)</sup> 上流域の人工産単独放流河川における現在の課題は、解禁後の冷水病発生による漁期中盤の漁業不振であることから、新規系が漁期中盤に釣られやすい特性を持つのであれば、その利用価値は高い。しかし、本調査では漁期を通じて湖産系が釣獲されやすく、漁期によって各系統の釣獲割合が変化することはなかった。これには、両河川の漁獲圧の違いが影響した可能性がある。すなわち、一般の遊漁者が訪れる河川（竹原川）では、なわばりアユが順次釣獲されることにより、なわばり個体が更新されたのに対して、一般遊漁者がいない今回の調査河川では、当初のナワバリ個体である湖産系がほとんど釣獲されず、冷水病の終息により漁期終盤まで残ったため、なわばり個体の組成が変化しなかった可能性が考えられる。その結果、本試験では、新規系と海産系の釣獲特性の違いが潜在化した可能性も考えられるため、両系統間の釣獲特性の評価については、さらなる再検討が必要である。

### 3. マイクロサテライト DNA 分析による遺伝的特性評価

本研究で解析した3種類の人工産種苗は、いずれも天然遡上アユに比べてアレル数が少なかった。これは、継代に伴って遺伝的多様性が低下したため<sup>37)</sup>と考えられる。また、いずれの人工産種苗も、その作出起源に関わらず天然遡上アユとの間に遺伝的分化が認められた。湖産系および新規系は、天然遡上アユとは遺伝的に異なる琵琶湖産アユ<sup>28, 29)</sup>を起源とするため、それらと天然遡上アユとの間の



遺伝的分化は当然の帰結である。一方、天然アユを起源とする海産系の遺伝的分化については、創始者効果等の遺伝的浮動の影響によりアリル頻度が変化したためと考えられる。以上の結果は、作出起源に関わらず、いずれの人工産種苗も天然遡上アユとは遺伝的に異質な集団であることを示している。従って、その放流は、天然アユ資源に悪影響を及ぼすことがないように慎重に行う必要がある。

いずれの標本集団間においてもアリル頻度が大きく異なっていたことにより、帰属性解析を用いて個体ごとに由来判別を行うための基礎資料が整った。そこで任意の2標本集団の混合集団を想定して、遺伝情報に基づく帰属性解析の判別率を調べたところ、いずれの標本集団が混合したとしても、個体ごとに9割程度の確度で正しい由来を判別できることが示された。帰属性解析による判別率が高いほど、新規系のモニタリング調査の精度は高まるため、今後、更に判別率を高める努力が必要である。判別率を高めるためには、解析に用いるマーカー座数を増やす、種苗間の差異をより鋭敏に検出できるマーカー座を用いるなどが考えられる。しかし、マーカー数の増加は、分析費用の増加につながるため、経済的ではない。従って、今後は、解析に用いるマーカー座の種類について更に検討する必要がある。

以上の技術を用いれば人工産種苗の天然水域における放流後の動態を調査できると考えられる。しかし、人工産種苗の放流について実効あるリスク管理を行うためには、多数のサンプルを用いて継続的にモニタリング調査を行う必要があり、その全てのサンプルについて分析費用の高いマイクロサテライトDNA分析を行うことは、経済的に困難であると予想される。人工産種苗と天然種苗は、下顎側線孔の整列状態<sup>18,19)</sup>などを指標とすることにより、容易かつ安価に分けることができる。従って実際調査では、DNA分析とそれ以外の判別手法を組み合わせるなどの工夫が必要になると考えられる。

#### 4. 総合考察

岐阜県内には天然アユが遡上する河川とダム等の遡上障害物により天然アユが遡上しない河川がある。前者の河川では、漁獲に対する天然アユの高い寄与が明らかにされている。<sup>16, 38, 39)</sup> このため、これら河川における放流種苗には、天然アユと遺伝的に同質である海産系非継代の種苗が奨励されている。<sup>40)</sup> 一方、後者の河川では、効果的な放流を行うことにより天然アユ不在という不利を克服しなくてはならない。そこで当所は、放流の直接的な費用対効果を高めるために、放流方法、<sup>7,8,9,36)</sup> 放流種苗の質、<sup>6)</sup>

河川環境<sup>41)</sup>などの要因について検討を進めてきた。その一環として本研究では、冷水病に強く良く釣れるアユ種苗を目指して新規に開発した系統の特性を既存系統と比較したところ、冷水病耐病性に関する新規系の優位性については確認できたが、釣獲特性に関する優位性については確認出来なかった。新規系は、交雑を介して天然アユに悪影響を及ぼす可能性があり、そのリスクを回避するためには、厳格な利用制限と管理が必要であることを考慮すると、現時点で新規系を放流種苗として実用化するメリットはないと考えられる。一方、冷水病耐病性が高いという特性は、養殖種苗として有用である可能性を示している。今後は、新規系の冷水病耐病性に関する選抜を更に進めるとともに、養殖種苗としての利用も視野に入れて、その利用方法について慎重に検討する必要がある。

## 要 約

1. ダム上流域の閉鎖性水域用の放流種苗として、冷水病に強く良く釣れるアユ種苗の開発を目指して選抜育種を実施し、感染試験および標識放流試験により作出種苗の冷水病耐病性と釣獲特性を評価するとともに、開発種苗のモニタリングを行うために遺伝マーカーによる判別技術の開発を行った。
2. 感染実験により3種類の人工産種苗の冷水病耐病性を比較した結果、新規系の冷水病耐病性は、湖産系より高く、海産系と同等であった。
3. 2世代にわたる選抜により新規系の冷水病耐病性が2%から61.3%へと大幅に改善されたことにより、冷水病耐病性は、冷水病感染耐過魚を用いた個体選抜法により改善可能であることが示された。
4. 3種類の人工産種苗を木曾川支流の飯沼川に標識放流し調査した結果、電気ショッカーによる再捕率は海産系6.3%、新規系5.1%、湖産系1.5%となり、新規系は、冷水病の発生に出水が重なる悪条件下においても、海産系と同様に相対的に高い残留特性を示すことが明らかになった。
5. 友釣りによる採捕調査を行った結果、友釣りによる再捕率は海産系1.4%、新規系2.1%、湖産系5.4%となり、新規系の釣獲特性は、海産系と同程度であり、湖産系より劣ることが明らかになった。
6. 天然アユと3種類の人工産種苗を標本集団とし、マイクロサテライトDNAマーカーを用いて各集団の遺伝的特徴について調査した結果、いずれの人工産種苗も遺伝的多様性が低く、天然アユとの間に遺伝的分化が認められ

た。

7. 解析に用いた4種類の標本集団は、いずれの集団間においてもアシル頻度が異なっていたことを利用して、個体ごとに遺伝情報に基づく帰属性解析を行ってその判別率を検討した結果、任意の2標本集団が混合した場合の判別率は84~100%となり、個体別に由来を判別出来ることが示された。

## 文 献

- 1) 岐阜県農林水産局水産振興室. 漁獲の状況. 岐阜県の水産業 2007; 8-11.
- 2) Iida Y, Mizokami A. Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Fish. pathol.* 1996; 31: 157-164.
- 3) 井上 潔. アユの冷水病. 海洋と生物 2000; 22: 35-38.
- 4) 谷口順彦. シンポジウム「魚病研究の現状と展望」, アユの種苗放流と冷水病被害について. 魚病研究 2002; 37: 220.
- 5) 川之辺素一, 沢本良一, 山本 聡. 千曲川におけるアユの放流効果と冷水病の関係. 長野水試研報 2005; 7: 10-15.
- 6) 原 徹, 桑田知宣, 斉藤薫. アユの河川内での冷水病感受性および放流効果の系統差. 岐河環研研報 2007; 52: 5-10.
- 7) 原 徹, 桑田知宣, 荻谷哲治. 冷水病菌を保菌していない小型アユ種苗の放流効果. 岐河環研研報 2008; 53: 1-5.
- 8) 桑田知宣. 冷水病に罹っていない健康な琵琶湖産系人工産アユによる漁獲回復実証試験, 河川におけるアユ冷水病の被害軽減策の模索(広域調査). 平成17年度岐河環研業報 2007; 16-17.
- 9) 原 徹. 環境調和型アユ増殖手法開発事業, 冷水病菌を保菌していないアユ種苗の放流効果と冷水病菌の河川における感染環の解明. 平成19年度岐河環研業報 2009; 9-10
- 10) Nagai T, Tamura T, Iida Y, Yoneji T. Difference in susceptibility to *Flavobacterium psychrophilum* among three stocks of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish. Pathol.* 2004; 39: 159-164.
- 11) 永井崇裕, 坂本崇. 異なる系統間の冷水病感受性と免疫応答. 魚病研究 2006; 41: 99-104.
- 12) 水戸 鼓, 村田 守, 近藤正美. アユ親魚の由来による冷水病耐病性の違いについて. 岡山水試報 2007; 22: 33-35.
- 13) 鈴木究真, 久下敏宏, 新井 肇, 泉庄太郎. 人工継代アユの遺伝的・形態的特性および冷水病耐病性. 群馬水試研報 2005; 11: 41-43.
- 14) 桑田知宣. 冷水病耐病性の系統差と冷水病耐病性系統の選抜. 平成18年度岐河環研業報 2008; 53: 12-13.
- 15) 桑田知宣. 冷水病耐病性に関する選抜. 平成19年度岐河環研業報 2009; 16.
- 16) 内田和男, 片野 修. アユの種苗放流が河川の生物多様性に与える影響, 種苗放流が生物多様性に与える影響に関する研究, 農林水産技術会議, 東京. 2002; 10-51.
- 17) 水産総合研究センター養殖研究所. アユの遺伝的多様性から見た放流指針. 健全な内水面生態系復元推進事業報告書, 水産総合研究センター養殖研究所, 三重県. 2005; 141-156.
- 18) 清田季義. 海産系人工産アユの下顎側線孔の欠損について. 熊本県水産研究センター研究報告 2002; 5: 39-41.
- 19) 原 徹, 斉藤薫. 漁業がアユ資源に与える影響の解明-II, アユ種苗の由来判別とその利用. 岐河環研研報 2006; 51: 11-16
- 20) 原 徹, 斉藤薫, 一柳徹也. アユ資源の増殖に関する研究-III, 長良川に天然遡上するアユの耳石調査. 岐水試研報 1997; 42: 1-6.
- 21) Otake T and Uchida K. Application of otolith microchemistry for distinguishing between amphidromous and non-amphidromous stocked ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish. Sci.* 1998; 64: 517-521.
- 22) 近藤啓太, 今井貞美, 高橋信夫, 野口大毅, 谷口順彦. 耳石ストロンチウムマーカーおよび遺伝マーカーに基づく吉野川上流域に放流された海系人工採苗アユの再補確認. 水産育種 2006; 36: 25-32.
- 23) 久保田仁志, 手塚 清, 福富則夫. マイクロサテライト DNA マーカーによる釣獲されたアユの由来判別と種苗放流効果の評価. 日水誌 2008; 74: 1052-1059.
- 24) 山本充孝, 二宮浩司. 凍結病魚を用いた冷水病人為感染試験. 滋賀水試事報 2000; 106-107.
- 25) Wakabayashi H, Egusa S. Characteristic of myxobacteria associated with some freshwater fish diseases in Japan. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 1974; 40: 751-757.

- 26) 吉浦康寿, 釜石 隆, 中易千早, 乙竹 充. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C 遺伝子を標的とした PCR による *Flavobacterium psychrophilum* の判別と遺伝子型. 魚病研究 2006; 41: 67-71.
- 27) 国土交通省水文水質データベース: <http://www1.river.go.jp/>
- 28) Takagi M, Shoji E, Taniguchi N. Microsatellite DNA Polymorphism to Reveal Genetic Divergence in Ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish. Sci.* 1999; 65: 507-512.
- 29) Hara M, Sakamoto T, Sekino M, Ohara K, Matsuda H, Kobayashi M, Taniguchi N. Characterization of novel microsatellite DNA markers in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish. Sci.* 2006; 72: 208-210
- 30) Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J. Hered.* 1995; 86: 248-249.
- 31) Goudet J. FSTAT (version 1.2) : A computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 1995; 86: 485-486.
- 32) Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online.* 2005; 1: 47-50.
- 33) Piry S, Alapetite A, Cornuet J M, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A. GENECLASS2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *J. Hered.* 2004; 95(6): 536-539.
- 34) 田畑和男. 河川における冷水病菌をめぐる在来魚と放流アユの関係. 日水誌 2004; 70: 318-323.
- 35) Izumi S, Aranishi F, Wakabayashi H. Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Dis. Aquat. Org.* 2003; 56: 207-214.
- 36) 原 徹, 桑田知宣, 斉藤薫. 河川における冷水病菌の動態, 冷水病菌を保菌していないアユ種苗の放流事例. 岐河環研研報 2007; 52: 1-4.
- 37) 池田 実, 高木秀蔵, 谷口順彦. マイクロサテライト DNA 分析によるアユ継代種苗の遺伝的変異性と継代数の関係. 日水誌 2005; 71: 768-774.
- 38) 原 徹, 岡崎 稔, 一柳徹也. アユ資源の増殖に関する研究-IV, 長良川上流域におけるアユの種類別漁獲状況. 岐水試研報 1998; 43: 1-8.
- 39) 原 徹, 岡崎 稔, 一柳徹也. アユ資源の増殖に関する研究-V, 長良川中流域におけるアユの漁獲状況. 岐水試研報 1999; 44: 1-7.
- 40) 岐阜県アユ冷水病対策協議会. 放流種苗の決定. アユ冷水病対策指針~河川における冷水病被害の軽減を目指して~, 岐阜県漁業協同組合連合会, 岐阜 2006; 4.
- 41) 松田宏典, 原徹. アユの生息密度に影響を及ぼす漁場環境要因. 岐淡水研報 2005; 50: 13-16.