

冷水病に強い人工産アユ種苗の開発

異なる冷水病菌株の感染に対する2種類の耐病種苗の耐性の比較

荻谷哲治, 武藤義範, 桑田知宣

Development of resistant strains to an infection cold-water disease
by using selective breeding in ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*)

Comparison of resistance to different isolates of *Flavobacterium psychrophilum* between two resistant strains in ayu

TETSUJI KARIYA, YOSHINORI MUTO AND TOMONORI KUWADA

アユの冷水病は、*Flavobacterium psychrophilum* を原因とする細菌性感染症であり(井上, 2000)、1987年に徳島県の養魚場で発病が確認されて以来、全国に蔓延し、アユ養殖業に大きな被害をもたらしている(アユ冷水病対策協議会, 2008)。その対策として、岐阜県では、人工産アユ種苗の活用および防疫体制の整備を推進しており、その効果により近年の岐阜県のアユ養殖生産量は増加に転じている(岐阜県農政部農政課水産振興室, 2012)。しかし、現在の対策は、ひとたび冷水病が発生すると甚大な被害になりやすいという欠点がある。また、近年は飼料費や光熱費など養殖生産に関わる費用が上昇する一方で、魚価が低迷しており、魚病の発生による被害や治療費を販売価格に転嫁することが非常に困難な経営環境にある。安定的な養殖経営を図るためには、病気の発生予防だけでなく、病気発生時の被害軽減対策が不可欠であり、県内のアユ養殖生産者からは、その対策の1つとして、冷水病に対する耐病性の高いアユ種苗の開発が切望されている。さらに、安全・安心な生産物を求める消費者の要望に応えるためにも、冷水病耐病性種苗の利用によって治療薬を使用しない養殖アユ生産体制の確立が求められている。

当研究所では、2005年より冷水病耐性の高いアユ種苗の開発に取り組み(桑田, 2008, 2009; 桑田ほか, 2010)、毎世代、実験感染による冷水病の耐性評価を行っている。その結果、冷水病実験感染時の平均生存率が80%程度と高い2種類の冷水病耐性アユ種苗を作出した(荻谷ほか, 2012)。そこで、2種類の冷水病耐性アユ種苗を用いて県内の民間アユ養魚場で実用化試験を行ったところ、実験感染による評価結果を超える冷水病による死亡(死亡率20%以上)が認められた(荻谷, 2013)。永井(2011)は、アユから分離された複数の冷水病菌株を用いて、広島県で継代されている2種類のアユ種苗(海産交配系と累代系)に対する病原性を実験感染により評価し、冷水病菌株は海産交配系アユに対する病原性の強い型と累代系に対する病原性の強い型の2つに分けられることを報告している。この報告を参考にすると、同じ冷水病菌株を用いて毎世代選抜を繰り返している当研究所開発の2種類の冷水病耐性アユ種苗は、選抜に用いた冷水病菌株と異なる型の菌株に対して十分な耐性を持たない可能性がある。そこで、当研究所で選抜に用いた冷水病菌株と実用化試験時に民間アユ養魚場で発生した冷水病菌株を用いて2種類の冷水病耐性アユ種苗への実験感染を行い、両冷水病菌株の感染に対する耐性および実験期間中の成長を種苗間で比較したので、その結果を報告する。

キーワード: 冷水病、耐病性、菌株、成長

方 法

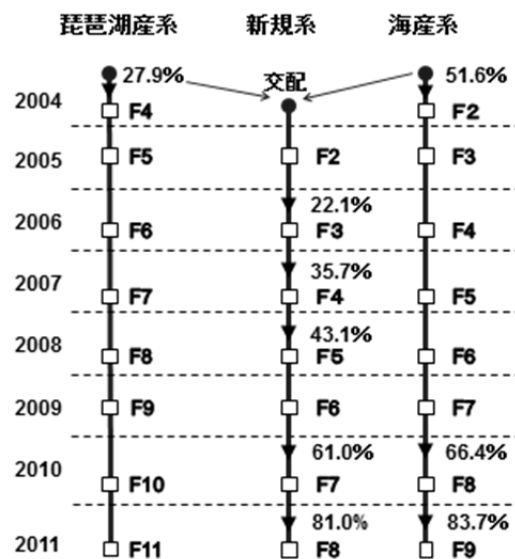
供試魚の選抜履歴

供試魚には、冷水病耐性に関する選抜育種により作出した2種類の冷水病耐性アユ種苗を用いた。各種苗の継代および選抜履歴と冷水病に対する感受性の変化を第1図に示した。海産系人工産種苗(以下海産系)は、木曽川で採捕したアユを起源とし、F2世代作出時には河川水飼育による冷水病自然発生群(F1世代)の生残魚群、F3世代(2005年)からF6世代(2008年)までは冷水病菌に未感染の魚群、F7世代(2009年)からF9(2011年)までは冷水病人為感染後の生残魚群を親魚に用いて継代を繰り返した種苗である。これまでの選抜により、海産系の冷水病実験感染時の平均生残率はF1世代における51.6%からF8世代における83.7%まで向上した(荻谷ほか, 2012)。よって本研究では、海産系(F9世代)を冷水病耐性種苗と位置付けて実験感染に供した。もう一つの供試種苗である新規系人工産種苗(以下新規系)は、冷水病耐性と優れた釣獲特性を併せ持つ種苗の開発を目的に、海産系の冷水病自然発生群の雄(F1世代)と琵琶湖産アユを起源とする人工産アユ種苗の雌(F3世代)を交配して作出されたアユ種苗である(桑田ほか, 2010)。F3世代(2006年)以降に冷水病人為感染後の生残魚群を親魚に用いて継代を繰り返したことにより、新規系の冷水病実験感染時の平均生残率はF2世代における22.1%からF7世代における81.0%まで向上した(荻谷ほか, 2012)。本研究では、新規系(F8世代)も冷水病耐性種苗と位置付けて実験感染に供した。なお、当研究所が行っている実験感染法(排水感染法)では冷水病発生を促すために冷水病感受性アユ種苗が必要となる。本研究ではこの感受性種苗に琵琶湖系人工産種苗(以下湖産系)を用いた。湖産系は琵琶湖産アユを起源として継代を繰り返した人工産種苗であり、その冷水病実験感染時の平均生残率は10.7~20.0%と、いずれの世代においても低いことが明らかにされている(桑田ほか, 2010; 荻谷ほか, 2012; 荻谷, 2013)。

供試した海産系と新規系アユは、2011年9月に当研究所においてそれぞれの親魚群より採卵・採精して通常交配により作出した。両種苗の飼育は、ふ化から12月までは容量500Lのパナライト水槽で、その後は容量3tの円形FRP水槽で、さらに4月からは容量10tのFRP水槽で行った。飼育水は、発眼卵までは冷水病フリーの井戸水を、発眼卵から2012年4月までは1/6人工海水を、以後は冷水病フリーの井戸水を用いた。7月31日に海産系と新規系が同じサイズになるように選別し、実験感染による冷水病耐性評価に供した。

実験感染による冷水病耐性評価

実験感染には当研究所で冷水病耐性の選抜に用いた冷



第1図 各種苗の継代および選抜履歴と冷水病に対する感受性の変化
図中の数値は選抜時の生残率を表す。

水病菌株と実用化試験時に民間アユ養魚場で発生した冷水病菌株群を用いた。民間アユ養魚場で発生した冷水病菌株を冷水病菌株群と表記したのは、後述の実験感染において、単離された冷水病菌株ではなく、複数の冷水病菌株の感染を否定できない、民間アユ養魚場で発生した冷水病の死亡アユを用いたためである。

感染に用いた冷水病菌株ごとに独立した実験感染飼育水槽を設置し、それぞれを研究所株区と養魚場株群区とした。さらに、この両区の中にそれぞれ海産系に感染させる区(海産系区)を2水槽、新規系に感染させる区(新規系区)を2水槽設けて、全体で8水槽の実験感染区を設けた。実験感染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。飼育水には井戸水を用い、上部水槽から各実験感染水槽への注水量を50ml/秒、実験感染水槽の水深を16cmとした。7月31日に、海産系区と新規系区の各実験感染水槽に平均体重を揃えた海産系と新規系をそれぞれ20尾ずつ収容した。各実験感染水槽の収容時の供試魚の平均体重はおおよそ12.2-12.8gであった。実験感染区の人為感染は、冷水病で死亡した凍結アユを用いた冷水病人為感染法により行った(山本・二宮, 2000)。すなわち、琵琶湖産系アユを収容した水槽上部に実験開始まで-80℃で保管していた冷水病で死亡した凍結アユを垂下することにより冷水病の発生を促し、その排水を各感染区水槽に導入すること

により海産系と新規系に冷水病菌を感染させた。死亡アユの垂下は2012年8月1日に行い、研究所株区には2011年度の実験感染において冷水病により死亡したアユを、養魚場株群区には実用化試験時に民間養魚場で冷水病により死亡したアユを垂下した。死亡したアユの垂下から8月31日までの死亡尾数、死亡時の体重を実験感染水槽ごとに記録した。8月31日にすべての実験感染水槽の生残魚を取り上げて体重を測定した。給餌は、原則として1日2回手まきで行い、実験開始時には、各実験感染水槽に等量の市販配合飼料を与えた。その後、各水槽の生残率の違いに応じて、水槽ごとに供試魚の重量を推定して給餌量を増減した。

冷水病菌検査

供試魚を収容した7月31日に、実験感染に用いた供試魚と同一飼育群より海産系と新規系をそれぞれ30尾サンプリングし、冷水病菌の保菌検査を行った。また、実験感染の死亡魚については腎臓と脾臓より冷水病菌を分離し死因を確認した。さらに実験終了時の生残魚についても腎臓と脾臓を用いた保菌検査を実施した。また、一部の死亡魚、生残魚については、ハートインフュージョン培地、TCBS培地を用いて、他の魚病細菌の検査を実施した。冷水病の検査は、全て培養PCR法により行った。すなわち、滅菌綿棒を用いて鰓より釣菌し改変サイトファーガ寒天培地に塗抹、4℃で培養後、発現した複数の黄色コロニーからDNAを熱抽出し、抽出したDNAを鋳型にプライマーfpPPIC1(吉浦ほか, 2006)を用いたPCRを行い、電気泳動によって該当する増幅産物の有無を確認した。なお、試験開始前の供試魚からは冷水病菌は検出されなかった。

データ解析

アユ種苗の種類(海産系と新規系)および冷水病菌株の種類(研究所株と養魚場株群)が冷水病実験感染時の生残率に及ぼす影響を評価するために、各実験感染区の試験終了時の生残率を逆正弦変換し、種苗の種類と冷水病菌株の種類を要因とする二元配置分散分析を行った。また、試験期間中の成長の違いを調べるため、各実験感染区の平均補正増重量、平均補正飼料効率を算出し、種苗の種類と冷水病菌株の種類を要因とする二元配置分散分析を行った。補正増重量および補正飼料効率の計算式は、以下の計算式を用いた。

補正増重量(g)

$$= (\text{終了時総重量} + \text{死亡魚総重量}) - \text{開始時総重量}$$

補正飼料効率(%)

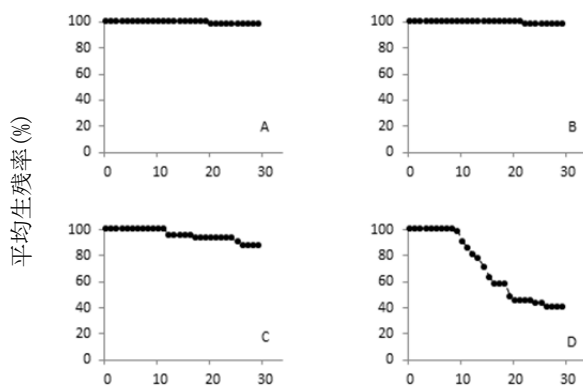
$$= 100 \times \frac{(\text{終了時総重量} + \text{死亡魚総重量}) - \text{開始時総重量}}{\text{給餌量}}$$

結 果

各種苗における菌株別の平均生残率の変化を第2図に示した。アユの死亡は、実験感染開始9日後より始まり20日後まで多発したが、以後は次第に減少した。死亡したアユには、顎の欠損や体側に糜爛の症状が確認され、死亡したアユから冷水病菌が検出された。また、実験終了まで生残したアユからも冷水病菌が検出された。一部の死亡したアユを対象にハートインフュージョン培地、TCBS培地を用いて検査を行ったが、冷水病菌以外の既知の魚病細菌は検出されなかった。

各種苗における死亡経過では、海産系の死亡経過は研究所株区と養魚場株群区間で似通っており、実験感染開始20日前後にわずかな死亡が認められただけであった。一方、新規系の死亡経過は、研究所株区と養魚場株群区で異なる傾向を示し、研究所株区では実験感染開始12日から26日後にかけて散発的な死亡が認められただけであったが、養魚場株群区では14日以降に多数の死亡が認められた。各種苗の実験感染30日後の菌株別の平均生残率を第3図に示した。各実験感染区の平均生残率は、研究所株-海産系区97.5%、養魚場株群-海産系区97.5%、研究所株-新規系区87.5%、養魚場株群-新規系区40.0%の順であった。実験終了時の生残率に対する種苗の種類と感染させた冷水病菌株の種類を要因とする二元配置分散分析の結果、供試した種苗の種類の影響は有意であり($F_{(1,4)} = 27.7$, $P = 0.006$)、感染させた冷水病菌株の種類の影響に関する有意確率は0.06と小さく、種苗の種類と感染させた冷水病菌株の種類間の交互作用の有意確率も0.06と小さかった。そこで種苗の種類と感染させた冷水病菌株の種類間には交互作用が存在すると仮定し、種苗の種類の各水準(海産系、新規系)における感染させた冷水病菌株の種類の単純主効果を検定したところ、海産系では、実験終了時の生残率に対する感染させた冷水病菌株の種類の影響は認められなかったが($F_{(1,4)} = 0$, $P = 1.0$)、新規系では、実験終了時の生残率に対する感染させた冷水病菌株の種類の影響は有意であった($F_{(1,4)} = 13.1$, $P = 0.02$)。

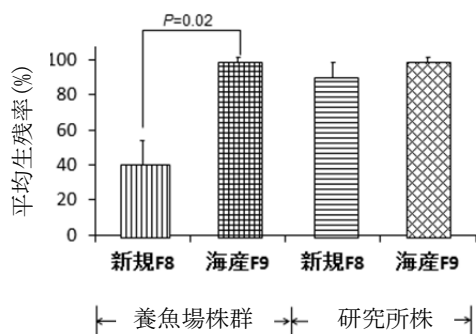
各種苗における実験開始時および実験終了時の飼育結果を表に示した。養魚場株群-新規系区は実験開始後まもなく摂餌が不活発になり、死亡終息後もその状態が維持された。一方、海産系では、新規系に比べて摂餌が不活発になる期間が短く、期間を通じて活発に摂餌する個体が観察された。各実験感染区の実験終了時の平均体重は養魚場株群-海産系区21.8g、研究所株-海産系区19.6g、養魚場株群-新規系区19.1g、研究所株-新規系区18.6gの順で高かった。実験終了時の平均体重に対する種苗の種類と感染させた冷水病菌株の種類を要因とする二元配置分散分析の結果、実験



実験開始からの経過日数

第2図 各種苗における菌株別の平均生残率の変化

A: 研究所株-海産系 B: 養魚場株群-海産系
C: 研究所株-新規系 D: 養魚場株群-新規系



第3図 各種苗の実験感染30日後の菌株別の平均生残率
垂線は標準誤差を示す

終了時の平均体重に対する種苗の種類の影響は有意であったが($F_{(1,4)} = 7.88, P = 0.049$)、感染させた冷水病菌株の種類の影響は有意ではなく($F_{(1,4)} = 4.43, P = 0.1$)、種苗の種類と感染させた冷水病菌株の種類との間の交互作用も有意ではなかった($F_{(1,4)} = 1.76, P = 0.26$)。各実験感染区の実験終了時の平均補正増重量は、養魚場株群-海産系 178.6g、研究所株-海産系 142.7g、研究所株-新規系 109.3g、養魚場株群-新規系 57.1gの順で高かった。補正増重量に対する種苗の種類と冷水病菌株の種類を要因とする二元配置分散分析の結果、補正増重量に対する種苗の影響は有意であったが($F_{(1,4)} = 14.84, P = 0.02$)、感染させた冷水病菌株の種類の影響は有意ではなく($F_{(1,4)} = 0.17, P = 0.70$)、種苗の種類と感染させた冷水病菌株の種類との間の交互作用も有意でなかった($F_{(1,4)} = 4.80, P = 0.09$)。各実験感染区の実験終了時の平均補正飼料効率率は、研究所株-海産系 47.4%、養魚場株群-海産系 38.3%、研究所株-新規系 31.5%、養魚場株群-新規系 22.1%の順に

高かった。補正飼料効率に対する種苗の種類と感染させた冷水病菌株の種類を要因とする二元配置分散分析の結果、補正飼料効率に対する種苗の種類の影響は有意であったが($F_{(1,4)} = 8.54, P = 0.04$)、感染させた冷水病菌株の種類の影響は有意ではなく($F_{(1,4)} = 0.0005, P = 0.98$)、種苗の種類と感染させた冷水病菌株の種類との間の交互作用も有意ではなかった($F_{(1,4)} = 2.86, P = 0.17$)。本実験により、高い冷水病耐性を持つ海産系は新規系に比べて有意に実験終了時の平均体重が大きく、補正増重量が多く、補正飼料効率が高いという結果となり、冷水病発生中の成長と耐病性との関連性を確認した。

考 察

2011年に実施した研究所株を用いた実験感染の生残率は、海産系 F8(78.7%)、新規系 F7(74.7%)であったのに対し(荻谷, 2013)、本実験の研究所株での生残率は海産系 97.5%、新規系 87.5%であった。一方、冷水病耐性種苗を評価するために行った一連の実験感染において初めて、研究所株以外の冷水病菌株を用いて実験感染を行った結果、海産系では、感染に用いた冷水病菌株に係わらず実験終了時の生残率がいずれも高く、感染に用いた冷水病菌株の違いが実験終了時の生残率に対して有意な影響を与えなかった。しかし、新規系では、感染に用いた冷水病菌株ごとに実験終了時の生残率が異なり、養魚場株群に対する生残率は研究所株に対する生残率より有意に低いことが明らかになった。永井(2011)は、アユから分離された複数の冷水病菌株を用いて、広島県で継代されている2種類のアユ種苗(海産交配系と累代系)に対する病原性を実験感染により評価し、冷水病菌株は海産交配系に対する病原性が強い型と累代系に対する病原性の強い型の2つに分けられることを報告している。永井の結果は、冷水病耐性種苗が、ある1種類の冷水病菌株に対して高い冷水病耐性を獲得したとしても、別タイプの冷水病菌株には高い感受性を示す可能性があることを示している。本研究で用いた冷水病菌株がそれぞれ永井の分類のどちらの型に属するのかわかっているが、研究所株に対して高い耐性を持つ新規系が養魚場株群に対して比較的高い感受性を示したことは、ある1種類の冷水病菌に対する耐病性を向上させたとしても、全ての冷水病菌に対する耐性を獲得できるわけではないという点において永井(2011)の結果と同様であった。一方、海産系は、両冷水病菌株に対していずれも高い耐性を持つことが明らかになった。なぜ海産系が選抜履歴のない養魚場株群に対する耐性を持っていたのかについては不明であるが、このことは複数の冷水病菌に対する耐性を併せ持つ冷水病耐病種苗の開発が不可能ではないことを示している。以上

表 各種苗における実験開始時および実験終了時の飼育結果

菌株系統 項目/水槽	研究所株				養魚場株群				
	海産系		新規系		海産系		新規系		
	1	2	1	2	1	2	1	2	
開始時	平均体重(g)	12.3	12.3	12.4	12.4	12.2	12.4	12.2	12.8
	収容数(尾)	20	20	20	20	20	20	20	20
	総重量(g)	246.0	246.0	248.0	248.0	244.0	248.0	244.0	256.0
終了時	平均体重(g)	19.4	19.7	18.9	18.3	22.6	20.9	18.2	20
	生残数(尾)	19	20	17	18	20	19	6	10
	総重量(g)	368.6	394.0	321.3	329.4	452.0	397.1	109.2	200.0
	給餌量(g)	370.0	376.0	337.0	358.0	380.0	372.0	216.0	278.0
	補正増重量(g) ^{*1}	136.5	148.9	112.0	106.6	208.6	148.5	31.2	82.9
	補正飼料効率(%) ^{*2}	36.9	39.6	33.2	29.8	54.9	39.9	14.4	29.8

*1 補正増重量=終了時総重量+死亡魚総重量-開始時総重量

*2 補正飼料効率=100×(終了時総重量+死亡魚総重量-開始時総重量)/給餌量

の結果は、実用性の高い冷水病耐病種苗を開発するためには、複数の冷水病菌株を用いた選抜を行う必要があることを示している。

新規系は養魚場株群に対する十分な耐性を持たないのに対し、海産系は養魚場株群に対する高い耐性を示したことにより、冷水病耐性に関する海産系の優位性を確認することができた。海産系の冷水病発生中の成長、増重量、飼料効率は、新規系のそれらより有意に高いことが示された。アユは産卵期になると成長停滞を起こすことが知られているため(高橋, 1998)、両者の成長の差異が冷水病耐性の差異に基づくか否かを判断するためには、両者の産卵時期についても確認しておく必要がある。2012年の新規系の採卵開始時期は9月29日、海産系のそれは10月9日からであり、両種苗の採卵時期にはおよそ10日間の差があった。しかし、本実験は、二倍体アユの成長停滞が始まるとされる産卵開始時期(稲田, 1997)のおよそ1ヶ月前の8月31日に終了していることから、本実験における両種苗の成長差に対する成熟の影響は限定的であると考えられる。これにより、冷水病発生時の特性(高い生残率と成長)のみを考慮すれば、海産系は新規系より生残性、成長特性ともに優れた種苗であると結論づけられる。しかし、海産系と新規系を用いた民間アユ養魚場での実用化試験において、ふ化65日後(平均体重0.2g)で飼育用水の淡水化を実施したところ、新規系では死亡が認められなかったのに対して、海産系では90%以上が死亡した(荻谷, 2013)。加えて、聞き取り調査の結果、飼育水温の低い一部の養魚場からは、海産系の成長が養魚場既存の種苗より劣ることが指摘されている。このように実用化試験における養殖種苗としての相対的評価は、海産系より新規系の方が優れている。このため養殖アユ生産者からは新規系の冷水病耐性の改善が求められている。新規系は海産系と湖産系の交雑群を起源とするため、海産系が養魚場株群に対する耐病性遺伝子を元々持っていたと仮定

すると、その耐病性遺伝子が新規系の中に内在されている可能性が高い。既報により明らかにしたとおり、毎世代冷水病耐過魚を用いて継代することにより、冷水病耐性を向上させられることから(桑田, 2008, 2009; 桑田ほか, 2010; 荻谷ほか, 2012)、同様の方法で選抜を繰り返すことにより養魚場株群に対する新規系の冷水病耐性を改善できると考えられる。そこで今後は、養魚場株群による人為感染耐過魚で継代を繰り返し、新規系の冷水病耐性向上を図る予定である。

要 約

- 冷水病耐性アユ種苗(新規系)を用いた実用化試験で冷水病による想定を超えた死亡が認められた。その原因を究明するため、当研究所で選抜育種に用いてきた冷水病菌株(研究所株)と養魚場で発生した冷水病菌株群(養魚場株群)を用いて、2種類のアユ種苗(海産系、新規系)で実験感染を行った。
- 海産系に研究所株を感染させた場合の実験終了時の平均生残率は97.5%、海産系に養魚場株群を感染させた場合のそれは97.5%であり、海産系はいずれの冷水病菌株に対しても高い耐性を示した。
- 新規系に研究所株を感染させた場合の実験終了時の平均生残率は87.5%、新規系に養魚場株群を感染させた場合のそれは40.0%であり、新規系は研究所株に対して高い耐性を持つものの、養魚場株群に対しては十分な耐性を示さなかった。
- 冷水病感染実験終了時の平均体重、補正増重量、補正飼料効率を種苗間で比較したところ、冷水病耐性の高い海産系は新規系に比べて、終了時の平均体重が大きく、補正増重量が多く、補正飼料効率が高いことが示された。

文 献

- アユ冷水病対策協議会. 2008. アユ冷水病対策協議会取りまとめ, 1-23.
- 岐阜県農政部農政課水産振興室. 2012. 岐阜県の水産業, 14-16.
- 稲田善和. 1997. 人為三倍体アユの生物学的特性と応用に関する研究. 福岡県水産海洋技術センター研究報告, 6: 1-95.
- 井上 潔. 2000. アユの冷水病. 海洋と生物. 生物研究社, 22: 35-38.
- 苅谷哲治. 2013. 冷水病に強い人工産アユ種苗の開発. 岐阜県河川環境研究所業務報告, 12.
- 苅谷哲治, 桑田知宣, 景山哲史. 2012. 冷水病に強い人工産アユ種苗の開発 選抜履歴が異なる 4 種類の系統の冷水病耐病性の違い. 岐阜県河川環境研究所研究報告, 29-32.
- 桑田知宣. 2008. 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 年度岐阜県河川環境研究所業務報告, 12-13.
- 桑田知宣. 2009. 冷水病耐病性に関する選抜. 平成 19 年度岐阜県河川環境研究所業務報告, 16.
- 桑田知宣, 景山哲史, 大原健一, 原 徹, 斎藤 薫. 2010. 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. 岐阜県河川環境研究所研究報告, 55, 5-15.
- 永井崇裕. 2011. 新規交配系アユの特徴とタイプの異なる冷水病菌に対する耐病性. 平成 23 年度広島県立総合技術研究所水産海洋技術センター研究成果発表会講演要旨.
- 高橋昭夫. 1998. 染色体操作による全雌三倍体アユの作出と飼育特性. 神奈川県水産総合研究所研究報告, 3: 69-77.
- 山本充孝, 二宮浩司. 2000. 凍結病魚を用いた冷水病人為感染試験. 平成 12 年度滋賀県水産試験場事業報告, 106-107.
- 吉浦康寿, 釜石 隆, 中易千早, 乙竹 充. 2006. Peptidyl-prolycyl-trans isomeraseC 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, 41(2): 67-71.