

冷水病に強いアユ養殖種苗の開発

大原健一, 田中綾子, 荻谷哲治, 松田宏典

Development of ayu cultivated seedlings resistant to cold-water disease

Kenichi Ohara, Ayako Tanaka, Tetsuji Kariya, Hironori Matsuda

水産養殖業の拡大に伴い、魚病による経済的損失も拡大し、魚病対策が養殖業者にとって問題となっている。その中で、魚病に対して抵抗性を持つ系統の作出は、治療のために使用する薬剤等の経費を節減するために有効な手法である。しかし、水産分野における品種の確立は、コイやキンギョ、ニジマスなどにおいて、成長の早い個体や産卵時期を変化させた系統が作出されているが、いまだ一部の魚種に限定されているのが現状である（中西・松浦，2016）。特に、耐病性系統の作出には、「魚病に感染して生き残った個体を親魚」とすることを繰り返す必要があるため、長い時間と手間がかかることが大きな要因である。さらに、人為感染を成立させることができるかどうかも大きなカギとなる。

冷水病は、世界中のサケ・マス類の養殖にとって最も脅威であり（Wahli and Madsen 2018）、アユ（*Plecoglossus altivelis altivelis*）においても近年、最も深刻な魚病である（中村，2018）。一方で、アユは年魚であり、他種と比較して世代交代が早い種である。また、人為的な感染の成立が比較的容易であることから、耐病性系統の作出が期待できる。

琵琶湖で陸封化されたアユは湖産系アユ（以下湖産系）と呼ばれ、一般的な両側回遊するアユ（以下海産系）とは形質が異なり、卵数が多いことなどから（辻村・谷口，1995）、養殖アユとして多く利用されている。しかし、冷水病に対して感受性が高く、高い死亡率を示すことが知られている（Kageyama et al., 2013）。一方で、海産系のアユは、冷水病に対する感受性が低く、比較的低い死亡率を示している。これは両系統における、冷水病に対する耐病性遺伝子の頻度の差による可能性がある。

そこで、本研究ではアユにおいて冷水病耐病系統の作出のため、海産系アユと湖産系アユを交雑させ、選抜育種を実施し、その耐病性の評価を行った。

キーワード: アユ、冷水病、耐病性系統、選抜育種

材料と方法

種苗の由来: 試験に用いたアユ系統の由来、冷水病の感染履歴については Table 1 に示した。耐病性系統とした交雑系は湖産系と海産系雄の交雑群を起源とし、2004 年、および 2010 年から 2012 年に研究所菌株に対する感染耐過魚を、2013 年から 2014 年は養魚場菌株に対する感染耐過魚を親魚として選抜した系統である。また、比較対象として、海産系および湖産系を使用した。海産系は木曾川の天然魚を起源として、2005 年から 2007 年、および 2009 年から 2012 年に研究所菌株に対する感染耐過魚を、2013 年から

2014 年は養魚場菌株に対する感染耐過魚を親魚として選抜した系統である。湖産系は、人為感染による選抜は実施していない。

菌株の由来: 本研究では、2 つの菌株を感染実験に利用した。一つは、2005 年から研究所の感染実験に使用している冷水病菌であり、以下研究所株とする。もう一つは、2011 年に県内養魚場で発病したアユから単離した冷水病菌であり、以下養魚場株とする。

Table 1. Origin of ayu used for the investigation, and infection history of cold-water disease

Lines	Year of introduction	Origin of lines	Used cold-water disease strain and its artificial infection history
Selected Hybrid Line	2004	Amphidromous line × Landlocked line	Laboratory strain : 2004、2010～2012 Farm strain : 2013～2014
Amphidromous line	2003	Wild fish from the Kiso River	Laboratory strain : 2005～2007、2009～2012 Farm strain : 2013～2014
Landlocked line	2001	Landlocked line from the Lake Biwa	None

感染実験:感染実験の実施状況について Table 2 に示した。感染実験は、-80℃で凍結保存しておいた各菌株により冷水病で死亡したアユ（排水感染法による死亡魚）を上部水槽に垂下し、その排水を各実験区水槽に導入し続けることで感染を成立させた。また、上部水槽には、冷水病菌を増幅させるため湖産系アユを投入した。アユの飼育は約 100L の円形タライ水槽で実施した。給餌は、初期体重の 5% を 1-2 回/日を原則とし、生残状況により適宜増減した。実験終了後の系統間の平均生残率の違いについて比較検定 (t 検定) を行った。なお、3 群での比較については、ANOVA により検定を行った後に、有意差が認められた場合には、各系統間の比較検定 (t 検定) を行い、多重比較をさけるため、Bonferroni 法により有意水準を調整した。

感染選抜:感染選抜の実施状況について Table 3 に示した。感染選抜は、3t の FRP 水槽に親魚候補のアユを入れ、冷水病で死亡したアユ (-80℃で凍結保存) を直接水槽に垂下して冷水病菌に晒し、生残したものを親魚とすることにより行った。2 種類の菌株で選抜を実施する場合には、最初の死亡魚の垂下から約 1 か月後に、異なる菌株で死亡した死亡魚を垂下した。給餌は、体重の 3-5% を自動給餌機により行い、残餌や生残状況により適宜増減した。感染選抜終了後に、生残魚から採卵を行い、次世代を作出し、翌年の試験魚として使用した。

Table 2. Details of artificial infection experiments

Year	Bacterial strains and experiment periods	Ayu lines	Number of ayu	Number of repetition tanks
2015	Farm strain: August 5 - September 4	Selected Hybrid Line, Landlocked line	18	2
2016	Farm strain: June 11 - July 11	Selected Hybrid Line, Landlocked line	25	3
2017	Farm strain: June 9 - July 2	Selected Hybrid Line, Amphidromous line, Landlocked line	20	4
	Laboratory strain: August 25 - September 13	Selected Hybrid Line, Amphidromous line, Landlocked line	15	4

結 果

各系統の感染実験開始時の平均体重および、試験終了後の平均生残率を Table 4 に示した。いずれの年も、養魚場株に対しては、交雑系は湖産系よりも有意に高い生残率を示した ($P < 0.05$)。また、2017 年に実施した研究所株に対する感染実験においても、交雑系は湖産系よりも有意に高い生残率を示した ($P < 0.05$)。2017 年の結果から、交雑系の耐病性は、海産系とほぼ同等であることが示された。さらに、交雑系の生残率は 2015 年よりも 2016 年と徐々に向上し、2017 年は 2016 年とほぼ同等であった。一方で、湖産系は、年によるばらつきはあるものの、概して低い生残率であった。

考 察

本研究では、冷水病による感染選抜を実施し、それらの生残率を評価した。選抜を実施した交雑系は、徐々に生残率が向上し、2017 年には、冷水病の感染実験による死亡は、ほぼ認められなくなった。一方で、感染選抜を実施していない湖産系は、生残率の向上は認められなかった。

このことは、アユの冷水病に対する耐病性が遺伝的に支配される要因、つまり耐病性遺伝子の存在が示唆されることを示唆している。感染選抜によって、耐病性遺伝子を

Table 3. Details of selection by artificial infection of cold water disease

Year	Bacterial strain and selection by artificial infection	Egg collection days
2014	Farm strain: August 7 - October 6	October 7 and 10
2015	Farm strain: August 7 - September 29	September 30, October 6, 9
2016	Farm strain: August 4 - September 19	September 20, 23, 27
	Laboratory strain: July 7 - August 3	

持たないアユが死亡し、耐病性遺伝子を保有する個体のみが次世代を残すことによって、選抜効果が上昇したことが推察される。ここでいうアユの生残率という形質は、生死での判断のため、質的形質と解釈が可能である。不連続で質的な違いとして示される形質である質的形質であれば、少数あるいは単一の遺伝子座の影響を受けることから、選抜効果による遺伝子頻度の変動を下記の仮説によって検討した。

Table 4. Average survival rate in infection experiments, and average body weight at the start of experiment

Year	Bacterial strains	Ayu lines	Average body weight (g) at start	Average survival rate (%)
2015	Farm strain	Selected Hybrid Line	17.8	61.1
		Landlocked line	17.8	25.0
2016	Farm strain	Selected Hybrid Line	3.6	96.0
		Landlocked line	3.5	25.3
2017	Farm strain	Selected Hybrid Line	37.1	95.0
		Amphidromous line	21.5	100.0
		Landlocked line	37.8	30.0
	Laboratory strain	Selected Hybrid Line	3.3	98.3
		Amphidromous line	4.7	73.3
		Landlocked line	3.2	0.0

ある遺伝子座の対立遺伝子に a (冷水病耐病性遺伝子)、b (冷水病感受性遺伝子) の 2 種の対立遺伝子があると仮定する。この場合、遺伝子型は、aa (耐病性遺伝子ホモ型)、bb (感受性遺伝子ホモ型)、ab (耐病性遺伝子×感受性遺伝子のヘテロ型) の 3 種類となる。さらに、aa 型の冷水病に対する生残率を 100%、bb 型を 0% と仮定した。ab 型の生残率は、耐病性遺伝子を持つ個体がすべて生残する 100%、半数が生残する 50%、1/4 が生残する 25% の 3 パターンで仮定した。また、0 世代目の各対立遺伝子の頻度を $a=0.5$ 、 $b=0.5$ とした。なお、生残率は、遺伝子型 aa 頻度と遺伝子型 ab の各生残率を合計したものとなる。また、耐病性以外の形質による次世代への貢献度合いは同一と仮定する。

上記の仮定に基づく生残率の変動を 20 世代後まで推定した (Fig. 1a)。選抜を開始すると、ab 型の生残率が 100% の場合、当初は 75% の生残率があり、1 から 7 世代目まで

は 2-7% で耐病性遺伝子の頻度が上昇するものの、13 世代目以降は、1% 以下の上昇率となる。ab 型の生残率が 50% の場合、当初は 50% の生残率であり、1 から 3 世代目までは高率で生残率が上昇し、8 世代目以降はほぼ 99% 以上の生残率となる。ab 型の生残率が 25% の場合、当初は 36.7% の生残率であるものの、5 世代目以降はほぼ 99% 以上の生残率となる。このことは、単一の遺伝子座に支配される耐病性遺伝子の単純なモデルではヘテロ型の生残率が、その後の選抜効果に大きく影響されることがわかる。各生残率における感受性遺伝子の遺伝子頻度の変化を Fig. 1b に示した。ヘテロ型である ab 型の生残率が 50% および 25% の場合、5-8 世代後の感受性遺伝子の頻度は、ほぼ 0% となるものの、生残率が 100% の場合には、20 世代後にも約 10% の頻度を維持している。また、感受性遺伝子の頻度は、 N_e (有効集団サイズ) にも大きく左右される。 N_e が 50 の場合、ab 型の生残率が 50% および 0% の場合、2-3 世代後には、bb 型のホモの遺伝子型を持つ個体数は 1 以下 (つまりはゼロ) となるが、100% の場合には 13 世代後にようやく 1 以下となる (Fig. 1c)。さらに、ab 型の生残率が 100% であっても、 N_e が 25、50、100、500 の場合に、大きく異なり、 N_e が小さければ小さいほど、短期間で感受性遺伝子の消失が起きることがわかる (Fig. 1d)。

本研究で得られた生残率と、上記仮説に基づく生残率を比較すると、2015-2017 年の平均生残率は 66.1% → 96.0% → 99.2% と上昇しており、急激に上昇していることがわかる。この原因は、2 つの要因が考えられる。一つは、冷水病に対する感受性遺伝子が、少数の遺伝子座の影響を受け、さらに、耐病性遺伝子と感受性遺伝子のヘテロ型の個体の死亡率が高かった可能性がある。もう一つは、採卵に用いた親魚数が少なく、 N_e が非常に小さかったことが考えられる。Table 3 にあるように、本研究では、成熟期に感染選抜を行ったため、斃死や、産卵に適さない状態の魚が多く十分な数の親魚が得られなかった。つまり、採卵に用いた親魚数が少なく、 N_e が非常に小さかったことが、急激な感染選抜の効果が得られた原因の可能性もある。

一般に養殖魚の N_e は 50 以上が望ましいとされていることから (FAO, 1993)、感染選抜の際には、 N_e の減少に憂慮しつつ実施することが望ましい。一方で、 N_e が大きいと選抜効果が得られるまでに時間を要する恐れがある。冷水病の耐病性・感受性の決定が少数の遺伝子座によるものであるなら、DNA マーカー選抜等の技術を利用しながら、 N_e の減少に歯止めをかけることも可能となるため、今回の生残率の上昇と耐病性遺伝子の関係についてはさらに検討する必要がある。

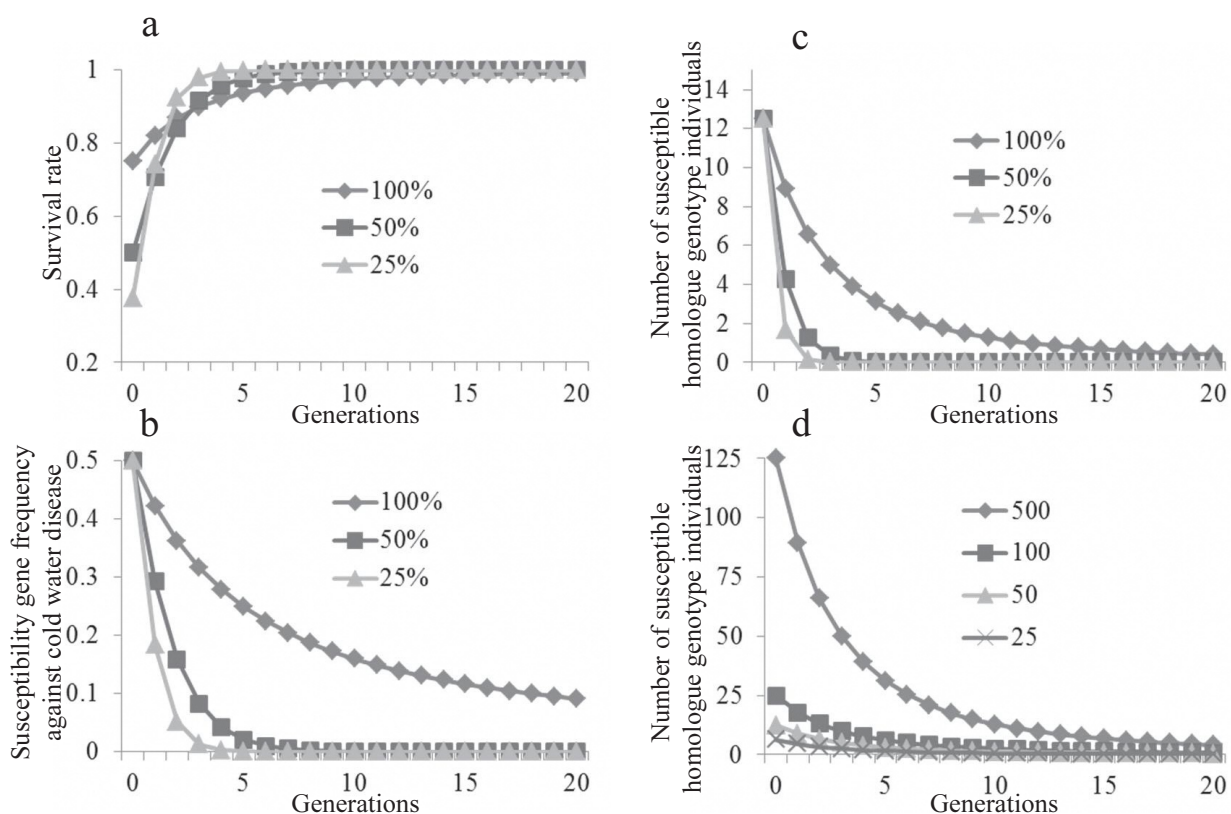


Fig. 1. Changes in estimated value of survival rates, gene frequencies, N_e (effective population size) until 20 generations after infection selection against cold water disease. a: changes in estimated value of survival rate at hetero genotypes against cold water disease (survival rates 25%, 50% and 100%). b: resistance gene frequencies against cold water disease at different survival rate 25%, 50% and 100%). c: number of susceptible homologue genotype individuals against cold water disease at three different survival rate in $N_e = 50$. d: Number of susceptible homologue genotype individuals against cold water disease (survival rate is 100%) at four different N_e (25, 50, 100, 500).

要 約

1. 冷水病耐性のアユ種苗育種のため、琵琶湖産系アユと海産系アユの交雑系を作成し、2種類の冷水病菌株で感染耐過を試みた。
2. いずれの冷水病菌株に対しても、交雑系は湖産系よりも有意に高い生残率を示した。
3. 冷水病の感染による選抜効果が認められたことからアユの冷水病に対する耐病性が遺伝的に支配される要因、つまり耐病性遺伝子の存在が示唆された。

文 献

- FAO. 1993. Report of the expert consultation on utilization and conservation of aquatic genetic resources. FAO Fisheries Report, 491: 58.
- Kageyama T, T. Kuwada, K. Ohara, A. Nouno, T. Umino S. Furusawa. 2013. Comparisons of internal behavior after exposure to *Flavobacterium psychrophilum* between two ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) strains showing different cumulative mortality to bacterial cold water disease. Journal of Veterinary Medical Science, 75: 1571-1575.
- 中村 智幸. 2018. 内水面漁協におけるアユと溪流魚の放流事業の採算性. 日水誌, 84: 705-710.
- 中西照幸・松浦雄太. 2016. 魚類疾病の現状と課題. 日獣会誌, 69:27-35.
- 辻村明夫・谷口順彦. 1995. 生殖形質に見られた湖産および海産アユ間の遺伝的差異. 日水誌, 61: 165-169.
- Wahli T, L. Madsen. 2018. Flavobacteria, a never ending threat for fish: a review. Current Clinical Microbiology Reports, 5: 26-37.