

# 継代数の異なる親魚を用いて生産したアユ人工産種苗の冷水病耐性の差

増成伸文・難波洋平・植木範行

Differences in the Resistance to Bacterial Coldwater Disease between Two Stocks of Ayu (*Plecoglossus altivelis*); Hatchery Stocks and Captative Stocks Derived from Wild Amphidromous Form

Nobufumi MASUNARI, Youhei NANBA, and Noriyuki UEKI

キーワード：アユ, 冷水病, 抵抗性, *Flavobacterium psychrophilum*

アユ *Plecoglossus altivelis* の冷水病は1987年に初めて確認<sup>1)</sup>されてから20年近く経つが、いまだに全国の河川や養魚場で多発し、アユ放流事業をはじめとする内水面漁業に甚大な被害を及ぼしている<sup>2,3)</sup>。河川へのアユ種苗の放流にあたっては、非保菌種苗を放流することが重要である<sup>3,4)</sup>が、多くの場合、放流後に河川内で冷水病に感染する傾向にある<sup>5)</sup>。しかも冷水病に感染したことのない種苗は一旦感染発病すると、感染歴のある種苗よりも被害が深刻であることが多い。このため、非保菌でしかも冷水病に強いアユ種苗の育成が切望されている。

河川で発生する冷水病の対策として、これまでに油性アジュバントを用いた注射ワクチンで安定した強い予防効果が確認されており<sup>6,7)</sup>、その後、比較的大量の種苗への投与が可能な経口ワクチンや浸漬ワクチンにおいても予防効果が報告されている<sup>8,9)</sup>。しかし冷水病ワクチンの実用化までにはかなりの時間を要する状況にある<sup>10)</sup>。

今回我々は、継代数の異なる親魚から生産された人工産種苗の冷水病に対する抵抗性を感染試験により比較した結果、人工産種苗は用いる親魚によって冷水病に対する抵抗性に大差を生ずることが明らかになったので、その概要を報告する。

## 材料と方法

**供試魚** 表1に供試魚及び攻撃試験における実験条件を示した。供試魚として、継代数が異なる3種類の人工産種苗を用いた。すなわち、本県の継代親魚を用いて生産した種苗(以下長期継代)、海産遡上魚と考えられる河川産天然親魚を用いて生産した海産系1代目種苗(以下F1)及びその2代目種苗(以下F2)である。なお長期継代は、'00年には25代目(以下F25)、'01年には26代目(以下F26)に相当する。種苗はいずれも岡山県内で種苗生産され、その後、岡山県水産試験場魚病指導センターにて飼育したものである。

表1 実験条件

試験No.	攻撃年月日 (開始日)	供試魚の平均体重(g/尾)					観察期間 (日間)	水温 (°C)	生残魚の 保菌検査 (攻撃開始後日数)
		長期継代 <sup>*1</sup>		海産系1,2代 <sup>*3</sup>					
		F25	油ワクチン <sup>*2</sup>	F26	F1	F1 <sup>*4</sup>			
試験1	2000/ 8/16	20.3			15.2		14, 21	14.9-17.9	21
試験2	10/31	28.6	25.2		19.6	45.0	14	13.5-18.0	14
試験3	2001/ 6/23			8.0	6.0	7.1	14	15.3-17.0	14
試験4	11/ 6			7.5	8.1	8.7	14	13.6-15.7	14

\*1: 河川の天然魚からF1を生産した。少なくともF18-26は継代親魚同士の掛け合わせで生産したものである。ただしF22は雄親に河川の天然魚を使用した。なおF18, F19は冷水病を経験したが、F20以降は冷水病の経験が全くない。

\*2: 事前に冷水病の注射ワクチンを投与したF25。

\*3: 河川の天然魚(鱗数, 鱗相, 種苗の放流実績, 採捕時期等から海産遡上魚と考えられる天然魚)からF1を生産した。

\*4: F1と同じ種苗だが、2月以降は別の養魚場で飼育した。

いずれの供試魚も冷水病の感染歴はなく、保菌検査においても本病の原因菌 *Flavobacterium psychrophilum* (以下冷水病菌) は検出されなかった。なお、産卵に伴う成熟を抑制するため、'00年は8月以降、'01年は7月以降、電照による長日処理を行った。

**試験区** 試験は'00年に2回と'01年に2回の計4回行った。試験1では長期継代とF1の比較を行った。試験2では、長期継代、F1に加えて、注射ワクチンを投与した長期継代(以下油ワクチン接種区)及び別の養魚場で飼育されたF1(以下F1')の比較を行った。試験3と試験4では、長期継代、F1及びF2の比較を行った。なお試験2のワクチンは、冷水病に対して強い予防効果をもつ油性アジュバント添加ホルマリン不活化ワクチンを用いた。ワクチンの作成方法等は増成ら<sup>7)</sup>に従って行い、供試魚へのワクチンの接種は攻撃試験に供試する56日前に行った。また試験2のF1'については、予備試験や試験1から長期継代に比較してF1が冷水病に強いとの結果を得ていたが、念のため、飼育履歴や飼育条件や魚体サイズ等の異なるF1についても冷水病耐性を調べたものである。

**攻撃試験** 各試験区は各々2水槽使用し、1水槽あたり10~25尾の供試魚を收容した。攻撃方法は冷水病自然発病アユを收容した水槽の水を、各試験区に循環させる方法<sup>7)</sup>で行った。その後14日間若しくは21日間、死亡状況等を観察し、死亡率を算出した。

なお攻撃試験期間中の死亡魚については、冷水病特有の口周辺や体表の穴あき症状(潰瘍)の確認と、改変TYE寒天培地<sup>7)</sup>を用いて腎臓から菌分離を行い、冷水病による死亡を確認した。また、攻撃試験終了後の生残魚については、腎臓からの分離培養法により保菌検査を行った。冷水病菌の同定は、1)冷水病菌らしき黄色コロニーを形成する、2)長桿菌である、3)抗冷水病菌血清(抗FPC840<sup>10)</sup>(PT87024と同一菌株)による凝集試験<sup>7)</sup>で陽性反応を示す、の三条件すべてを満たすものを冷水病菌と判定した。

**冷水病耐性の評価** 各種苗の冷水病に対する抵抗性は、攻撃試験開始14日後の死亡率及び相対生残率RPS60<sup>11)</sup>によって評価した。RPS60は本来ワクチンの有効性判定に用いられる指標であるが、本報では長期継代(F25, F26)を対照区とし、これに比較してF1及びF2がどの程度冷水病に強いかの指標として用いた。なおRPS60の求め方は次のとおりである。

$$RPS : \text{Relative percent survival} (\%)^{12)} = \{1 - (\text{各試験区の死亡率} / \text{対照区の死亡率})\} \times 100$$

$RPS60 (\%) = \text{対照区の死亡率が} 60\% \text{以上になった時点で計算されるRPS}$

## 結 果

試験の結果を表2~5に示した。試験1では攻撃開始8日後に長期継代の死亡率が60%に達し、その時点のF1の死亡率は僅か5%であった。この時点の死亡率から計算されるF1のRPS60(%)は92であった。14日後の死亡率は長期継代の93%に対し、F1は僅か23%であった。21日後の死亡率は長期継代の98%に対し、F1は35%であった。

試験2では攻撃11日後に長期継代の死亡率が60%に達し、その時点での死亡率は、油ワクチン接種区:15%、F1が5%、F1':5%であった。RPS60(%)は、油ワクチン接種区:75、F1:92、F1':92であった。攻撃14日後の死亡率は長期継代の95%に対して、油ワクチン接種区は20%、F1は5%、F1'は20%であった。

試験3では、攻撃13日後に長期継代の死亡率が62%に達し、その時点での死亡率は、F1:4%、F2:6%であった。RPS60(%)は、F1:94、F2:90であった。14日後の死亡率は長期継代の66%に対して、F1は4%、F2は6%であった。

試験4では、攻撃11日後に対照区の死亡率が60%に達し、その時点の死亡率はF1:5%、F2:0%であった。RPS60(%)は、F1:92、F2:100であった。14日後の死亡率は長期継代の73%に対して、F1は10%、F2は0%であった。

攻撃試験の結果をまとめると、攻撃14日後の死亡率は長期継代が66~95%の範囲であったのに対して、F1及びF2は0~23%の範囲と明らかに低い死亡率を示した。死亡率の平均値は、長期継代の82%に対し、F1は僅か10%、F2も僅か3%にとどまった。また、長期継代に対するRPS60(%)は、F1が92-94、F2が90-100と双方とも極めて高い値を示した。RPS60(%)の平均値はF1:93、F2:95であった。なお、ほとんどの死亡魚には冷水病特有の潰瘍が体表や口周辺にみられ、腎臓からは冷水病菌が分離された。

攻撃試験終了後の生残魚の保菌検査においても、長期継代に比較すると、F1及びF2は明らかに低い保菌率であった。

## 考 察

攻撃試験の結果から得られた死亡率及びRPS60から判断すると、長期継代種苗に比較して、F1及びF2は冷水

表2 試験1における攻撃開始後の死亡数の推移

試験区	供試尾数	攻撃開始後の経過日数														死亡率 (%)	相対生残率(%)		生残魚の保菌率(%)		
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14	計		RPS60	RPS
長期継代 (F25)	20					1	5	1	4	1	2	2	1		1	1	19	95			-
	20						2	3	3	4	5		1				18	90			100
	平均																	93	-	-	100
F1	20					1				1		1	1				4	20			14
	20							1			1	1		1	1		5	25			8
	平均																	23	92	76	11

表3 試験2における攻撃開始後の死亡数の推移

試験区	供試尾数	攻撃開始後の経過日数														死亡率 (%)	相対生残率(%)		生残魚の保菌率(%)		
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14	計		RPS60	RPS
長期継代 (F25)	10							2	1			2	1	1	1	1	9	90			100
	10							1		1	2	2		1	2	1	10	100			-
	平均																	95	-	-	100
油ワクチン	10														1	1	1	10			44
	10									1		1	1				3	30			57
	平均																	20	75	79	51
F1	10									1							1	10			33
	10																0	0			20
	平均																	5	92	95	27
F1'	10										1		1		2	4	4	40			50
	9																0	0			67
	平均																	20	92	79	58

表4 試験3における攻撃開始後の死亡数の推移

試験区	供試尾数	攻撃開始後の経過日数														死亡率 (%)	相対生残率(%)		生残魚の保菌率(%)		
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14	計		RPS60	RPS
長期継代 (F26)	25											4	2	4	4	1	15	60			70
	25									3	4	1	4	3	2	1	18	72			71
	平均																	66	-	-	71
F1	25					1											1	4			17
	25							1									1	4			21
	平均																	4	94	94	19
F2	25													1		1	1	4			21
	25									1				1		2	2	8			22
	平均																	6	90	91	21

表5 試験4における攻撃開始後の死亡数の推移

試験区	供試尾数	攻撃開始後の経過日数														死亡率 (%)	相対生残率(%)		生残魚の保菌率(%)		
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14	計		RPS60	RPS
長期継代 (F26)	20							1	2	5	2	3	1				14	70			67
	20								2	1	2	3	2	1		4	15	75			80
	平均																	73	-	-	73
F1	20											1					1	5			16
	20											1		1	1	3	3	15			24
	平均																	10	92	86	20
F2	20																0	0			0
	20																0	0			10
	平均																	0	100	100	5

病に対して極めて強いと考えられた。

今回得られた長期継代種苗に対するF1及びF2のRPS60の値と、これまでに長期継代種苗に各種の注射ワクチンを投与して得られているRPS60の値(増成ら, 2001)<sup>7)</sup>を比較すると, F1及びF2で得られたRPS60の値

(90-100)は, 長期継代種苗にホルマリン不活化ワクチンや水溶性アジュバント添加ホルマリン不活化ワクチンを接種して得られた値(44-67)よりも明らかに高く, 油性アジュバント添加ホルマリン不活化ワクチンを接種して得られた値(75-90)と同等若しくはそれ以上の値であっ

た。すなわち、F1及びF2の冷水病耐性は、強い予防効果の確認されている油性アジュバント添加ホルマリン不活化ワクチンを接種した長期継代種苗に匹敵すると考えられた。

このことから、放流用の人工産種苗を、これまでの長期継代主体からF1、F2主体に切り替えることで、本県におけるアユ冷水病被害の軽減が期待される。しかも、この手法は、種苗生産に用いる親魚の確保さえできれば、その後の余分な手間やコストはほとんど不要であり、しかも極めて大量の種苗への対応が可能なることから、現実的な冷水病対策と考えられる。また中間育成場や養魚場においても有効と考えられる。

今回の試験結果にもとづいて、'02年4・5月に旭川水系目木川と新庄川の一区域にF1(4~5g/尾、目木川:205kg,新庄川:220kg)を単独で放流した結果、他区域の漁況が芳しくなかったのに対して、F1単独放流区域では友釣・投網・刺網いずれもが近年になく豊漁であったことが確認されており<sup>13)</sup>、このことからその有効性がうかがわれた。

今回の試験は、本県で生産した人工産種苗の比較であったため、全国全ての長期継代種苗や海産系1、2代目種苗にも通用するとは現時点では断言できない。しかしながら、種苗生産に使用する親魚によって、生産された人工産種苗の冷水病耐性に大差を生ずることから、冷水病に強いアユ種苗を生産するには、親魚の選定が肝要であると考えられた。

### 要 約

1. 継代数の異なる親魚から生産した人工産種苗の冷水病耐性を、自然発病魚を用いた感染試験によって比較した。
2. 攻撃後の死亡率は、長期継代が66~95%、F1及びF2は0~23%であった。また、長期継代に対する各種苗の相対生残率RPS60(%)は、長期継代(0)<油性アジュバント添加ホルマリン不活化ワクチンを接種した長期継代(75-90)≦海産系F1(92-94)≡海産系F2(90-100)であった。
3. 種苗生産に用いる親魚によって、生産した人工産種苗の冷水病耐性に大差を生じた。このため冷水病に強い種苗を生産するには、親魚の選定が肝要と考えられる。
4. 人工産種苗の放流にあたっては、これまでの長期継

代種苗主体から海産系F1・F2主体に切り替えることで、本県におけるアユ冷水病被害の軽減が期待される。

### 文 献

- 1) 若林久嗣・沢田健蔵・J. M. Bertolini・J. S. Rohovec, 2002: アユの冷水病について, 平成4年度日本魚病学会春季大会講演要旨, p5.
- 2) 井上潔, 2000: アユの冷水病. 海洋と生物, 22, 35-38.
- 3) 若林久嗣, 2000: アユを死に追いやる冷水病の正体(そこが知りたい探偵団), 月刊釣り情報, 2000年5月号58-63, ミリオンエコー出版株式会社, 広島.
- 4) アユ冷水病対策研究会, 2001: アユ冷水病防疫に関する申し合わせ事項, 2001年3月.
- 5) 増成伸文, 2001: (わが県の内水面振興作戦) アユの冷水病対策研究について, 広報ないすいめん第24号, 平成13年4月, 全国内水面漁業協同組合連合会, p37-38.
- 6) M. H. Rahaman・M. Ototake・Y. Iida・Y. Yokomizo・T. Nakanishi (2000): Efficacy of oil-adjuvanted vaccine for coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*, *Fish Pathol.*, 35, 193-203.
- 7) 増成伸文・難波洋平・植木範行・河原栄二郎, 2001: アユの冷水病に対する注射ワクチンの予防効果, 岡山水試報, 16, 49-57.
- 8) M. Kondo・K. Kawai, M. Okabe・N. Nakano・S. Oshima, 2003: アユ冷水病に対する経口ワクチンの効果, *Dis. Aquat. Org.*, 55, 261-264.
- 9) 河原栄二郎, 2004: アユ冷水病ワクチンの開発の状況. 月刊アクアネット, 湊文社, 通巻72, 2004年6月, 46-50.
- 10) 若林久嗣, 2004: 魚介類の感染症・寄生虫病(江草周三・若林久嗣・室賀清邦), 初版, 恒星社厚生閣, p179・p183.
- 11) 全国湖沼河川養殖研究会アユ冷水病研究部会, 2001: ワクチン試験, アユの冷水病研究(平成6年~平成11年度の取りまとめ), 平成12年3月, p52.
- 12) AMEND. D. F, 1981: Portency testing of fish vaccines, *Develop. Biol. Standard.*, 49, 447-454.
- 13) 旭川中央漁業協同組合, 2002: アユ漁反省会・稚アユ放流と成果, あさひがわ, 第20号, 平成14年12月1日, p3・p8.