

## 屋内高密度ドジョウ養殖技術の高度化 全雌魚生産技術の開発

徳丸泰久

### 事業の目的

自家種苗が順調に生産できるようになり、生産者のニーズも生産の安定から質の向上へと変化している。品質面では東京の老舗の専門店からも評価されているが、子持ちの雌だけが欲しいといった要望がある。ドジョウの雌は雄に比べると成長が速いことから、雌だけを養殖できれば出荷までの養殖期間が短縮できる。また、専門料理店では子持ちドジョウが珍重されるので、選択的に雌だけを生産すれば他産地との差別化が図れることから全雌魚生産の技術開発に取り組んだ。

### 事業の方法

外部形態で雌雄が判別できる大きさまで飼育したドジョウの稚魚（日齢109）にアロマターゼインヒター（以下、「AI」とする）を添加した飼料を給餌し偽雄の作出を試みた。AI添加飼料を給餌する区（以下、「AI区」とする、雌10尾）と通常の飼料を給餌する区（以下、「対照区」とする、雌5尾、雄5尾）を設け、それぞれの飼料を毎日残餌がでない程度給餌し、2～3ヶ月に1回腹部を圧搾して精子の確認を行うとともに全長と体重の測定を行った。

さらに、AI区の生殖腺を用いた種苗生産も実施した。

### 事業の結果

試験開始から282日目に試験を中止し、全ての供試魚を開腹、生殖腺の状況を確認した。

開腹したAI区の生殖腺（写真1）の中に精巢に変異した個体や卵巣の一部が精巢に変異した個体が確認できた。また、写真2に開腹したAI区の雌の生殖腺を示した。胸鰭は雌であるのに、生殖腺は精巢であった。なお、対照区の生殖腺を写真3に示した。

次に、AI区の精巢を用いた種苗生産を実施した。当チームが親魚養成した平均体重79.4 gの雌5尾か

ら搾卵。卵重量は34.2 gであった。推定卵数は95,760粒、ふ化率は65.8%で、推定ふ化仔魚数は63,000尾であった。なお、このふ化仔魚を用いて2世代目の偽雄の作出を試みている（写真4）。

表1 飼育状況

日齢	AI区(雌10尾)				対照区(雌5尾、雄5尾)			
	平均全長 (mm)	平均体重 (g)	総給餌量 (g)	生残 尾数	平均全長 (mm)	平均体重 (g)	総給餌量 (g)	生残 尾数
109	76.9	3.1	0	10	75.8	2.9	0	10
149	90.5	4.8	33.2	9	90.2	5.0	33.2	9
189	104.3	7.0	113.2	9	106.1	7.3	113.2	9
238	114.4	9.8	211.2	7	122.9	12.3	211.2	7
280	128.6	16.0	295.2	7	134.6	15.4	295.2	5
391	137.5	18.1	517.2	6	148.0	23.7	517.2	3



写真1 日齢391のAI区の生殖腺

(左：生殖腺の一部が精巢に変異、左から2番目：精巢に変異、その他の生殖腺は卵巣が萎縮)



写真2 開腹したAI区の雌の生殖腺

### 今後の問題点

次年度は2世代目の偽雄成魚を育成し、この精子を用いて種苗生産を実施する。また、その稚魚がすべて雌であることを確認するとともに、この稚魚から1世代目の偽雄作出時に用いたAIが検出されないことを確認し、全雌ドジョウが食品として安全であることを確認する。



写真3 日齢391の対照区の生殖腺  
(左：卵巣、中央および右：精巣)



写真4 日齢190の2世代目の偽雄稚魚の一部

# 魚病診断と対策指導－ 1

## 養殖衛生管理体制の整備

(食の安全・消費者の信頼確保対策推進交付金)

朝井隆元・樋下雄一・徳丸泰久

### 事業の目的

内水面における養殖衛生管理への恒常的な対応により、養殖経営の安定と、安全・安心な養殖生産物の生産および特定疾病のまん延防止を図る。

### 事業の方法

農林水産省消費・安全局長及び生産局長が定めた消費・安全対策交付金のガイドラインに基づき実施した。

### 事業の結果

#### 1. 総合推進会議の開催等

- 1) 全国会議 (表1)
- 2) 地域合同検討会議 (表2)
- 3) 県内養殖衛生対策会議 (表3)

#### 2. 養殖衛生管理指導

- 1) 医薬品等適正使用指導
- 2) 適正な養殖管理・ワクチン使用指導 (該当なし)

#### 3) 養殖衛生管理技術普及・啓発

- A. 養殖衛生管理技術の習得 (表4)
- B. 養殖衛生管理技術講習会 (表5)

#### 3. 養殖場の調査・監視

- 1) 養殖資機材使用状況調査
- 2) 医薬品残留検査 (該当なし)
- 3) 薬剤耐性菌実態調査 (表6)
- 4. 養殖衛生管理機器の整備  
該当なし

#### 5. 疾病の発生予防・まん延防止

- 1) 疾病の監視 (表7)
- 2) 疾病発生対策  
疾病の検査・診断 (表8)
- 3) 特定疾病まん延防止措置  
1,2の実施によって、まん延防止を図った。

表1 全国会議

実施時期	実施場所	構成員	内容
2014年12月4日	三重県	農林水産省消費・安全局 水産総合研究センター 都道府県養殖衛生管理担当者	最近の魚病関連情報
2015年3月6日	東京都	農林水産省消費・安全局 水産総合研究センター 都道府県養殖衛生管理担当者	水産防疫対策 養殖衛生管理対策関係事業 最近の魚病関連情報

表2 地域合同検討会議

実施時期	実施場所	構成員	内容
2015年 1月26～27日	福岡県	アユ疾病研究会関係員	アユの疾病発生状況 アユの疾病対策に関する事

表3 県内養殖衛生対策会議

実施時期	実施場所	構成員	内容
2014年4月16日	大分市	大分県水産振興課 大分県農林水産研究指導センター水産研究部 大分県振興局	ドジョウ疾病対策協議
2014年12月9日	国東市	大分県農林水産研究指導センター水産研究部 大分県漁業公社 河川漁業協同組合	アユ疾病対策協議

表4 養殖衛生管理技術の習得

実施時期	実施場所	出席者	内容
2015年3月5日	東京都	(社)日本水産資源保護協会 都道府県養殖衛生管理担当者	魚病診断技術に関する研修

表5 養殖衛生管理技術講習会

実施時期	実施場所	出席者	内容
2014年12月1日	別府市	内水面養殖業者 内水面養殖関係漁業協同組合担当者 水産養殖資材販売関係者 大分県水産振興課 大分県漁業公社 大分県振興局 大分県農林水産研究指導センター水産研究部	魚病発生状況とその対策 水産用医薬品の適正使用等について

表6 薬剤耐性菌実態調査

実施時期	実施場所	対象魚	内容
2014年4月1日～ 2015年3月31日	県内全域	アユ、マス類、ドジョウ、スッポン等	細菌分離とディスク法による感受性測定

表7 疾病の監視

実施時期	実施場所	対象魚	内容	実施時期	実施場所	対象魚	内容
2014年			養殖資材調査 疾病調査 および防疫指導	2014年			養殖資材調査 疾病調査 および防疫指導
4月8日	宇佐市(院内)	ドジョウ		10月9日	日田市(天瀬)	アユ、ヤマメ	
4月9日	佐伯市、日田市	アユ		10月20日	大分市	ドジョウ	
4月11日	宇佐市(院内)	ドジョウ		10月22日	日田市	アユ	
4月16日	日田市	アユ		11月25日	日田市(天瀬)	ヤマメ	
4月22日	杵築市、日出町	アユ		12月8日	国東市	アユ	
4月28日	佐伯市(弥生)	アユ		12月22日	国東市	アユ	
5月20日	日田市(大山)	アユ		2015年			
5月21日	臼杵市	スッポン		1月5日	佐伯市	アユ	
5月30日	佐伯市(弥生)	アユ		1月6日	日田市(大山)	アユ	
6月3日	日田市(大山)	アユ		1月9日	中津市(本耶馬溪)	アユ	
6月19日	日田市(大山)	アユ		1月14日	宇佐市(院内)	ドジョウ	
6月25日	日田市(大山)	アユ		1月16日	中津市(本耶馬溪)	アユ	
7月1日	日田市	アユ		1月20日	中津市(本耶馬溪)	アユ	
7月25日	佐伯市(直川)	アユ		1月22日	中津市(本耶馬溪)	アユ	
8月1日	豊後大野市(犬飼)	アユ		1月29日	中津市(本耶馬溪)	アユ	
8月22日	日田市(大山、天瀬)	アユ、ヤマメ		1月31日	中津市(本耶馬溪)	アユ	
9月3日	宇佐市(院内)	ドジョウ		2月4日	日田市(大山、前津江)	アユ、ヤマメ	
9月10日	日田市	アユ		2月16日	中津市(本耶馬溪)	アユ	
9月18日	豊後大野市(犬飼)	アユ		2月25日	中津市(本耶馬溪)	アユ	
9月19日	日田市	アユ		3月9日	中津市(本耶馬溪)	アユ	
9月29日	日田市(大山)	アユ		3月12日	大分市	ドジョウ	
				3月23日	竹田市	アマゴ	
				3月25日	豊後高田市(香々地)	スッポン	

表8 疾病の検査・診断

魚種名	疾病名	2014年												2015年			計	
		月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3				
アユ	細菌性鰓病		1															1
	細菌性冷水病					1												1
	ビブリオ病													1				1
	シェットモナス・アンギレセプティカ感染症				3	1		1										5
	エドワジエラ・イクタルリ感染症					1	2	1										4
	カラムナリス病								1									1
	ミズカビ病													2				2
	不明		2			1		4						3		2		12
	健康診断		3	2									2	2				9
	アユ小計		6	2	3	4	2	7	0	0	2	8	0	2	0	2		36
ヤマメ	伝染性造血器壊死症										2							2
	細菌性冷水病								1									1
	せつそう病								2									2
	ミズカビ病										2							2
	ヤマメ小計		0	0	0	0	0	0	3	4	0	0	0	0	0	0		7
ウナギ	パラコロ病								1									1
	ウナギ小計		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		1
ドジョウ	赤斑病							1										1
	カラムナリス病				1					2								3
	不明							1	1					2				4
	ドジョウ小計		0	0	1	0	0	2	1	2	0	0	2	0				8
スッポン	運動性エロモナス症				1													1
	不明						1						2					3
	スッポン小計		0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	0	0				4
コイ	ウイルス性コイ浮腫症			1														1
	健康診断															1		1
	コイ小計		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			2
ホシモロコ	不明								1									1
	ホシモロコ小計		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		1
合計			6	3	5	4	3	10	5	6	2	10	2	3	0	3		59

## 魚病診断と対策指導－2

### 貧血症状を伴うスッポンの不明病の原因究明

朝井隆元

#### 事業の目的

近年、スッポンは健康志向の高まりとともにその消費は増加し、さらにはサプリメント製剤の原料としても注目され、その需要は増加傾向にある。その一方で、養殖現場では全国的に親亀が不足しており、生産量を増やすことができない状況が続いている。

親亀の不足の要因として、親亀養成中のへい死が挙げられる。本事業では、へい死亀に多くみられる貧血症状を伴ったスッポンの不明病に着目し、対策を講じる上で必要不可欠な原因究明を行うことを目的とした。

#### 事業の方法

##### 1. 診断

養殖現場から、貧血症状を示した衰弱したスッポンを入手した上で、検鏡等を実施して、感染症である可能性について検討を行った。

##### 2. 稚亀の育成

内水面チームでは平成23年度にスッポン種苗の生産業務を終了した。このため、次年度に疾病対策試験に使用するためのスッポンを確保する必要があることから、新たにスッポンを孵化させて稚亀の育成を行った。

#### 事業の結果

##### 1. 診断

本年度は、養殖現場において、貧血症状を伴ったスッポンの大量死は発生しなかった。8月に養殖業者から「死亡はほとんどないが、貧血症状を伴った不明病の発症が疑われる」との情報提供はあったものの、すぐに終息へと向かった。

なお、上記の当該養殖池から衰弱した個体2尾を内水面チームに持ち帰り、検査を実施した。過去の貧血症の症例では、採血してHt値を測定すると数%程度であったが、今回検査した2尾にはHt値の異常な低下は認められなかった。

また、これまでの検査結果と同様に、トリプトソーヤ寒天培地を用いて腎臓から病原性細菌の分離を試みたが、病原体は分離されなかった。ただし、昨年度の調査では、迅速染色キット（ディフ・クイック、国際試薬株式会社）を用いて作成した腎臓のスタンプ標本の検鏡では、小さな短桿菌状の像がみられたが、本年度については、同様の短桿菌は確認されなかった。

一方で、本年度の検体には、腸管に腫瘍状の異物が形成されていたが、これまでの調査ではそのような症状は確認されていない。

##### 2. 稚亀の育成

8月30日から10月24日の間に、合計583尾のスッポンを孵化させて、次年度に疾病対策試験に使用するために育成を行った。

## 魚病診断と対策指導— 3

### ①異形細胞性鰓病の発症要因の検討

朝井隆元

#### 事業の目的

不活発な遊泳、食欲の低下といったアユのその様子から、養殖現場で通称「ボケ」と呼ばれている疾病は、細菌性鰓病（BGD）の原因として知られている *Flavobacterium branchiophilum* によって引き起こされると考えられていた。しかし、これまで「ボケ」と呼ばれていたアユの突然の大量死の中には、*F. branchiophilum* ではなく、ポックスウイルスに分類される（仮称 *Plecoglossus altivelis* Poxvirus (PaPV)）が関与する症例があることが、近年、明らかとなってきた。<sup>1,2)</sup> このウイルスによる疾病を異形細胞性鰓病（Atypical Cellular Gill Disease (ACGD)）と呼ぶことが提案されている。<sup>3)</sup>

ACGDが発症すると、大量死となる場合が多いため、養殖現場からは、その対策が強く求められている。ACGDへの対処法としては、一般的には長時間の塩水浴が行われており、<sup>4)</sup> 試験的に塩水浴の効果が認められた報告もある。<sup>5)</sup> また、和田<sup>6, 7)</sup> は、ACGDの病魚は正常魚と比較して血清中のNa<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>の濃度が低かったが、塩水浴を行った場合はNa<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>の濃度が増加したと報告した。ACGDの病魚にみられる鰓薄板の癒合等は、鰓の浸透圧調整機能を低下させると考えられるが、長時間の塩水浴が、アユの血清中のNa<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>のバランス調整を補っていることを示唆している。

ところが、大分県内の養殖現場では、ACGDに対して塩水浴の効果が認められない事例も多く発生している。福田<sup>8)</sup> は、ACGDに関する全国的な症例調査では、塩水浴の効果が判然としなかったと報告した。

石川<sup>9)</sup> は、ACGD発生時の塩水浴効果を認めている。塩水浴に効果が認められなかった事例については、環境的な要因でアユが死亡した可能性について指摘し、塩水浴中のDOやNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Nの管理が重要と報告した。しかし、その一方で、ACGD発症時の新たな対処法の検討の必要性についても述べている。

ACGDの対策研究を進めるためには、人為的にPaPVをアユに感染させて、死亡を再現する手法を確立することが必要不可欠である。ACGDに対する

塩水浴に関する知見についても、ACGDが自然発生した際の事例に限られているのが現状である。

感染実験においてACGDの再現の確認は、いわゆる「ボケ」症状を伴った死亡の他に、死亡魚からのPaPVの検出<sup>9)</sup>、ACGDの特徴である鰓上皮の異形肥大細胞の形成<sup>3)</sup>の有無によって行われる。しかし、これらの条件を満たして、ACGDの再現が確認された事例はほとんどない。筆者も、ACGDの病魚を網袋の中に入れて、試験用の循環水槽に吊すことによってPaPVの感染源とし、供試魚への感染を試みたが、アユは1尾も死亡しなかった（未発表）。

和田<sup>6)</sup> は、アユ養殖場の50事例について、鰓の染色標本の検鏡を行った結果、PCRでPaPVが陽性を示しながら、異形肥大細胞等の顕著な臨床症状が確認されない個体が多数観察されたことから、PaPVが感染して臨床症状に至るには、さらに別の要因が必要となる可能性を疑っている。仮に、単にPaPVと接するだけでは、アユはACGDを発症しないのであれば、養殖現場の症例から、発症要因を探る必要がある。なお、既に福田<sup>10)</sup> は、全国的な症例調査において、種苗が人工産という点では共通であったが、各地で使用された種苗に関連性はないと推定し、また、水温、魚体重および飼育密度に一定の傾向は認められなかったと報告している。このため、これ以外の視点から、ACGDの発症要因の検討が必要と思われる。

本事業においては、平成23年度に、スルフィソゾールナトリウム (SIZ) の投薬がACGD発症に与える影響について検討<sup>11)</sup>を行ったが、その影響はほとんどないと考えられた。しかしその一方で、本県だけではなく、他県においても、細菌性冷水病発生後の投薬後に、本症が発生する事例が多いとの情報がある。このため、本年度においても、もう一度、投薬の影響についての検討を行った。

#### 事業の方法

供試魚として、当チーム内で継代飼育している大野川由来のアユ (F29, 平均体重2.5g) を使用した。

表1 PaPVの接種条件

	SIZ投薬 <sup>*1</sup>	病魚鰓磨砕液浸漬攻撃 <sup>*2</sup>
試験区	○	○
対照区	×	○

※1 200mg/kg/日、5日間経口投与

※2 鰓重量換算で1/2000希釈、2時間浸漬

試験区および対照区の飼育条件は表1に示したとおりである。飼育には、FRP製水槽（0.45×1.70m×水深0.35m）2基を用い、供試魚を40尾ずつ收容し、河川水を注水した。水槽内で2日間馴致させた後、一方の水槽には市販の配合飼料を、もう一方の水槽には、市販の配合飼料にSIZを添加させたものを、それぞれ魚体重の1%を目安に5日間給餌した。なお、SIZの投与量が200mg/kg/日となるように試験区の飼料に添加した。

PaPVの接種は、5日間の投薬終了後の翌日に行った。PaPVの接種方法は、福田ら<sup>13)</sup>の報告を参考にして行った。県内のアユ養殖場において発生したACGDの病魚から鰓を摘出して、ホモジナイザーですりつぶしたものをPaPVの感染源とし、6Lの水が入ったバケツ2つに、それぞれ3g浮遊させた。それぞれのFRP水槽から供試魚をバケツに移し、エアストーンで曝気しながら2時間浸漬させた。2時間の浸漬後、それぞれの供試魚を元のFRP水槽へと戻し、止水（エアレーション曝気）の条件下で、15日間の観察を行った。なお、この間の水温は、17.5～21.5℃で推移した。

浸漬攻撃から4日後に両区から20尾ずつ、さらに観察終了時に残りの全ての供試魚を取り上げて、鰓のスタンプ標本の観察およびPCR法によるPaPV遺伝子の検出を試みることで、ACGDを発症しているかどうかの判定を行った。鰓のスタンプ標本の観察には、迅速染色キット（ディフ・クイック、国際試薬株式会社）を使用し、長桿菌（*F.branchiophilum*）や異形肥大細胞の有無の確認を行った。PCRに必要なとなる鰓からのDNAの抽出は、ISOGEN（ニッポンジーン）を用いて行った。PCRはサーマルサイクラー（2720Thermal Cycler, Applied Biosystems）を使用し、PCR条件は既報<sup>4, 13)</sup>に準じたが、非特異反応の防止に有効とされるホットスタート用のDNA合成酵素（AmpliTaq Gold, Applied Biosystems）を使用したため、PCRのプレヒート時間を10分間とした。増幅産物は、2%アガロース（Agarose HS, ニッポンジーン）を用い、電気泳動装置（Mupid-2plus, ADVANCE）で30分間の電気泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイドで核酸染色を行い、紫外線照射下で、増幅産物の大きさを確認した。

表2 浸漬攻撃4日後のACGDの判定

	異形肥大細胞の出現	PaPVの検出
試験区	0/20	2/20
対照区	0/20	3/20

表3 飼育終了時のACGDの判定

	異形肥大細胞の出現	PaPVの検出
試験区	0/20	0/20
対照区	0/20	0/20

## 事業の結果

飼育期間中に死亡魚はみられなかった。

供試魚がACGDを発症しているかどうかの判定結果は表2,3に示したとおりである。異形肥大細胞は、どの供試魚からも確認されなかった。PCR法によるPaPVの検出については、浸漬攻撃4日後では、試験区では2/20、対照区では3/20の供試魚が陽性となったが、飼育終了時では、どの供試魚からもPaPVが検出されなかった。

## 今後の問題点

今回、SIZの投与後にPaPVの浸漬攻撃を行うことで、投薬がACGD発症に及ぼす影響について検討を行った。その結果、供試魚は1尾も死亡しなかった。このため、本事業において平成23年度に実施した結果と同様に、投薬がACGD発症に及ぼす影響はほとんどないと考えられた。

ただし、浸漬攻撃4日後に実施したPCR法でPaPVが検出された供試魚は、試験区では2/20、対照区では3/20のみであった。このため、浸漬攻撃時のPaPV接種量が不十分であった可能性は否定できない。養殖現場からは、依然としてACGD対策の確立が強く求められているが、今後対策を検討するにあたっては、PaPVを定量接種する、すなわちPaPVを増殖させるための細胞培養技術の確立が不可欠と思われる。

## 文献

- 1) 和田新平. 不明病（「ボケ」）. 「新魚病図鑑」 緑書房, 東京. 2006 ; 71.
- 2) 福田顕穂. 8.アユ「ボケ病」のボックスウイルスとの関連に関する研究. 平成19年度養殖衛生管理間

- 題への調査・研究成果報告書, (社) 日本水産資源保護協会, 東京. 2008 ; 101-109.
- 3) Wada S, Atami H, Kurata O, Hatai K, Kasuya K, Watanabe Y, Fukuda H. Histopathology of gill lesions of ayu *Plecoglossus altivelis* clinically diagnosed with 'Boke' disease. *Fish Pathol.* 2011 ; **46**(2) : 59-61.
- 4) 魚類防疫技術書シリーズXXV II. アユの異形細胞性鰓病 (Atypical Cellular Gill Disease : ACGD) 診断・治療マニュアル, (社) 日本水産資源保護協会, 東京. 2011.
- 5) 石川孝典、尾田紀夫、渡邊長夫、小原明香. 5. アユ「ボケ病」の細菌学的研究. 平成21年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書, (社) 日本水産資源保護協会, 東京. 2010 ; 59-77.
- 6) 和田新平. 6. アユ「ボケ病」の病態生理および診断技術に関する研究. 平成19年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書, (社) 日本水産資源保護協会, 東京. 2008 ; 66-84.
- 7) 和田新平. 4. アユ「ボケ病」の病態生理および診断技術に関する研究. 平成20年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書, (社) 日本水産資源保護協会, 東京. 2009 ; 41-57.
- 8) 福田穎徳、石垣恵、太田周作. 3. アユ「ボケ病」のボックスウイルスとの関連に関する検討. 平成21年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書, (社) 日本水産資源保護協会, 東京. 2010 ; 27-46.
- 9) 石川孝典、尾田紀夫、小原明香、渡邊長夫、渡辺祐介、土居隆秀、横塚哲也、澤田守伸、糟谷浩一. アユの通称「ボケ病」に関する研究. 栃木県水産試験場研究報告2012 ; **55** : 4-17.
- 10) 福田穎徳、渡邊房子、太田周作、石垣恵. 6. アユ「ボケ病」のボックスウイルスとの関連に関する検討. 平成20年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書, (社) 日本水産資源保護協会, 東京. 2009 ; 73-85.
- 11) 朝井隆元. 魚病診断と対策指導-2, 平成23年度大分水研事業報告 ; 275-278.
- 12) 福田穎徳、井上友恵、和田新平. 4. アユのボケ病の防除技術に関する研究-アユボックスウイルスの病原性と迅速診断法に関する検討. 平成22年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書, (社) 日本水産資源保護協会, 東京. 2011 ; 39-53.

## 魚病診断と対策指導－3

### ②遡上アユからのアユポックスウイルス (PaPV・仮称) 検出の試み

朝井隆元

#### 事業の目的

前報で述べたとおり、養殖現場で異形細胞性鰓病 (ACGD) が発症した際には、長時間の塩水浴が行われており、試験的に塩水浴の効果が認められた報告もある。しかし、大分県内の養殖現場では、ACGD に対して塩水浴の効果が認められない事例が度々発生している。この結果として、毎年ACGDによって養殖アユに大きな被害が発生しているため、養殖現場からはACGD対策の確立が強く求められている。

ACGD対策を講じる上の問題点の一つとして、その原因ウイルスであるPaPVの感染源が不明である点が上げられる。PaPVの遺伝子の一部が、昆虫類から検出されるポックスウイルスに類似している点に着目した福田ら<sup>1)</sup>は、河川に生息する水生生物からのPaPVの検出を試みたが、PaPVを保菌する水生生物は見いだされなかった。

一方で、全国湖沼河川養殖研究会アユの疾病研究部会において、遡上アユから高い割合でPaPVが検出されたとの情報があつた (未発表)。大分県内では、遡上アユ (海産種苗) を利用して養殖が行われる事例は少ないものの、このことがACGD発症要因の一つとなっている可能性は否定できない。

そこで、本調査では、大分県内の主要河川である大分川、大野川および番匠川の3河川で捕獲された遡上アユからPaPVの検出を試みることで、遡上アユにおけるPaPVの浸潤状況を把握することを目的とした。

#### 事業の方法

遡上アユのサンプルは、当チームの事業である「漁場環境・水生生物モニタリング調査」において、投網で採捕された後にエタノール固定されたものを使用した。採取したサンプルの鰓からDNAを抽出し、PCR法によってPaPV遺伝子の検出を試みた。なお、PaPV遺伝子の検出手法は、前報と同様とした。

#### 事業の結果

PaPVの検査結果は表に示したとおりである。大分川が15尾、大分川が18尾、番匠川が18尾の合計51尾の遡上アユを検査したが、PaPVは全て陰性であった。

#### 今後の問題点

今回、大分県内の主要河川における遡上アユからPaPVの検出を試みたが、PaPVは検出できなかった。前述の全国湖沼河川養殖研究会アユの疾病研究部会における情報とは一致しない結果となったが、これは調査区域 (海域) の違いによるものなのか、それとも調査年度の違いによるものなのか、今後の調査および他県の関係機関との情報交換が必要と思われる。

表 遡上アユのPaPV検査結果

採捕河川	採捕日	平均体重(g)	PaPV陽性数 / 検査尾数
大分川	2014年4月25日	1.61	0/6
	2014年5月12日	1.84	0/9
大野川	2014年3月20日	2.22	0/18
番匠川	2014年3月20日	2.50	0/12
	2014年4月2日	3.15	0/6

## 文献

- 1) 福田穎穂、渡邊房子、太田周作、石垣恵. 8.アユ「ボケ病」のボックスウイルスとの関連に関する研究. 平成20年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書, (社) 日本水産資源保護協会, 東京. 2008 ; 73-85.

## 魚病診断と対策指導－4

### 三隈川水系における藻類からの *Flavobacterium psychrophilum* 検出の試み

朝井隆元

#### 事業の目的

1988年以降、河川・養殖を問わず全国的にアユに被害を与えている細菌性冷水病(BCWD)は、県内においても依然として問題となっている。特に、アユと観光業が密接な関係にある日田市の関係者からは、BCWD対策の構築が強く求められている。

これまで本県では、BCWD対策の一つとして、大分県漁業公社からのアユの出荷時などに、BCDWの原因である *Flavobacterium psychrophilum* の保菌検査を実施することによって、健全なアユ種苗の放流に努めてきた。しかし、どんなに健全なアユ種苗を河川に放流しても、その河川が *F. psychrophilum* で蔓延している環境下であれば、BCWD発生の防止は困難となる。

網田ら<sup>1)</sup>は、*F. psychrophilum* が蔓延している河川では、アユからのみではなく、河川水や藻類からも *F. psychrophilum* が検出されると報告している。この

ことは、河川水や藻類のモニタリングが、BCWD対策として有効となる可能性を示唆している。

そこで本事業では、日田市を流れる三隈川水系において、藻類からの *F. psychrophilum* の検出を試みた。今後、アユ種苗の放流前に藻類のモニタリングを行うことによって、アユ種苗の放流場所を選定する際に、BCWD発生のリスクが少ない支流を選択ことが可能かどうか検討することを目的とした。

#### 事業の方法

藻類の採取地点は、図に示したとおりである。早瀬の石を取り上げて、石表面の藻類をブラシで削ぎ落とし、回収した藻類を検査用サンプルとした。なお、持ち帰ったサンプルについては、顕微鏡下で優占種の確認を行った。藻類の採取は、2014年4月16日および同年6月3日に行った。



図 藻類の採取地点

表1 藻類採取時の水温と優占種 (2014年4月16日)

	調査地点	水温	藻類の優占種
St.1	玖珠川 東溪中学校前		欠測
St.2	小ヶ瀬 (沈み橋)	14.8℃	フナガタケイソウ類 (珪藻)
St.3	大山川 日田漁協前	13.8℃	フナガタケイソウ類 (珪藻)
St.4	道の駅「大山」前	13.5℃	フナガタケイソウ類 (珪藻)
St.5	赤石川 大山ダム上流		欠測
St.6	高瀬川 柚の木	12.2℃	ボルボックス類 (緑藻)
St.7	三隈川 三隈中学校前	15.5℃	フナガタケイソウ類 (珪藻)
St.8	大肥川 今山駅前	16.5℃	フナガタケイソウ類 (珪藻)
St.9	花月川 有田川合流点	18.0℃	フナガタケイソウ類 (珪藻)

表2 藻類採取時の水温と優占種 (2014年6月 3日)

	調査地点	水温	藻類の優占種
St.1	玖珠川 東溪中学校前	18.9℃	フナガタケイソウ類 (珪藻)
St.2	小ヶ瀬 (沈み橋)	20.1℃	ヒメマルケイソウ類 (珪藻)
St.3	大山川 日田漁協前	19.5℃	フナガタケイソウ類 (珪藻)
St.4	道の駅「大山」前	20.2℃	フナガタケイソウ類 (珪藻)
St.5	赤石川 大山ダム上流	16.8℃	テトラスポラ類 (緑藻)
St.6	高瀬川 柚の木	16.3℃	優占種なし
St.7	三隈川 三隈中学校前	20.4℃	ヒメマルケイソウ類 (珪藻)
St.8	大肥川 今山駅前	21.5℃	ユレモ類 (藍藻)
St.9	花月川 有田川合流点	22.9℃	フナガタケイソウ類 (珪藻)

*F.psychrophilum*の検査方法は、網田ら<sup>1)</sup>の手法と同様にPCRを用いた。藻類からのDNAの抽出についても同様にISOGEN (ニッポンジーン)を用いた。ただし、PCRに使用するDNA合成酵素として、非特異反応の防止に有効とされるホットスタート用のDNA合成酵素 (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems) を使用したため、PCRのプレヒートを10分間とした。なお、PCRにはサーマルサイクラー (2720Thermal Cycler, Applied Biosystems) を使用し、増幅産物は、2%アガロース (Agarose HS, ニッポンジーン) を用い、電気泳動装置 (Mupid-2plus, ADVANCE) で30分間の電気泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイドで核酸染色を行い、紫外線照射下で、増幅産物の大きさを確認した。

### 事業の結果及び今後の問題点

今回、PCRを用いて藻類からの*F.psychrophilum*遺伝子の検出を試みた。しかし、いずれのサンプルからも*F.psychrophilum*遺伝子は検出されなかった。このため、BCWD発生リスクを軽減することを目的として、三隈川においてアユ種苗を放流する前に、藻

類の*F.psychrophilum*検査を行い、放流適地を選定することが可能かどうかは判断できなかった。一方で、三隈川での*F.psychrophilum*の汚染度が低いとも考えられる。このため、三隈川でのBCWD発生を防止するためには、健全なアユ種苗を放流することが有効と思われる。

ところで、本調査を行った2014年に三隈川では、過去の前例がないと言えるほどアユが不漁となった。漁業関係者からの聞き取りでは、三隈川でアユ資源が大きく減耗した時期は2014年5月から6月にかけてと推測される。本調査の結果などを踏まえると、少なくともアユ不漁の原因はBCWDではないと判断されるが、依然としてアユ不漁の原因は不明なままとなっている。

表1,2に示したとおり、三隈川水系ではほとんどの河川で珪藻類が優占種となっていた。一方で、アユの成長には藍藻類が不可欠<sup>2)</sup>と考えられており、今後、三隈川では病原体だけでなく、藻類を含めた河川環境の調査が必要と思われた。

### 文献

- 1) 網田健次郎、星野正邦、本田智晴、若林久嗣. 河川における *Flavobacterium psychrophilum* の分布調査. 魚病研究35(4) ; 193-197.
- 2) 田子泰彦. 内水面漁業の未来は明るいかー第17回アユと藍藻. 月刊アクアネット第16巻第6号, 湊文社, 東京, 2013 ; 44-45.

## 漁場環境・水生生物に関するモニタリング調査－1 大分川、大野川および番匠川における遡上アユの孵化時期

朝井隆元

### 調査の目的

大分県には、大分川、大野川および番匠川の計3カ所にアユ保護水面が設定されている。この保護水面の管理事業として、産卵期と考えられる期間に産卵場集まるアユを保護（採捕禁止）するとともに、耕耘などによる産卵場整備によって、遡上資源増大のための自然産卵を促している。

この保護水面が設定されている3河川の他、県北地域の山国川も対象河川に加え、春先から初夏にかけて海域から河川に遡上するアユを採捕した。前年の産卵・孵化時期を推定することにより、これら禁漁期の設定等の方策の妥当性を検討した。

### 調査の方法

遡上アユの採捕場所は、海から河川に遡上した直後のものを採捕するため、大分川では河口から6.8km上流にある古国府取水堤の下とした。大野川では河口から11.1km上流にある船本床固の下とした。番匠川では河口から7.4km上流の潮止堰堤の下とした。



図1 調査河川と採捕場所

山国川では河口から3.0km上流の潮止堰堤の下とした(図1)。

調査は2014年2月12日から5月29日にかけて行った。採捕の方法は、遡上稚アユのサイズに合わせて網の目合いが26節または30節の投網を使用し、1回の調査で30尾以上の稚アユを採取するように努めた。採捕した稚アユは、魚体を測定後、99.5%エタノールで固定した。

山国川を除く3河川について、遡上の盛期に採捕されたアユから耳石を取り出した（大分川：5/12、大野川：4/2および4/15、番匠川：4/2および4/15）。耳石に形成された日周輪を顕微鏡で計数し、日周輪の数を日令とした。この日令から逆算し、遡上稚アユの孵化日を推定した。

### 調査の結果

表に遡上アユの採捕時期等を示し、図2に遡上アユの推定孵化時期を示した。

#### 1. 大分川

推定孵化日は2013年11月20日から2013年12月24日の範囲にあり、12月中旬から12月下旬に孵化のピークがみられた。

#### 2. 大野川

推定孵化日は2013年11月14日から2013年12月3日の範囲にあり、11月下旬に孵化のピークがみられた。

#### 3. 番匠川

推定孵化日は2013年11月18日から2013年12月26日の範囲にあり、11月下旬に孵化のピークがみられた。

### 今後の問題点

近年、本調査において、推定孵化日の晩期化の傾向が認められている。<sup>1)</sup>昨年度と比べると、大分川では孵化時期が遅くなっていたが、今後も本調査を

継続して、孵化時期すなわち産卵期が保護水面の禁漁期間とのずれがないかどうか、動向を注視する必要がある。

## 文献

- 1) 朝井隆元. 大分県内のアユの遡上動向と孵化時期. アクアニュース40, 大分県農林水産研究指導センター水産研究部, 2015 ; 8-9.

表 2014年に採捕された遡上アユ

河川名	採捕月日	調査時刻 (開始時)	水温 (℃)	投網の 投数	採捕尾数	平均全長 (mm)	平均体長 (mm)	平均体重 (g)
大分川	3月12日	13:58	10.3	0				
	3月20日	14:14	12.4	3	0			
	4月 2日	15:05	14.6	3	0			
	4月 8日	9:45	11.5	4	0			
	4月25日	12:20	15.3	4	7	67.0	57.2	1.6
	4月28日	11:49	15.5	3	0			
	5月12日	13:17	18.6	3	29	64.2	54.6	1.8
	5月29日	12:40	22.2	4	2	86.0	71.9	5.0
大野川	2月12日			10	0			
	2月24日			10	0			
	3月12日	12:40	9.8	10	8	72.8	62.5	2.1
	3月20日	12:40	13.5	10	23	72.1	62.0	2.2
	4月 2日	12:45	14.0	10	28	72.7	61.5	2.1
	4月15日	12:20	17.5	6	24	70.7	60.5	2.2
	4月28日	12:36	16.8	10	22	72.2	61.7	2.6
	5月12日	11:49	18.7	10	7	77.3	65.8	3.7
	5月29日	11:15	21.9	10	0			
番匠川	2月12日			10	0			
	2月24日			10	0			
	3月12日	10:12	11.5	10	0			
	3月20日	10:10	14.4	7	14	73.5	62.4	2.5
	4月 2日	9:51	15.2	9	18	78.8	66.8	3.2
	4月15日	10:05	14.0	1	110	65.2	55.4	1.6
	4月28日	15:03	16.5	10	5	65.5	55.9	1.8
	5月12日	9:30	18.0	10	1	76.7	64.8	3.1
	5月29日	9:25	20.1	10	1	80.9	67.2	3.6
山国川	3月14日	9:49	9.8	1	0			
	3月17日	9:08	9.9	1	2	79.5	69.8	3.3
	4月 3日	9:06	13.4	3	0			
	4月10日	14:16	15.8	10	3	71.2	60.9	2.3
	4月23日	10:13	15.6	10	1	72.0	60.6	2.4
	5月12日	16:49	19.3	10	0			
	5月29日	14:41	24.6	7	0			

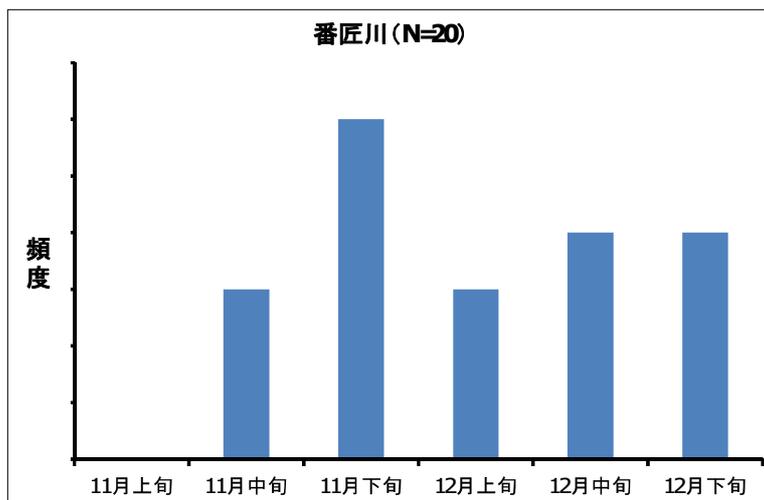
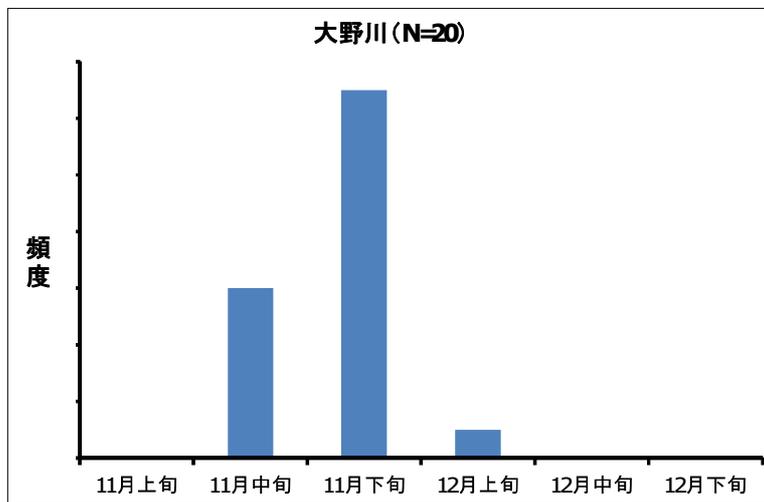
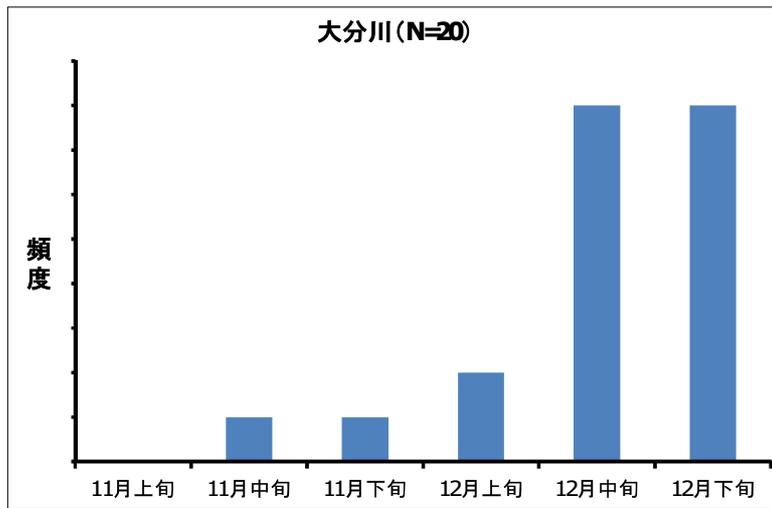


図2 耳石の日周輪から推定された遡上盛期のアユの推定孵化時期

## 漁場環境・水生生物モニタリング調査－2 県産アユの親魚養成と採卵

朝井隆元

### 事業の目的

放流用のアユ種苗の生産を全て県外に依存した場合、その種苗が県内の河川環境に適合しているかどうかという点や、地域個体群の保護をどう図るのかという問題がある。また、県外産の種苗に依存することによって、県内に未侵入の疾病が発生するリスクも高まる。

このため、本事業では、県産アユの良質卵を得ることを目的として、継代飼育しているアユの親魚養成と採卵を行った。

### 事業の方法

親魚養成用のアユは、前年度に本事業で採卵され、(社)大分県漁業公社国東事業場(以下、「漁業公社」という)で孵化されたものを用いた。大野川系継代魚(F29)が2014年3月5日、同じく大野川系継代魚(F8)は3月13日に受け入れた。

親魚の養成は、加温設備のある屋内循環水層(10t)2面を初期に使用し、河川水温が常時10℃を超えた時点で、屋外の16角形シート水槽4面(直径7m×水深1m:有効水量約23t)を使用した。なお、飼育水は、屋内・屋外ともに河川水を使用した。

飼料として、市販のアユ用配合飼料を用い、自動給餌器を使用して、1日に4～6回程度に分けて与えた。給餌量は魚体重の4%を目安としたが、実際には、河川水の濁りの影響によって、頻繁に餌止めを行った。

9月に入ってから、親魚の成熟を調べるため、生殖腺指数GSI(生殖腺重量/体重×100)を測定した。なお、前年度までは、多くの雌のGSIが20付近に達していれば採卵可能と判断していたが、昨年度は採卵後に水温が上昇して発眼率を低下させてしまったという反省点を踏まえ、水温の動向を踏まえた上で、採卵日を決定し、腹部圧迫による選別を行った上で、採卵作業を行った。卵は媒精後、基質(商品名:サラソロック)に付着させた。なお、採卵数は途中のロスを考慮して2,000粒/gとして計算した。

採卵後の受精卵は、内水面チームの屋内流水水槽で管理を行い、翌日から毎日卵消毒を行った。採卵7日後を日安に、漁業公社に発眼卵を引き渡した。なお、一部は大野川での発眼卵放流に使用した。

### 事業の結果

#### 1. 親魚養成

3月末に、シュトモス・アンギレプテリカ感染症が発生して、飼育尾数が減耗したことはあったが、その後は魚病の発生は確認されなかった。

また、飼育水として河川水を使用したため、例年と同様に6月から7月にかけては、上流部の田植えや梅雨による濁水による影響で給餌できない日が多くなった。一方で、昨年度は7月から8月にかけて、午後の水槽内の水温が30℃を超える状況が続いたが、本年度はそのようなことがなかったため、夏期は十分な量の給餌が可能となった。

このように全般的にはアユの成育は順調に推移した結果、9月29日時点で平均体重は、F29で95g、F8は59gに達した(図1)。

成熟については、両系統ともに大差なく進み、9月下旬には両系統とも採卵が可能な個体が現れた(図2)。

#### 2. 採卵

表に示したとおり採卵作業は、F8については10月7日、F28については10月7日と10月20日に実施した。合計7,518千粒の卵を得た。

### 今後の問題点

元々は、短期継代として飼育していた系統が翌年度はF9となるため、次年度以降は、天然魚との入替えの検討が必要と思われる。また、現場からは早期採卵の種苗も求められているため、当チームの施設で早期採卵が可能なのかどうかの検討も必要である。

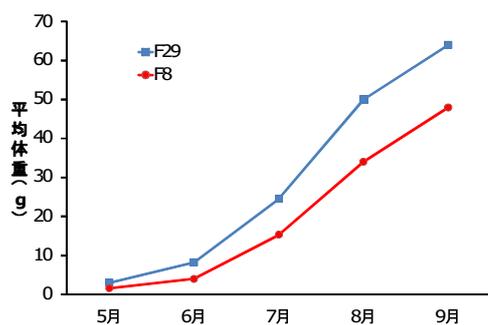


図1 平均体重の推移

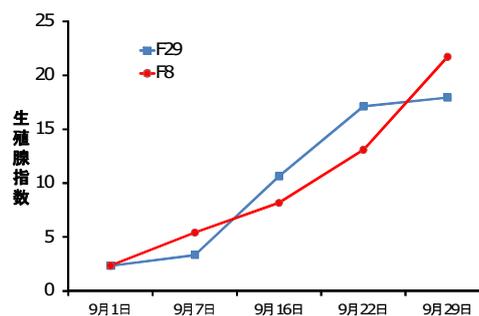


図2 生殖腺指数の推移

表 採卵数

区分	使用親魚数		採卵日	採卵数 (千粒)	♀1尾あたりの 採卵数 (千粒)	♀の体重100gあたりの 採卵数 (千粒/体重100g)
	♀	♂				
F 8	200	123	10月 7日	4,928	25	40
F 30	51	50	10月 7日	1,668	33	41
F 30	44	50	10月20日	922	21	29