

富士の介のせっそう病菌及び IHNV に対する感受性試験

小澤 諒・三浦正之・岡崎 巧

山梨県水産技術センター忍野支所（以下、当支所）ではこれまでに付加価値の高い新たな地域特産魚としてニジマス *Oncorhynchus mykiss* 雌とマスノスケ *O. tshawytscha* 偽雄を交配した全雌異質三倍体魚（以下、富士の介）を作出し、成長等の特性を調べてきた¹⁻⁸⁾。さらに、平成 29 年 11 月には実際の養殖現場における飼育特性を評価するため、県内の養殖業者 7 件に対し富士の介の発眼卵を配布した（現地実証試験）。

一方、サケ科魚類の養殖において魚病被害は多大な損失を招き、その中でも特に伝染性造血器壊死症（IHN）による被害は最も大きいものの一つとなっている⁹⁻¹¹⁾。

本試験では富士の介の抗病性に関する知見を得るため、せっそう病菌及び IHN ウイルス（IHNV）に対する感受性についてニジマス及びマスノスケと比較したのでその結果を報告する。

材料及び方法

供試魚

①せっそう病菌に対する感受性試験

当支所で 2015 年 10 月に作出し、それぞれポリプロピレン製のコンテナ槽で飼育された富士の介、全雌ニジマス 3n 及び全雌マスノスケ 3n を用いた。これらの三倍体魚の作出法については既報に準じた^{1,3)}。2016 年 12 月 1 日に各魚種の供試魚を選別した。尾数は各魚種 20 尾とし、平均魚体重は 12.0 ± 0.3 g（平均±標準偏差，以下，平均±SD）だった。

②IHNV に対する感受性試験

当支所で 2017 年 10 月に作出し、それぞれ FRP 製の餌付け水槽で飼育された富士の介、全雌ニジマス 3n 及び全雌マスノスケ 3n を用いた。これらの三倍体魚の作出法については既報に準じた^{1,3)}。2018 年 4 月 3 日に各魚種の供試魚を選別した。尾数は各魚種 30 尾とし、平均魚体重はニジマス及び富士の介が 2.8 ± 0.2 g、マスノスケが 2.8 ± 0.3 g（平均±SD）だった。

試験方法

①せっそう病菌に対する感受性試験

供試菌株として当県の民間養魚場で飼育されていた平均体重 90 g のイワナから分離した *Aeromonas salmonicida* YFTB1604 株を用いた。2016 年 12 月 5 日に供試菌株を 10^6 CFU/mL の濃度に懸濁させた井水に供試魚を 2 時間浸漬した。浸漬中はエアーストーンにより曝気し、水温はヒーターを用いて約 20 °C に調整した。なお、浸漬処理は 3 魚種同時に行った。浸漬後の供試魚はポリプロピレン製のコンテナ槽にそれぞれ移し、12 月 26 日までの 21 日間飼育した。またコンテナ槽には水温 12.5 °C の井水を 50 mL/s で掛け流し、給餌は 3 日に 1 回程度行った。死亡魚は毎日取り上げ菌分離を行った。菌分離は脾臓ないし腎臓から TS 寒天培地にて行った。その後培地に増殖したコロニーの性状からせっそう病菌による死亡を判断することとした。

②IHNV に対する感受性試験

供試ウイルスとして当県の民間養魚場で飼育されていた平均体重 20.8 g のニジマスから分離した IHNV YFTV1505 株を用いた。攻撃実験に用いるウイルス液の作製のため、EPC 細胞を 175 cm² プラスチックフラスコにて 20 °C で培養後、供試ウイルスを接種し、その後 15 °C で培養した。そして CPE が細胞全体に広がったところでフラスコごと -80 °C で凍結した。その後急速解凍したものを試験に供した。この際併せてウイルス力価を EPC 細胞を用いて TCID₅₀ 法により測定した。2018 年 4 月 6 日にウイルス攻撃を行った。攻撃は、供試魚をまず 5.4 % の塩水に 2 分間浸漬し、続いてウイルス原液を 10⁵ TCID₅₀/mL の濃度に懸濁させた井水に 15 分間浸漬する方法で行った。浸漬中はエアーストーンにより曝気し、水温は約 13 °C だった。なお、浸漬処理は 3 魚種同時に行った。浸漬後の供試魚はポリプロピレン製のコンテナ槽にそれぞれ移し、4 月 27 日までの 21 日間飼育した。またコンテナ槽には水温 12.5 °C の井水を 30 mL/s で掛け流し、給餌は 3 日に 1 回程度行った。死亡魚は毎日取り上げ個体別にウイルス分離を行った。ウイルス分離には脾臓、腎臓及び肝臓を用い、EPC 細胞に接種後 CPE の形態から IHN による死亡を判断した。

結果及び考察

①せつそう病菌に対する感受性試験

攻撃後 21 日間の死亡尾数はニジマス 10 尾、富士の介 13 尾、マスノスケ 8 尾となり、累積死亡率は各々 50 %、65 %、40 % となった（表 1、図 1）。魚種間で本菌による死亡率に差は認められなかった ($p > 0.05$, Fisher's exact test)。また、菌分離の結果全ての死亡魚からせつそう病菌が分離された。死亡魚の外観的特徴として体表の一部退色及び出血、胸鰭及び腹鰭基部の出血、眼球突出等がみられた。さらに解剖所見として筋肉の出血、肝臓の白斑及び出血斑、腸管の先端及び後端の出血がみられた。なお、攻撃後 22 日目に各魚種の生残魚全てに対し菌分離を行ったが、本菌が分離された個体はなかった。

ニジマスはせつそう病への感受性が低い魚種であり¹²⁾、養殖場において本病はほとんど問題となっていない。このため、富士の介の養殖においてもせつそう病は大きな問題にならないと考えられた。

表 1 試験結果（攻撃濃度 10⁶ CFU/mL）

魚種	体重 (g)	供試尾数	死亡尾数	累積死亡率 (%)
ニジマス	12.0 ± 0.3	20	10	50.0
富士の介	12.0 ± 0.3	20	13	65.0
マスノスケ	12.0 ± 0.3	20	8	40.0

※体重の表記は平均±SD

※魚種間の累積死亡率に有意差なし ($p > 0.05$, Fisher's exact test)

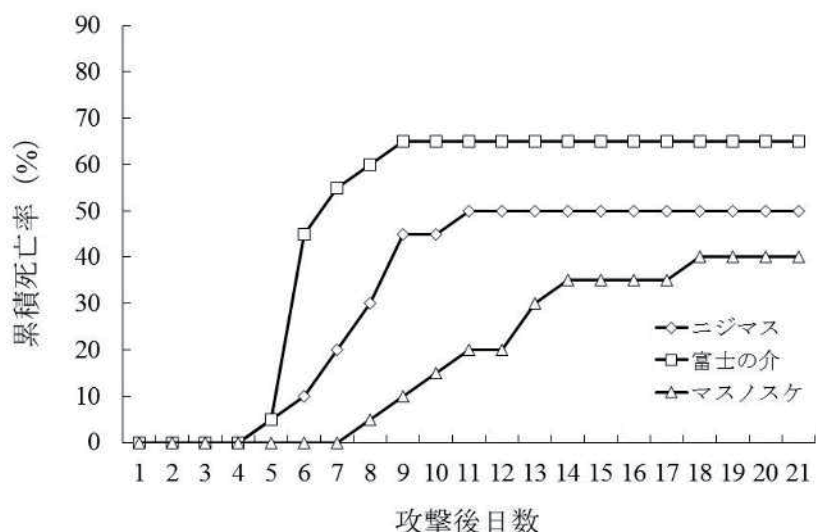


図1 攻撃後21日間の累積死亡率の推移

②IHNV に対する感受性試験

飼育期間中にニジマスが7尾死亡した一方で、富士の介及びマスノスケに死亡はみられなかった(表2, 図2)。またウイルス分離の結果、全死亡魚から IHNV 特有の CPE が確認されたため全て IHNV による死亡と判断した。ニジマスの累積死亡率は 23.3% となり、他2魚種よりも有意に高かった ($p < 0.01$, Fisher's exact test, 表2, 図2)。ニジマスの死亡は攻撃後9日目から14日目まで確認された(図2)。死亡魚の外観的特徴として IHN 特有の症状である眼球突出や体色黒化が確認された。また全ての死亡魚はこのような外観症状を発症後2日以内に死亡する傾向にあったが、攻撃後14日目以降に外観症状を呈した個体については死亡することなく飼育期間終了日まで生存した。一方、富士の介及びマスノスケに関しては外観症状を呈する個体はなかった。

ニジマス養殖場における病害の中で IHN による被害は最も大きいものの一つであるが⁹⁻¹¹⁾、少なくとも本試験に供した IHNV 株について富士の介はニジマスよりも感受性が低いことが分かった。

表2 試験結果 (攻撃濃度 10^5 TCID₅₀/mL)

魚種	体重 (g)	供試尾数	死亡尾数	累積死亡率 (%)
ニジマス	2.8 ± 0.2	30	7	23.3**
富士の介	2.8 ± 0.2	30	0	0
マスノスケ	2.8 ± 0.3	30	0	0

※体重の表記は平均±SD

※** $p < 0.01$ (Fisher's exact test)

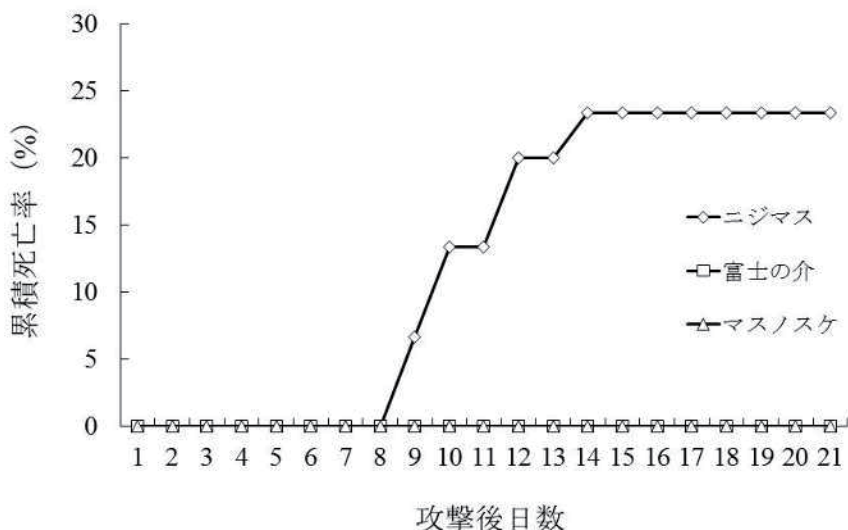


図2 攻撃後21日間の累積死亡率の推移

総合考察

富士の介の養殖を普及させる上で、その抗病性についての知見を得ることは重要である。そのため、本試験では富士の介のせつそう病菌及び IHNV に対する感受性をニジマス及びマスノスケと比較した。その結果、せつそう病に対する感受性について富士の介はニジマスと同等であることが分かった。県内のニジマス養殖場においてせつそう病の症例は極めて少ないことから、富士の介についてもせつそう病による大きな被害は出ないものと推察される。また細菌性疾病については、当支所でビブリオ病に対する感受性の比較も過去に富士の介とニジマスで行っているが²⁾、せつそう病と同様、感受性に差は認められなかった。

一方、富士の介の IHNV に対する感受性はニジマスに比べ有意に低かった。サケ科魚類の養殖場において IHN による被害は冷水病と並び最も大きいものの一つである¹³⁾。すなわち養殖業者は IHN による減耗を考慮した上で、種苗生産を行わなければならない。しかし富士の介は IHN に対しニジマスよりも抗病性に優れている可能性があるため、初期減耗が少なく計画生産を行いやすい種苗になりうる。このことは飼料ロスや労力の削減にも繋がることから、経営的にも有利性が高い魚種になることが期待される。

IHNV は 1950 年代から米国のベニザケ及びマスノスケでその存在が知られるようになり、日本では 1970 年に北海道のベニザケ及びヒメマスで初めて確認され、その後全国のニジマス及び在来マスに蔓延した^{11,14)}。一方、本試験ではマスノスケに死亡は認められなかった。同様に県内の養殖経営体においてヒメマスの IHN による死亡事例は少なくとも近年はない。現在 IHN は県内各地に蔓延し、ニジマスやヤマメ及びアマゴの養殖に多大な損害を与えているが、マスノスケやヒメマスに対する病原性が低いとすれば、これまでに県内の IHNV 株が養殖生産量の多いニジマスや一部在来マスに対し強い病毒性を示すものに変異した可能性がある¹⁴⁾。これを踏まえると本試験で富士の介に死亡が認められなかったのは IHNV の感受性についてマスノスケの性質を継承したためと考えられる。また、平成 29 年 11 月に実証試験のため県内の養殖業者 7 件に配布した富士の介についても、稚魚期において IHN による大量死の報告は上がっておらず、本試験の結果を支持する形となっている。養殖場における IHNV の病毒性や環境条件により死亡率は変動すると考えられるが^{9-10,15)}、現状少なくとも富士の介に限定した大量死亡が起こる可能性は低いだろう。しかし、全国でみればマスノスケに強い病毒性を示す IHNV が存在する可能性があるため、養殖場においては今後新たに IHNV の異なる型や株を持ち込むリスクのある種苗の導入を極力避けることが求められる。

本試験の結果から富士の介の抗病性について、せつそう病に対してはニジマスと同等である一方、本 IHNV 株に対してはニジマスよりも優れていることが示された。しかし、IHNV については株によって病毒性が異なることが知られているので、今後は異なる魚種由来の IHNV 株における感受性についても検討しなければならない。さらに富士の介の抗病性についてさらなる知見を得るため、連鎖球菌や冷水病菌といった魚病細菌に対する感受性についても併せて検討していく必要があるだろう。

要約

1. 富士の介の抗病性に関する知見を得る目的で、せつそう病菌及び IHNV に対する感受性についてニジマス及びマスノスケと比較した。
2. せつそう病菌及び IHNV の攻撃濃度は各々 10^6 CFU/mL 及び 10^5 TCID₅₀/mL とし、浸漬攻撃した。
3. せつそう病菌における累積死亡率は富士の介 65 %、ニジマス 50 %、マスノスケ 40 %となり、魚種間で死亡率に差は認められなかった。
4. IHNV における累積死亡率はニジマスが 23.3 %であったのに対し、富士の介及びマスノスケでは死亡がみられず、ニジマスのみ死亡率が有意に高かった。
5. 本試験の結果から富士の介の抗病性について、せつそう病に対してはニジマスと同等である一方で、本 IHNV 株に対してはニジマスよりも優れていることが示された。
6. 実証試験の 7 業者全てについても、稚魚期において IHN による大量死の報告は上がっておらず、本試験の結果を支持している。
7. 富士の介は IHNV に対する抗病性に優れている可能性があり、養殖する上で歩留まりが良く計画生産を行いやすい種苗になることが期待される。

文献

- 1) 高橋一孝 (2009) : サケ科魚類の新しい養殖対象種について ニジノスケ・サクラヒメ異質三倍体魚の作出. 山梨県水産技術センター事業報告書, 36, 1-5.
- 2) 加地弘一 (2010) : バイテク魚のビブリオ病原菌に対する感受性試験 (短報) . 山梨県水産技術センター事業報告書, 37, 77-78.
- 3) 高橋一孝 (2012) : マスノスケの飼育と全雌魚・性転換雄魚の作出について. 山梨県水産技術センター事業報告書, 39, 1-7.
- 4) 高橋一孝 (2012) : サケ科魚類の新しい養殖対象種について - II 異質三倍体ニジマスの成長と成熟状況について. 山梨県水産技術センター事業報告書, 39, 26-31.
- 5) 名倉盾 (2012) : ニジノスケの食味について. 山梨県水産技術センター事業報告書, 39, 32-33.
- 6) 大浜秀規 (2015) : サケ科魚類の新しい養殖対象種について - III ニジマス三倍体, ニジノスケ三倍体及びマスノスケ三倍体の成長と成熟状況について. 山梨県水産技術センター事業報告書, 42, 9-18.
- 7) 三浦正之 (2017) : サケ科魚類の新しい養殖対象種について - IV 全雌異質三倍体ニジノスケの成長及び成熟状況. 山梨県水産技術センター事業報告書, 44, 1-12.
- 8) 加地奈々・小澤諒・三浦正之・岡崎巧 (2018) : サケ科魚類の新しい養殖対象種について - V 全雌異質三倍体ニジノスケの低酸素耐性について. 山梨県水産技術センター事業報告書, 45, 1-4.
- 9) 中居裕 (1994) : 伝染性造血器壊死症 (IHN) に関する研究 - I 大型魚由来分離株のニジマスに対する病原性. 岐阜県水産試験場研究報告, 39, 37-44.
- 10) 中居裕 (1999) : 伝染性造血器壊死症 (IHN) に関する研究 - II 大型魚由来 IHNV 分離株のアマゴに対する病原性. 岐阜県水産試験場研究報告, 44, 19-23.

- 11) 本西晃（2004）：養殖サケ科魚類の伝染性造血器壊死症（IHN）防除技術開発に関する研究．博士論文．北海道大学．北海道．
- 12) 森川進（2003）：サケ科魚類のせつそう病の防除に関する研究．岐阜県淡水魚研究所研究報告, 48, 1-234.
- 13) 青島秀治（2007）：水産試験場等の診断記録からみた我が国における養殖サケ科魚類の疾病問題（1978～2002年）．魚病研究, 42(2), 119-122.
- 14) 西澤豊彦・吉水守（2017）：伝染性造血器壊死症．魚病研究, 52(1), 1-5.
- 15) 小野淳（1998）：東京都におけるマス類成魚感染型 IHN の発病事例．東京都水産試験場調査研究報告, 210, 37-43.