

ニシキゴイ交雑魚の穴あき病耐病性評価のための攻撃試験方法の検討

佐藤 将, 的山 央人

Challenge test methods for evaluation of disease resistance against ulcer disease in hybrids between Nishikigoi and Chinese red common carp (*Cyprinus carpio*)

Shoh SATO and Hisato MATOYAMA

キーワード：交雑魚，穴あき病，ニシキゴイ

ニシキゴイの「新しいタイプの穴あき病」と称される疾病の発生が1996年頃から見られ^{1,2)}、感染性の高さや従来の治療法では治りにくいことなどから、生産性の低下を招くばかりか、需要減少の一因ともなっている。生産者段階では防疫・投薬等で、ある程度対応できているが、末端の消費者では十分な対策ができないことから、病気に強い丈夫なコイの生産流通が望まれる。

これまでの研究により、中国産のコイ品種（荷包紅鯉：かほうこうり）とニシキゴイとの交雑1代目は穴あき病に強く、穴あき病原菌の非定型 *Aeromonas salmonicida* による攻撃試験を行ってもほぼ100%が生残することがわかっている³⁾。しかしながら、交雑1代目は色彩や体型に難点があるため、交雑1代目にニシキゴイをもどし交雑するなどし、優良化を図らなければならず、耐病性評価のため攻撃試験を行う必要がある⁴⁾。また、耐病性について DNA マーカーを用いた連鎖解析等を試みる場合、表現型の評価システムが必要⁵⁾で、攻撃試験での生残率が F₁で100%、もどし交雑1代目で50%となることが望ましく、このような実験系が必要である。

これまで耐病性評価での攻撃試験に使用する非定型 *A. salmonicida* の培養は、平板培地を用いていた。平板培地による培養⁶⁾では、通常行っている攻撃試験に必要な菌量を確保するため、数枚から十数枚の90mm シャーレを必要としたが、液体培地での培養⁷⁾では同程度の菌量を得るには、経験上、培地を含む菌液量が100mL 程度でよく、小規模で簡易な培養法といえる。しかしながら、耐病性評価のための攻撃試験に対して、液体培地で培

養された菌を用いた場合の条件検討はなされていなかった。

そこで本研究では、耐病性による選抜や DNA マーカー連鎖解析等の耐病性評価における攻撃試験の条件を標準化するため、より簡易な液体培地で培養した場合の攻撃試験への有効性と攻撃試験接種濃度の検討を行った。

材料と方法

1. 培養法の比較

紅白雌魚と中国コイ原種雄魚との交配による F₁ と紅白同士の交配より得た通常魚を供試魚とした。平成22年6月に作出したこれらの5月齢魚に対し、非定型 *A. salmonicida* 攻撃試験を行った。攻撃試験には、-80℃で凍結保存していた T1031 株を用いた。平板培地での培養（以下、平板区）は、5%羊脱繊維血液添加トリプトソイ寒天培地（栄研）で、20℃・48時間行った。一方の液体培地の場合（以下、液体区）は、トリプトン-ペプトン培地（Bacto Tryptone 15g, Bacto Peptone 5 g, NaCl 5 g, 蒸留水 1 L）で、20℃・48時間培養を行った。菌の接種は、平板区は10mg/L (10^{5.36}cfu/mL)、液体区は 5 mL/L (10^{5.33}cfu/mL) の濃度で、培養法ごと、供試魚の種類ごとに、2.5L の水を入れたポリエチレン袋に供試魚10尾ずつを入れ、酸素封入し、20℃で1時間の浸漬を行った。培養法ごとに、菌液に浸漬した F₁ と通常魚10尾ずつを60L ガラス水槽に収容し、上面ろ過で止水無給餌飼育を行った。ガラス水槽は、水温20℃に設定した800L 屋内 FRP 水槽に入れ、ウォーターバス方式とした。週2回

程度換水を行いながら、攻撃後16日目まで生残状況の観察を行った。

2. 接種濃度の検討

平成19年作出の F₁雌魚と紅白雄魚との交配から得たもどし交雑魚（以下、BC）と紅白同士の交配より得た通常魚を供試魚とした。平成22年6月に作出したこれらの6月齢魚に対し、非定型 *A. salmonicida* 攻撃試験を行った。攻撃試験は前述の方法により液体培地で培養した T1031 株を用い、低濃度区： $10^{-1} \times 5 \text{ mL/L}$ ($10^{3.81} \text{ cfu/mL}$)、中濃度区： $10^{0.5} \times 5 \text{ mL/L}$ ($10^{4.31} \text{ cfu/mL}$)、高濃度区： 5 mL/L ($10^{4.81} \text{ cfu/mL}$) の3種類の濃度で接種した。菌の接種は、濃度ごと、供試魚の種類ごとに行った。濃度ごとに、BC 6尾ずつを1.5Lの水を入れたポリエチレン袋に、また通常魚10尾ずつを2.5Lの水を入れたポリエチレン袋に入れ、酸素封入し、20℃で1時間の浸漬を行った。濃度ごとに、菌液に浸漬した BC 6尾ずつと通常魚10尾ずつを60L ガラス水槽に収容し、上面ろ過で止水無給餌飼育を行った。ガラス水槽は、水温20℃に設定した800L屋内FRP水槽に入れ、ウォーターバス方式とした。週2回程度換水を行いながら、攻撃後27日目まで生残状況の観察を行った。

結果

1. 培養法の比較

通常魚と F₁との比較では、培養法によらず通常魚は F₁より早くから死亡が始まり、攻撃後16日目までに全数が死亡した。通常魚と F₁の間には、両区とも生残状況に有意差があった（Fisher の正確検定：平板区 $p < 0.001$ 、液体区 $p < 0.05$ ）。培養法の比較では、液体区が平板区より通常魚、F₁とも早くから死亡した。攻撃後16日目、F₁では平板区ですべての個体が生残したのに対し、液体区では4尾の生残にとどまり、有意差があった（Fisher の正確検定： $p < 0.01$ ）（図1）。

2. 接種濃度の検討

攻撃試験後の生残状況には、いずれの濃度区でも、通常魚と BC の間に有意差はなかった（Fisher の正確検定： $p > 0.05$ ）。また通常魚では各濃度区間に有意差がなかった（Fisher の正確検定： $p > 0.05$ ）

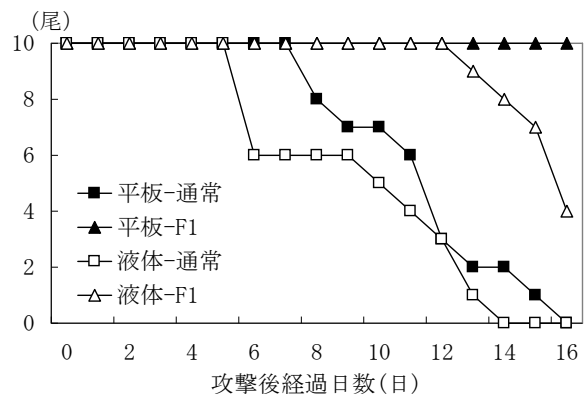


図1 非定型 *Aeromonas salmonicida* 攻撃試験での培養法ごとの生残状況

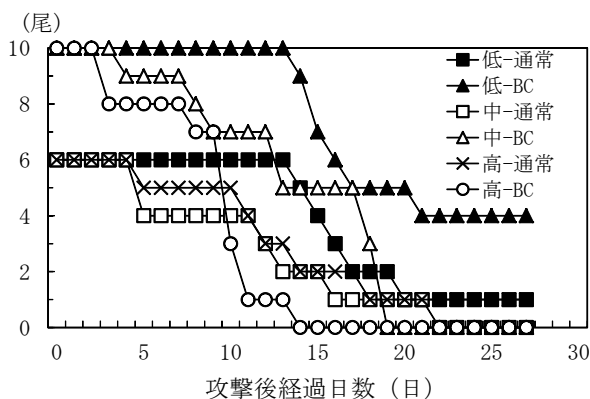


図2 非定型 *Aeromonas salmonicida* 攻撃試験における液体培地で培養した菌液の接種濃度ごとの生残状況

が、BC では低濃度区に対し、ほか2区は有意差があった（Fisher の正確検定： $p < 0.05$ ）（図2）。

考察

1. 培養法の比較

従来から用いられていた方法である平板区での生残状況は、過去の試験³⁾と同様の傾向を示し、本法が攻撃試験の手法として適当であることが改めて示された。一方の液体区での生残状況は平板区と似た傾向を示し、攻撃試験は成立したものの、死亡開始時期が早く、F₁においても死亡個体が観察されたことから、耐病性評価を行う攻撃試験としては、攻撃強度（接種濃度）が強かったことが推察された。

2. 接種濃度の検討

今回の試験では、3種類の濃度で攻撃試験を比較検討したが、接種濃度が最も低かった $10^{-1} \times 5$ mL/L ($10^{3.81}$ cfu/mL) で接種した場合では、通常魚がほぼ全数死亡、BC が約半数生残という結果となり、DNA マーカーを用いた連鎖解析等における耐病性評価に適切な攻撃強度であることが示唆された。液体培地を用いた培養法は、小規模で簡便であるため、今後の各種試験にさらに活用されることが期待される。今後は、攻撃試験の例数を増やして有効性をさらに確認するとともに、連鎖解析等では50~100個体の供試魚数を用いる⁸⁾ことから、そうした大規模な攻撃試験の際でも期待する生残率が示されるか確認する必要がある。また、近年の流行株についても同様の確認が必要と考える。

要 約

ニシキゴイ交雑魚の穴あき病耐病性評価のための攻撃試験条件の標準化を目指し、より簡易な液体培地で培養した場合の攻撃試験への有効性と攻撃試験接種濃度の検討を行った。

耐病性評価での非定型 *Aeromonas salmonicida* 攻撃試験に用いる菌は、従来、平板培地を用いて培養していたが、液体培地で培養した菌であっても、同様に攻撃試験が成立した。

液体培地で培養した T1031 株を用い、低濃度区： $10^{-1} \times 5$ mL/L ($10^{3.81}$ cfu/mL)、中濃度区： $10^{0.5} \times 5$ mL/L ($10^{4.31}$ cfu/mL)、高濃度区： 5 mL/L ($10^{4.81}$ cfu/mL) の3種類の濃度で浸漬攻撃を行い比較したところ、穴あき病の耐病性評価を行う攻撃試験としては、低濃度区が適当であると示唆された。

文 献

- 1) 新潟県内水面水産試験場. 淡水魚魚病試験. 平成8年度新潟県内水面水産試験場事業報告. 1998 ; 56.
- 2) 加来佳子, 山田義行, 若林久嗣. 最近流行している穴あき病様疾病のコイから分離された非定型 *Aeromonas salmonicida* の性状. 魚病研究. 1999 ; 34(3) : 155-162.
- 3) 新潟県内水面水産試験場. ニシキゴイ健苗育成技術の開発研究 2. ニシキゴイと荷包紅鯉の交配による新品種作出試験-II. 平成11年度新潟県内水面水産試験場事業報告. 2001 ; 27.
- 4) 新潟県内水面水産試験場. ニシキゴイ健苗育成技術の開発研究 荷包紅鯉を用いた耐病性品種の作出試験. 平成21年度新潟県内水面水産試験場事業報告. 2011 ; 23-24.
- 5) 坂本崇. 養殖魚類における耐病性形質のマーカーアシスト選抜. 水産育種. 2012 ; 41 : 135-139.
- 6) 的山央人, 星野正邦, 細谷久信. ニシキゴイの"新穴あき病"病魚から分離された非定型 *Aeromonas salmonicida* の病原性. 魚病研究. 1999 ; 34(4) : 189-193.
- 7) 唐木沢秀之, 星野正邦, 的山央人. ニシキゴイの"新穴あき病"病魚から新たに分離された非定型 *Aeromonas salmonicida* の薬剤感受性 (短報). 新潟県内水面水産試験場研究報告. 2006 ; 30 : 4-6.
- 8) Okamoto N, Sakamoto T, Ozaki A. Quantitative trait loci (QTL) responsible for resistance to a viral disease in fish. *Fish Genet. Breed. Sci.* 2002; 32(2): 75-89.