

クローンヒラメの特性評価 第1報 成長性と耐病性のクローン間比較

齊藤節雄*¹, 森 立成*², 伊藤慎悟*³, 鈴木邦夫*⁴

Evaluation of traits of clonal lines induced by chromosome manipulation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

I. Differences in growth performance and disease resistance

Setsuo SAITOH*¹, Tatsunari MORI*², Shingo ITO*³ and Kunio SUZUKI*⁴

Growth performance by rearing experiment and disease resistance to viral infection test were conducted to characterize the clonal lines in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Six different clonal lines were produced by chromosome manipulation techniques gynogenetically and used as materials. Juvenile clone fish were reared in the same tank under natural water temperature or 14 °C constant water temperature conditions for almost one year. Clear differences of growth performance were observed among the several clonal lines from six months later to the end of the experiment. Fish in no. 82 clonal line represented significantly faster growth compared with the fish of other lines and control group both under natural water temperature condition and 14 °C constant one. Fish in no. 82 clonal line clearly resisted HIRRV virus infection and no fish died during the experimental period, but fish in no. 71 and 77 clonal lines showed as same mortality as control group. The cumulative mortality of no. 72 and 75 clonal lines represented about three times higher than that of control group. These results revealed that these clonal lines may be useful as breeding stock and immunological experimental fish.

キーワード：ヒラメ，クローン，成長性，耐病性，ラブドウイルス

はじめに

本道の魚類養殖では冬期間の低水温により成長が停滞するため、本州方面等に比べて販売までに長い年月を要するケースが多い。飼育期間が長くなるとそれだけ生産性が低くなるばかりでなく、飼育中の疾病の発生等の問題も生じる。そのため本道の自然条件下においても成長が良く、かつ病気にも強い優良品種の作出が望まれる。優良形質の遺伝的固定のためには、従来の選抜育種による方法では20世代にも亘る経代が必要であるが、染色体操作技術を基礎としたクローン魚作出法では僅か2世代で固定が可能となる¹⁾。

一般的に養殖品種に求められる特性としては、成長が良く、病気に強く、肉質が良好で、飼料効率が高いこと等が挙げられる。遺伝的に均一なクローン魚を養殖に用

いた場合は、大きさや肉質等において極めてバラツキの少ない、均質な商品を出荷出来る可能性が高い。ヒラメの成長適水温は18℃～21℃²⁾とされているが、本道日本海側の余市町を例にとると、天然水温がこの値を保つ期間は7月から10月までの4カ月間足らず³⁾と極めて短いため、より低水温下での高成長が望まれる。

ヒラメ養殖においても疾病対策は、養殖生産の効率化に不可欠である。ヒラメの感染症⁴⁾として、ウイルス性、細菌性、寄生虫性疾患等があるが、本道では冬期間の低水温のため、細菌性疾患が一度発生しても天然海域において蔓延することは希であり、寄生虫症にしても飼育環境を清浄に保つことである程度予防は可能である。また、水産用医薬品を適正に使用することで、治療することも出来る。これに対してウイルス性疾患の場合は、ウイルス保有親魚を徹底的に排除する防疫以外に対策のないこ

報文番号A438 (2009年7月2日受理)

* 1 北海道立栽培水産試験場 (Hokkaido Mariculture Fisheries Experiment Station, Funami-cho, Muroran, Hokkaido 051-0013, Japan)

* 2 北海道立中央水産試験場 (Hokkaido Central Fisheries Experiment Station, Yoichi, Hokkaido 046-8555, Japan)

* 3 北海道立稚内水産試験場 (Hokkaido Wakkanai Fisheries Experiment Station, Suehiro, Wakkanai, Hokkaido 097-0001, Japan)

* 4 北海道立水産孵化場道北支場 (Dohoku Branch, Hokkaido Fish Hatchery, Mashike, Hokkaido 077-0216, Japan)

とが多い。

そこで本研究では, 天然水温及び一定水温条件下(14℃)でのクローンヒラメの成長をクローン間で比較すると共に, 比較的低水温期に発症し, 死亡率の高いヒラメラブドウイルス病に注目し, 人為感染試験によるウイルス抵抗性のクローン間比較を行った。道立中央水産試験場において, 染色体操作法により作出されたホモ型クローン6系統を用いて, 成長性と耐病性に関する特性比較を目的に飼育試験を行い, 系統間で明瞭な違いが認められたので報告する。

材料および方法

1. 供試魚および仔稚魚の飼育

(1) クローンヒラメの作出

材料として, 森ら⁵⁾で作出したホモ型クローンヒラメ6系統(71, 72, 75, 77, 82, 83)を用いた(Fig. 1)。中央水試の4t陸上水槽で周年養成していた親魚を取り上げ, 腹部を圧迫することで卵および精子を採取した。個体毎にプラスチックシャーレに採取し, 予め親魚飼育水槽の温度(14~15℃)に調節したクールボックスに一時的に保存した後, 人工受精させた。受精卵を60Lアクリル水槽に収容し, 15℃の調温海水を通水し孵化させた。ふ化後3日目からは18℃の海水によるウォーターバス方式で水温調節しながら微給水した。

(2) 通常発生魚の確保

2000年に北海道栽培漁業振興公社羽幌事業所で採卵され, 通常の種苗生産に使用される受精卵を中央水試に輸送した。孵化及びその後の飼育はクローンヒラメと同様の条件とし, 対照魚として用いた。

(3) 仔稚魚の飼育

クローンヒラメ各系統および対照区の孵化仔魚を60Lアクリル水槽中に収容し, 18℃の調温海水でウォーターバスにより水温調節した。通常ワムシ, アルテミア, 配合飼料の餌料系列で給餌し, 飼育試験までの予備飼育を行った。

2. 混合飼育による成長性の評価

(1) 供試魚

クローン系統群4系統(71, 77, 82, 83)及び対照区からそれぞれ平均全長約13cm, 平均体重約25gの稚魚30尾ずつ取り上げ, スパゲティ型タグを装着した後, 4t及び2tFRP水槽に収容し, 飼育試験を行った。

(2) 飼育条件

4tFRP水槽では, 天然海水温下で, 2tFRP水槽は, 14℃の飼育水温下で飼育した。飼育水は, 中央水試の

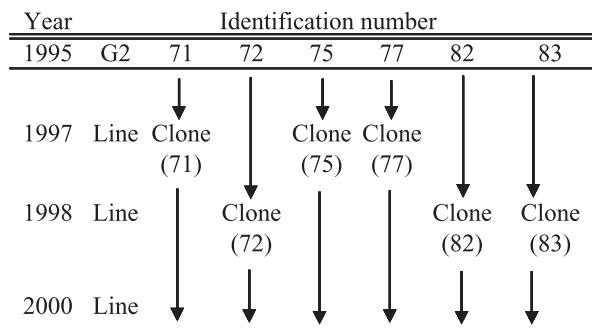


Fig.1 Schematic diagram for the production of mitotic-gynogenetic diploids(G 2) and clones(No.71~83).

前浜から揚水した海水を濾過したものを天然海水とし, ヒートポンプで18℃または8℃に調整した海水と天然海水を混合することで14℃に調温した調温海水を用い, それぞれ天然海水区及び14℃区とした。換水率は, 1~2回転/時とした。餌には市販の配合飼料を使用し, 2回/日毎日飽食量給餌した。飼育期間は, 2000年10月から2001年11月までの約1年間とした。

3. 人為感染試験による耐病性評価

(1) 供試魚

2000年に作出したクローンヒラメ5系統(71, 72, 75, 77, 82)及び通常発生魚を用いた。平均全長が約7cmに達した時点で, 人為感染試験に供した。

(2) ウイルス液

供試ウイルスとして, 北海道大学大学院水産科学研究院の吉水教授から供与されたHIRRV 8401-H株⁶⁾を用いた。ウイルス液をRTG-2細胞に接種後, 15℃で培養し, 細胞変性効果(CPE)が全面に広がった時点で培養液を採取し, 培養上清を4℃, 5,000×gで10分間遠心分離した。上清をφ0.45μmのフィルターで濾過後, バイアルチューブに分注し, 試験に供するまで-80℃で保存した。なお, 細胞の培養にはEagleのMEM₁₀を使用した。

(3) 細胞培養

RTG-2細胞の培養は, ストレプトマイシン100μg/mL, ペニシリンGカリウム100単位/mL, 牛胎児血清を10%(v/v)含み, 7.5%(W/V)重炭酸ナトリウムでpH7.2に調整後, φ0.22μmのフィルターで濾過したEagleのMEM₁₀で行った。培養温度は20℃であった。

(4) 感染試験

クローン系統及び通常発生魚に対して, 供試ウイルス液を1尾当たり50μL, すなわち10³TCID₅₀/mLのウイルスを腹腔内注射した。ウイルス接種後, 60Lアクリル水槽中に各クローン系統毎に収容し, 30日間経過観察した。換水率1~2回転/時になるように給水し, 水

温14~15℃に維持し、一日2回稚魚用市販配合飼料を飽食量給餌した。

(5) ウイルス感染価の定量

RTG-2細胞を使い、96ウェルマイクロタイタープレートを用いてTCID₅₀/mLを測定した。

4. 統計処理

成長試験における体重の差については、一元配置分散分析(ANOVA)を行った後、Tukeyの多重比較検定を行った。生残率と人為感染試験における累積死亡率については、 χ^2 検定により有意差検定を行った。

結果

1. クローンヒラメの成長性形質

(1) 成長

天然海水温区および14℃区の飼育水温の結果をFig. 2に示した。天然水温区では、飼育試験を開始した2000年10月が約18℃で、その後徐々に低下し、2001年2月には5℃まで低下した。その後春から秋まで上昇し、8月には22℃まで達した。飼育試験が終了した2001年11月には、12℃まで低下した。一方、14℃区は、試験期間中を通して、ほぼ14℃一定に保たれていた。

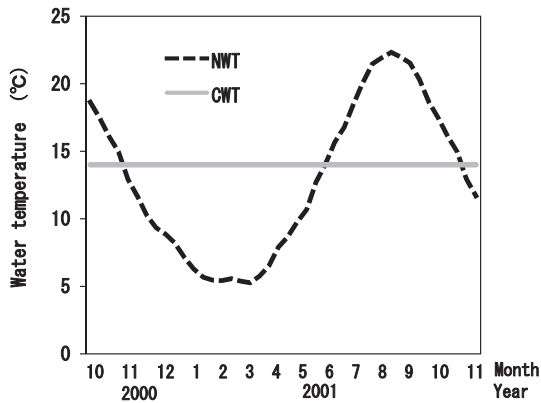


Fig.2 Changes of rearing water temperatures during experimental period.

NWT: Natural water temperature group

CWT: 14℃ constant water temperature group

天然海水温区(Fig. 3)では、飼育開始5カ月目までは冬期間の低水温のため、ほとんど成長せず、体重の差が無かった。その後徐々に差が大きくなり、水温が上昇した9カ月目から13カ月目に急成長が認められ、系統間による増重の違いがより鮮明になった。13カ月目では、82系統が最も高成長($p < 0.05$)を示し、次に77系統が続く、83系統と対照区に差が無く、71系統が最も低成長であった。

14℃飼育区(Fig. 4)では、飼育開始から終了まで、対照

区及び各系統共に直線的な成長を示していた。5カ月目から体重に差が生じ始め、9カ月目、13カ月目となるに従い、差がより大きくなった。9カ月目では、82系統が最も体重が大きく、71系統が続く、対照魚とその他の系統では差が無かった。13カ月目の体重では、82系統が有意($p < 0.05$)に高成長であった。9カ月目で2番目の成長を示した71系統は、対照区を含むその他の系統と差が無くなっていた。

(2) 生残

生残率に関しては、天然水温区(Fig. 5)では、71系統の生残率が9カ月目から13カ月目に他の系統と比較して、有意($p < 0.05$)に低い値となっていた。一方、14℃調温区(Fig. 6)では、生残率の違いが系統間でより明瞭であり、天然海水温区と同様に71系統が最も低い値であり、続いて82系統、83系統が対照区より低い結果であった。最も生残率が高かったのは、天然海水温区と同様に、77系統であった。対照区と比較して、71系統及び77系統は有意差($p < 0.05$)が認められた。

2. クローンヒラメのHIRRV耐病性形質

HIRRVの腹腔内接種攻撃法による人為感染試験の累積死亡率の結果をFig. 7に示した。累積死亡率の推移を見ると、ウイルス感染区は82系統を除き、いずれの系統も感染後3日目から死亡が始まり、10日目ではほぼ終息した。また、攻撃区における全ての死亡魚からHIRRVウイルスが検出された。

ウイルス接種30日後の累積死亡率は、対照区が28%であり、クローン系統72, 75がそれぞれ64%, 60%であり、71と77系統がそれぞれ20%, 24%とやや低く、82系統では全く死亡魚がみられず0%であり、系統間で明瞭な違いが認められた。82系統の死亡率は、72系統及び75系統よりも有意($p < 0.05$)に低く、また、対照区や71及び77系統と比較しても有意差($p < 0.05$)があった。一方、死亡率が高かった72及び75系統は、対照区や71及び77系統の死亡率と比較しても有意差($p < 0.05$)が認められた。

考察

1. 成長形質

ヒラメの成長は、水温条件に大きく左右される。ヒラメの成長最適水温は21℃付近とされ、西日本方面の養殖では約1年で全長40cm、体重約1kgまで大きくなる²⁾。本研究では、中央水試のある北海道余市町の天然水温と、適水温から幾分低めの14℃の恒温条件で成長を比較した。天然水温ではやはり、西日本方面に比べ月別の年平均水温が低く、ヒラメの成長促進が期待される水温15℃以上となる期間は、6月から11月までの約半年間であった。

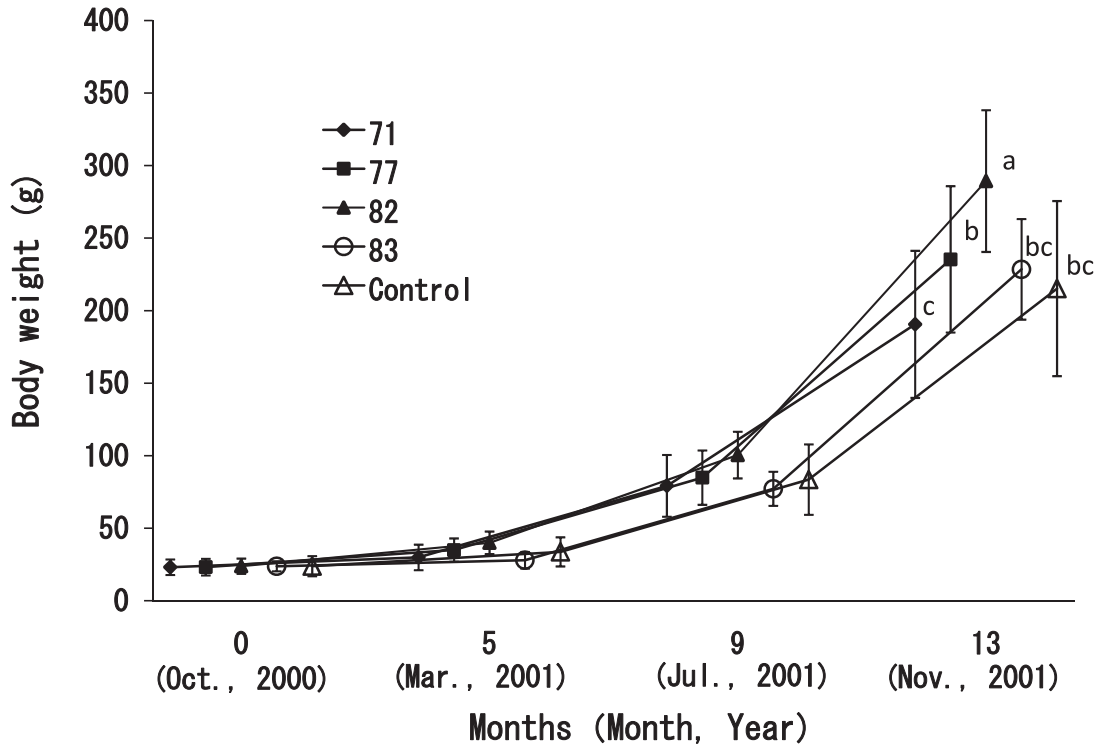


Fig.3 Growth of clone hirame under natural water temperature condition. Different letters represent groups have significant differences among groups ($p < 0.05$). Vertical bars indicate standard deviations of means ($n = 25 \sim 30$).

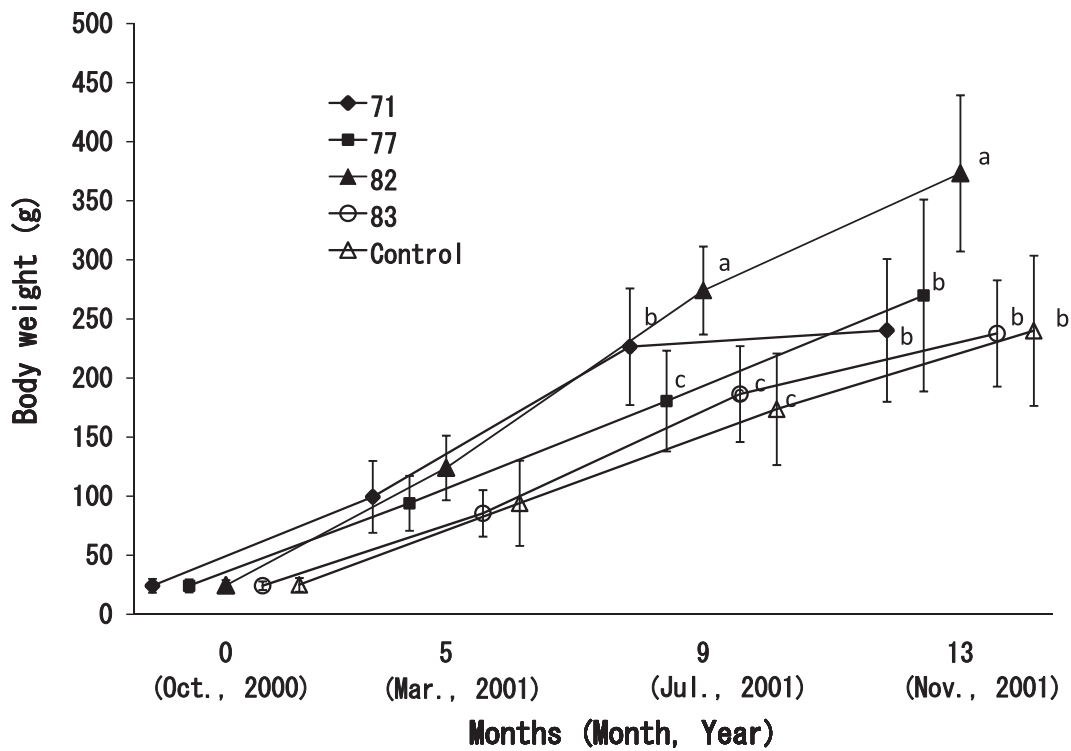


Fig.4 Growth of clone hirame under 14°C constant water temperature condition. Different letters represent groups significant differences among groups ($p < 0.05$). Vertical bars indicate standard deviations of means ($n = 25 \sim 30$).

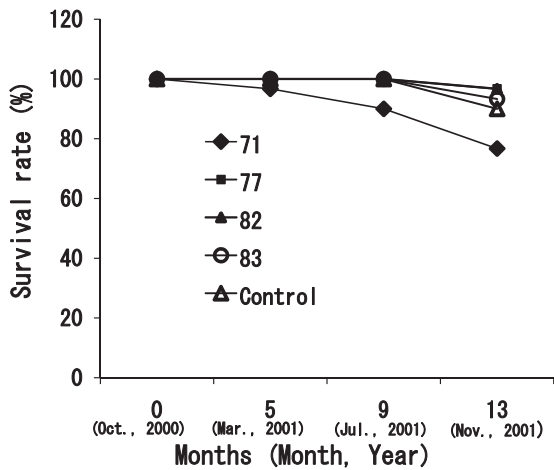


Fig.5 Survival of clone hirame reared under natural water temperature condition.

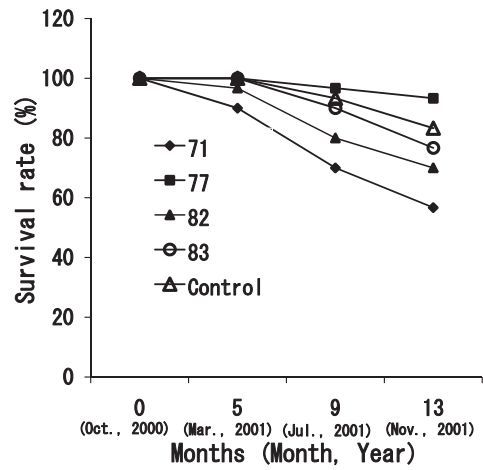


Fig.6 Survival of clone hirame reared under 14°C constant water temperature condition.

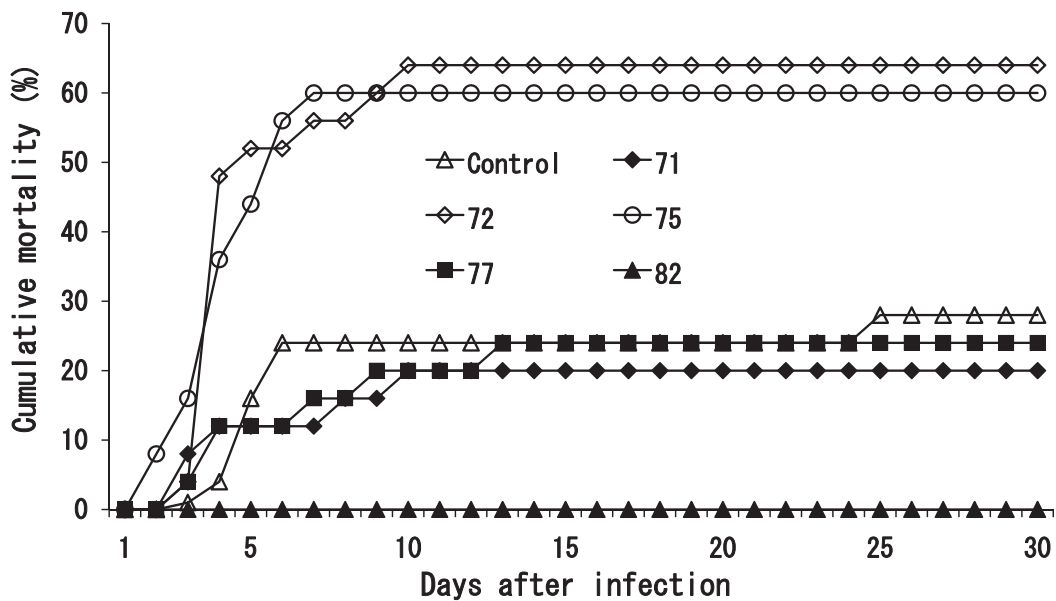


Fig.7 Cumulative mortality of clonal hirame strains infected with HIRRV by intra-peritoneal injection.

しかしヒラメは、水温25℃を超えるとほとんど摂餌しなくなり、夏場は疾病の発生等により、死亡率も高まる。本道では、夏場の高水温期にも25℃を超えることは希であり、むしろ冬場の低水温期に、いかに成長を促すかが養殖生産上の重要な課題である。

天然海水温区では、2000年10月から飼育試験を始め、翌年の3月までの冬期間はほとんど成長しなかった。その後水温が15℃を超えるまでの4カ月間で体重は約2倍

に増え、各系統ともに100gに達した。その後11月までの高水温期の4カ月間で、急激な成長が認められ、82系統では、300g近くまで増重し、最も成長が良好であった。冬期間の低水温のため、1年間の飼育においても体重1kgには達しなかったが、クローン系統間で明瞭な差が認められた。ヒラメの場合、体重500gくらいから雌雄の違いによる成長差が顕著となる⁷⁾が、本研究においては、それ以前の段階までの飼育だったので、各クローン系統の

雌雄比の違いが、群としての成長の差に反映されなかったと考えられた。従って、成長の違いは、系統による特性の違いであると判断された。

一方、生残率に関しては、71系統を除いて、特に大きな差は認められなかった。71系統の死亡魚を調べたところ、トリコジナ等の寄生虫が体表に多数認められた。恐らく寄生虫のため摂餌不振に陥り、他の魚との生存競争に敗れて死亡したものと考えられた。

14℃恒温飼育の場合は、2000年10月以降1年間の飼育において、特に成長停滞は認められず、各系統ともに体重は直線的に増加した。82系統、77系統の順に成長が良好で、他の71、83系統では、対照区とほぼ同様な成長を示していた。一方、生残率に関しては、71系統が天然水温飼育区と同様の傾向を示し、最終的に60%以下にまで低下した。この原因としては、天然海水温区の71系統と同様に、寄生虫による摂餌不振であると考えられた。最も高成長を示した82系統は、2番目に生残率が低かった。成長に関しては、対照区とほぼ同程度であった77系統が最も生残率は高かった。

このように、成長と生残とは相反する特性として保有する系統が多く、実際の養殖現場に適用する際には、複数の優れた形質を併せ持つヘテロ型クローンを用いることが推奨されている⁸⁾。しかし、71系統の様に、明らかに寄生虫に対する抵抗性が低いため、結果的に生残率の低い系統であっても、無菌的な特殊な環境下での養殖の場合には、高い成長を示す(著者未発表)可能性が考えられる。この様な特異な形質を持つクローン系統は、量的形質遺伝子座(Quantitative trait loci: QTL)解析によるDNAマーカーの開発⁹⁾には有効な研究材料になると考えられた。

2. 耐病性形質

ヒラメラブドウイルス病は1984年に兵庫県で海面の生簀内で飼育されていたヒラメに発生¹⁰⁾し、続いて北海道、香川県でも陸上で海水飼育されていたヒラメに発生した魚病である。その症状は体表や鰭、筋肉内に充血や出血がみられ、腹部が膨れ生殖腺が鬱血する。死亡率は数%から90%を超える場合もある。当時ヒラメ病魚から魚類の伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)に似たウイルスが分離され、その後、近畿、四国地方で飼育されていたクロダイ¹¹⁾、さらに韓国から輸入されたメバル¹²⁾からも同じウイルスが分離されており、感染する魚種の範囲はかなり広いと考えられている。しかし、ヒラメに関しては、現在では、水温調節による対処法により、ほとんど発症例は報告されていない¹³⁾。しかし、他魚種への感染の可能性は十分あり、近年ウイルス性疾患における混合感染事例の報告¹⁴⁾もある

ことから、防疫対策上油断のならない疾病である。

本研究により、82系統の様なHIRRVに対して高い抵抗性を示す系統の存在が明らかとなった。逆に72系統や75系統の様に、対照区よりも格段に高い感受性を示す系統も認められた。従って、これら抵抗性系統、感受性系統を実験材料とすることで、QTL解析研究の実験動物としての利用が考えられる。ヒラメのウイルス性疾患では他にリンホシスチス病があり、既にクローン魚を用いたQTL解析による抵抗性DNAマーカーの開発¹⁵⁾が行われ、マーカー選抜育種への利用が期待されている。一方、遺伝的に均質なクローン魚は、耐病性に関する免疫学的基础研究^{16~19)}においても、研究材料としての重要性が認められている。本研究で得られた82系統は、HIRRV抵抗性を示し、かつ成長性にも優れているため、育種素材としての利用価値が高いと考えられた。

要 約

1. ヒラメ養殖における育種素材としてのクローンヒラメの特性を評価するために、1998年までに作出したクローン系統6系統を用いて、成長性と耐病性に注目した飼育試験を実施した。
2. 成長に関しては、天然水温及び14℃恒温飼育区を設定し、約一年間に亘り混合飼育によるクローン間での比較を行った。天然水温下では、冬期間の成長停滞後、春から秋にかけて急成長した。82系統が最も成長が良く、77、83系統が続く、71系統は対照区よりも悪く最も低い成長であった。一方、14℃恒温区では、各系統共に直線的に成長し、他の系統に比べて82系統のみ有意に良好な成長を示した。
3. HIRRVウイルスを用いた感染実験の結果、抵抗性は、82系統で最も高く、全く死亡が認められなかった。一方、71及び77系統は、対照区とほぼ同様な死亡パターンを示し、72及び75系統は対照区よりも約3倍高い累積死亡率であり、クローン系統による明瞭な違いが認められた。

謝 辞

ヒラメの受精卵を提供して頂いた北海道栽培漁業振興公社羽幌事業所(現在:伊達事業所)の川下正己所長に感謝いたします。耐病性試験の実施に際し、HIRRVウイルス株を譲渡して下さった北海道大学大学院水産科学研究院の吉水教授に深謝いたします。

本研究の一部は、水産庁の補助事業「地域先端技術共同研究開発促進事業」により実施された。

文 献

- 1) 谷口順彦：“染色体操作の遺伝学的意義”. 水産増養殖と染色体操作(鈴木 亮編). 東京, 恒星社厚生閣, 1989, 104-117.
- 2) 村田 修：“ヒラメ”. 最新海産魚の養殖(熊井英水編). 東京, 湊文社, 2000, 109-130.
- 3) 北海道立中央水産試験場：ヒラメ陸上養殖マニュアル. 余市町, 北海道立中央水産試験場増殖部養殖科, 1992, 22p.
- 4) ㈱日本水産資源保護協会：“ヒラメの病気”. 東京, 日本水産資源保護協会魚類防疫センター, 1988, 34-36.
- 5) 森 立成, 齊藤節雄：クローンヒラメのクローン性の証明と系統判別 第1報 DNAフィンガープリント法による証明と判別. 北水試研報, 67, 81-88 (2004)
- 6) Kimura, T. Yoshimizu, M. and Gorie, S. : A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame (Japanese flounder) *Paralichthys olivaceus* and ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.*, 1, 209-217 (1986)
- 7) 田畑和男：ヒラメの染色体操作に関する研究. 兵庫水試研報. 28, 1-134 (1991)
- 8) Yamamoto, E. : Studies on sex-manipulation and production of cloned population in hirame *Paralichthys olivaceus* (Temminch et schlegel). *Aquaculture*, 173, 235-246 (1999)
- 9) 岡本信明, 尾崎照彦：“DNAマーカーを利用した新しい水産育種”. 次世代の水産バイオテクノロジー(隆島史夫編). 東京, 成山堂書店, 2000, 43-53.
- 10) 大迫典久, 吉水 守, 五利江重昭, 木村喬久：HRV (Hirame rhabdovirus: *Rhabdovirus olivaceus*) 感染ヒラメの病理組織学的検討. 魚病研究. 23(2), 117-123 (1988)
- 11) 大迫典久, 吉水 守, 木村喬久：*Rhabdovirus olivaceus* (HRV) 人工感染に及ぼす水温の影響. 魚病研究. 23(2), 125-132 (1988)
- 12) Sano, T. and Fukudo, H. : Principal microbial diseases of mariculture in Japan. *Aquaculture*, 67, 59-69(1987)
- 13) 吉水 守：“ヒラメのラプトウイルス病”. 魚介類の感染症・寄生虫病(江草周三監修, 若林久嗣・室賀清邦編). 東京, 恒星社厚生閣, 2004, 86-88.
- 14) Nishizawa, T., Kokuwa, Y., Wakayama, T., Kinoshita, S. and Yoshimizu, M. : Enhanced propagation of fish nodaviruses in BF-2 cells persistently infected with snakehead retrovirus (SnRV). *Dis. Aquat. Org.*, 79, 19-25 (2008)
- 15) Fuji, K., Kobayashi, K., Hasegawa, O., Coimbra, MRM., Sakamoto, T. and Okamoto, N. : Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 254, 203-210 (2006)
- 16) 橋本敬一郎：魚類MHC遺伝子の単離 - 実験動物としての魚類. 細胞工学. 11(8), 575-582 (1992)
- 17) 中西照幸：“免疫機構に係わる形質発現”. 水産育種に関わる形質の発現と評価(藤尾芳久・谷口順彦編). 東京, 恒星社厚生閣, 1998, 48-54.
- 18) Aoki, T., Nam, B.-H., Hirono, I. and Yamamoto, E. : Sequences of 596 cDNA clones (565, 977bp) of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) leukocytes infected with hirame rhabdovirus. *Mar. Biotechnol.*, 1, 477-488 (1999)
- 19) Nam, B.-H., Yamamoto, E., Hirono, I. and Aoki, T. : A survey of expressed genes in the leukocytes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with hirame rhabdovirus. *Dev. Comp. Immunol.*, 24, 13-24 (2000)