

# 北海道水産試験場研究報告

第 97 号

## SCIENTIFIC REPORTS OF HOKKAIDO FISHERIES RESEARCH INSTITUTES No.97

北海道立総合研究機構水産研究本部

北海道余市町

2020年3月

Hokkaido Research Organization  
Fisheries Research Department

Yoichi, Hokkaido, Japan

March, 2020

北海道立総合研究機構水産研究本部は次の機関をもって構成されており、北海道水産試験場研究報告は、これらの機関における研究業績を登載したものです。

Fisheries Research Department of the Hokkaido Research Organization will now comprise the following seven local Fisheries Research Institutes. The study achievements of these institutes will be published in the “Scientific reports of Hokkaido Fisheries Research Institutes”.

**地方独立行政法人  
北海道立総合研究機構  
水産研究本部**

(Local Independent Administrative Agency  
Hokkaido Research Organization  
Fisheries Research Department)

|                                                                          |                                                                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 中央水産試験場<br>(Central Fisheries Research Institute)                        | 046-8555<br>余市郡余市町浜中町238<br>(Hamanaka-cho, Yoichi, Hokkaido 046-8555, Japan)                      |
| 函館水産試験場<br>(Hakodate Fisheries Research Institute)                       | 040-0051<br>函館市弁天町20-5<br>函館市国際水産・海洋総合研究センター内<br>(Benten-cho, Hakodate, Hokkaido 040-0051, Japan) |
| 釧路水産試験場<br>(Kushiro Fisheries Research Institute)                        | 085-0027<br>釧路市仲浜町4-25<br>(Nakahama-cho, Kushiro, Hokkaido 085-0027, Japan)                       |
| 網走水産試験場<br>(Abashiri Fisheries Research Institute)                       | 099-3119<br>網走市鱒浦1-1-1<br>(Masuura, Abashiri, Hokkaido 099-3119, Japan)                           |
| 稚内水産試験場<br>(Wakkanai Fisheries Research Institute)                       | 097-0001<br>稚内市末広4-5-15<br>(Suehiro, Wakkanai, Hokkaido 097-0001, Japan)                          |
| 栽培水産試験場<br>(Mariculture Fisheries Research Institute)                    | 051-0013<br>室蘭市舟見町1-156-3<br>(Funami-cho, Muroran, Hokkaido 051-0013, Japan)                      |
| さけます・内水面水産試験場<br>(Salmon and Freshwater Fisheries<br>Research Institute) | 061-1433<br>恵庭市北柏木町3-373<br>(Kitakashiwagi-cho, Eniwa, Hokkaido 061-1433, Japan)                  |

# 北海道水産試験場研究報告

第97号

## 目 次

**本間隆之, 三宅博哉, 志田 修, 三原行雄, 板谷和彦**

近年の石狩湾におけるスケトウダラ *Gadus chalcogrammus* 卵分布の経年変化…………… 1

**金田友紀, 高島信一**

キツネメバル仔魚の成長と生残に与える光条件および給餌開始日の影響…………… 9

**三坂尚行, 畑山 誠, 鈴木邦夫**

サケ冷水病原菌の *gyrB* mRNA を対象とした定量RT-PCR法の開発(英文)…………… 17

**虎尾 充**

サケ稚魚の魚体中トリグリセリド含量と肝臓中グリコーゲン含量の  
栄養状態評価指標としての有効性…………… 29

**宮腰靖之, 竹内勝巳, 青山智哉, 永田光博**

人工産卵床に埋設放流したサクラマス卵の稚魚期までの生残率…………… 37

(2020年3月)

# SCIENTIFIC REPORTS OF HOKKAIDO FISHERIES RESEARCH INSTITUTES

No.97  
CONTENTS

|                                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TAKAYUKI HONMA, HIROYA MIYAKE, OSAMU SHIDA, YUKIO MIHARA and<br>KAZUHIKO ITAYA<br>Recent changes in the distribution of walleye Pollock <i>Gadus chalcogrammus</i> eggs in Ishikari Bay, Hokkaido ···                     | 1  |
| TOMONORI KANETA and SHINICHI TAKABATAKE<br>The influence of light and first feeding day on the growth and the survival rate of fox jacopever <i>Sebastes vulpes</i><br>larvae ···········                                 | 9  |
| NAOYUKI MISAHA, MAKOTO HATAKEYAMA and KUNIO SUZUKI<br>Development of quantitative RT-PCR targeting <i>gyrB</i> mRNA for <i>Flavobacterium psychrophilum</i> infecting chum<br>salmon <i>Oncorhynchus keta</i> ··········· | 17 |
| MITSURU TORAO<br>Validity of fish triglyceride content and liver glycogen content as indicators of nutritional status in chum salmon<br><i>Oncorhynchus keta</i> fry ···········                                          | 29 |
| YASUYUKI MIYAKOSHI, KATSUMI TAKEUCHI, TOMOYA AOYAMA and<br>MITSUHIRO NAGATA<br>Egg-to-fry survival of masu salmon planted in artificial spawning redds ···········                                                        | 37 |

(March, 2020)

## 近年の石狩湾におけるスケトウダラ*Gadus chalcogrammus* 卵分布の経年変化

本間隆之<sup>\*1</sup>, 三宅博哉<sup>2</sup>, 志田 修<sup>3</sup>, 三原行雄<sup>4</sup>, 板谷和彦<sup>5</sup>

<sup>1</sup>北海道立総合研究機構釧路水産試験場, <sup>2</sup>北海道立総合研究機構水産研究本部,

<sup>3</sup>北海道立総合研究機構稚内水産試験場, <sup>4</sup>北海道立総合研究機構栽培水産試験場,

<sup>5</sup>北海道立総合研究機構中央水産試験場

Recent changes in the distribution of walleye pollock *Gadus chalcogrammus* eggs in Ishikari Bay, Hokkaido

TAKAYUKI HONMA<sup>\*1</sup>, HIROYA MIYAKE<sup>2</sup>, OSAMU SHIDA<sup>3</sup>, YUKIO MIHARA<sup>4</sup> and KAZUHIKO ITAYA<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Kushiro Fisheries Institute, Hokkaido Research Organization, Kushiro, Hokkaido 085-0027,

<sup>2</sup> Fisheries Research Department, Hokkaido Research Organization, Yoichi, Hokkaido 046-8555,

<sup>3</sup> Wakkanai Fisheries Institute, Hokkaido Research Organization, Wakkanai, Hokkaido 097-0001,

<sup>4</sup> Mariculture Fisheries Institute, Hokkaido Research Organization, Muroran, Hokkaido 051-0013,

<sup>5</sup> Central Fisheries Institute, Hokkaido Research Organization, Yoichi, Hokkaido 046-8555, Japan

To explore the possibility of detecting walleye pollock *Gadus chalcogrammus* strong year classes distributed in the Sea of Japan in Hokkaido, we examined the results of egg distribution surveys conducted yearly in February from 2006 to 2017 in Ishikari Bay. The density of eggs was extremely high in the years that strong year classes occurred. There were many differences in the occurrence of the dominant developmental stage among these years. However, there was no significant relationship between water temperature and the density of eggs. These results strongly indicate that the occurrence of strong year classes can be predicted using the densities of eggs in Ishikari Bay. Additionally, abundant stage 1 eggs have appeared in Ishikari Bay since 2014, suggesting that egg production has possibly increased. This study confirmed the importance of monitoring the egg distribution in Ishikari Bay.

キーワード：石狩湾, 産卵場, スケトウダラ, 日本海, 卵分布密度

スケトウダラ*Gadus chalcogrammus*は北海道における重要な漁業資源で日本海北部系群（山下ら, 2019）, 太平洋系群（境ら, 2019）, オホーツク海南部海域（石野ら, 2019）, 根室海峡海域（千村ら, 2019）の4海域・系群ごとに区分されて資源評価や管理が行われている。日本海北部系群の主要な漁場である北海道日本海では, 6月後半～9月前半を除き周年操業する沖合底びき網漁業, 11月～翌年3月に沿岸に來遊する産卵群を対象として操業する延縄や刺し網, 定置網等の沿岸漁業により漁獲されている。漁獲量は1992年に14.6万トン記録した後, 資源の減少に伴い大きく減少し, 2013年以降, 1万トンを下回る低い水準で推移している ([http:// www.fishexp.](http://www.fishexp.hro.or.jp)

[hro.or.jp](http://www.fishexp.hro.or.jp) / [exp / central/kanri/SigenHyoka/Kokai/](http://www.fishexp.hro.or.jp/exp/central/kanri/SigenHyoka/Kokai/), 2019年4月19日閲覧, 以下の引用では2018年度資源評価書とする)。

本資源の資源量や親魚量は断続的に発生・加入する著しく豊度の高い年級群（卓越年級群）主体で構成される（2018年度資源評価書）。北海道立総合研究機構が4月に実施している仔稚魚調査により推定された0歳魚の現存尾数とコホート解析による推定資源量の推移 (Fig.1) から, 2000年以降では2006, 2012, 2015, 2016年級群の加入量が他の年級群と比べて顕著に多い（2018年度資源評価書）。

本系群の加入量は親魚量に依存した変動傾向を示す

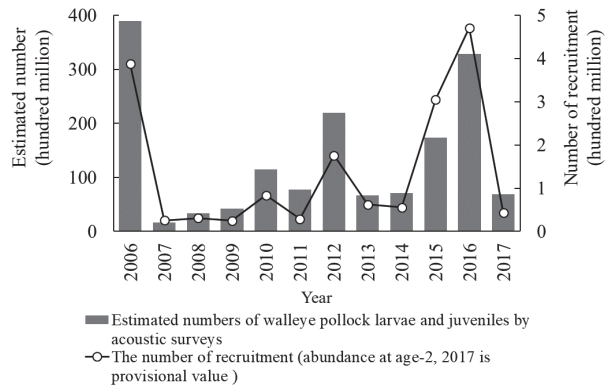


Fig.1 Recruitment (abundance at age-2 estimated by virtual population analysis) from 2006 to 2017 and estimated numbers of walleye pollock larvae and juveniles by acoustic surveys in April from 2006 to 2017

(Funamoto, 2007) が, 生活史初期の水温や, 卵・仔稚魚期における産卵場から成育場への海流による輸送の成否などの環境要因も加入量, 特に卓越年級群の発生に強く影響することが示唆されている (例えば三宅, 2012; Funamoto *et al.*, 2014)。特に卵の輸送に関しては, 近年において成育場の形成場所 (雄冬沖から利尻礼文島までの海域と武蔵堆海域) は変化していないが, 産卵場が岩内湾および檜山海域に南偏することで, 1980年代以前に比べて産卵場と成育場の距離が離れた, 即ち, 輸送距離が長くなったことが指摘されている (三宅ら, 2008)。

加えて, 三宅 (2012) は, 2007年の石狩湾における卵分布密度が低いのは檜山海域から積丹半島に至る卵の輸送経路の水温が7℃以上と高かったことにより卵の孵化率が低下したためと考え, 石狩湾におけるStage別の卵分布状況と産卵場から成育場までの輸送経路の水温分布, 流速から, 岩内湾および檜山海域で産出された卵の生残をモニターできる可能性を指摘した。これらの知見に基づいて, 北海道立総合研究機構水産試験場では, 2006年以降, 産卵盛期の2月に石狩湾および岩内湾においてネットを用いた卵採集調査を継続してきた。また, 美坂ら (2019) は, 1990年代~2000年代前半に本系群の産卵群の主分布域が産卵海域の南寄りの檜山海域にあったが, 2000年代後半以降は, 産卵群の主分布域が岩内湾海域から積丹半島沖に偏ってきた可能性を指摘しており, 卵の輸送経路や生残にも変化が生じていることが予想される。

本稿では, 2006年以降から継続実施してきた石狩湾および岩内湾における卵採集調査結果を整理し, 近年の卵採集量や発生Stageの経年変化と, その分布状況による卓越年級群の検出の可能性を検討した。

## 材料と方法

スケトウダラ卵の採集は2006~2017年2月に中央水産試験場所属試験調査船おやしお丸 (178トン, 2009年まで) と稚内水産試験場所属試験調査船北洋丸 (237トン,

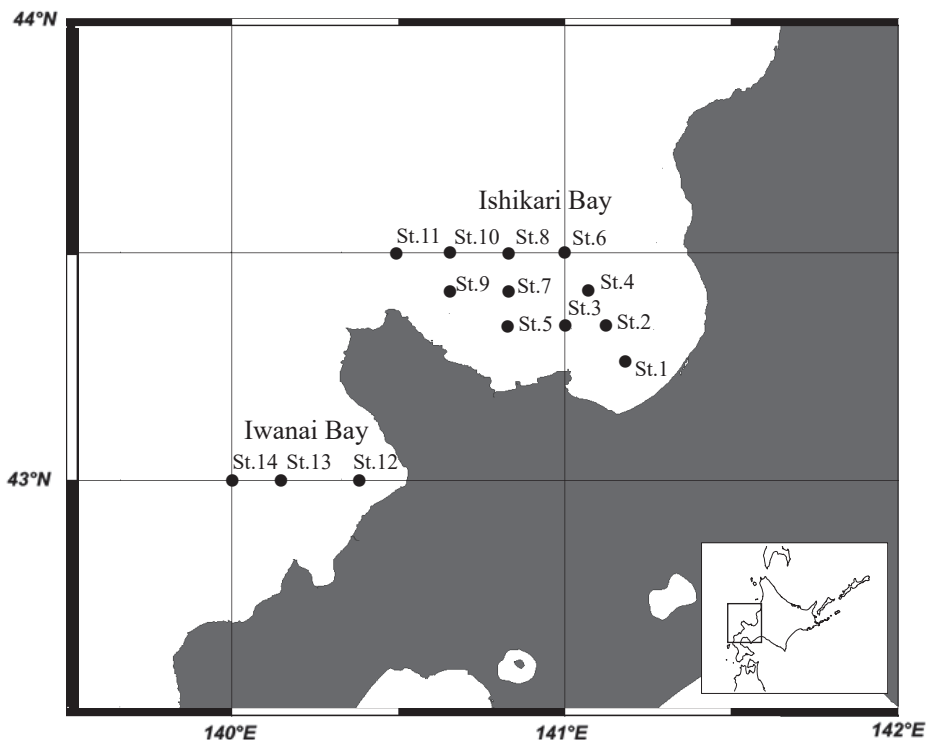


Fig.2 Map of the survey area. Symbols indicate net sampling and the Ocean observation stations.

Table 1 Summary table of the egg surveys using NORPAC and 80R nets in Ishikari Bay and Iwanai Bay

| Sampling date      | Station number                                    | Net type | Research vessel |
|--------------------|---------------------------------------------------|----------|-----------------|
| 20, 21 Feb.2006    | St. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14    | 80R      | Oyashio Maru    |
| 6, 20, 21 Feb.2007 | St. 1, 2, 4, 6, 10, 11                            | 80R      | Oyashio Maru    |
| 19 Feb.2008        | St. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 | 80R      | Oyashio Maru    |
| 24 Feb.2009        | St. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11             | 80R      | Oyashio Maru    |
| 12, 13 Feb.2010    | St. 2, 3, 5, 6, 10, 12, 13, 14                    | NORPAC   | Hokuyo Maru     |
| 17 Feb.2011        | St. 2, 3, 5, 6, 10, 12, 13, 14                    | NORPAC   | Hokuyo Maru     |
| 23 Feb.2012        | St. 2, 3, 5, 6, 10, 12, 13, 14                    | NORPAC   | Hokuyo Maru     |
| 25 Feb.2013        | St. 2, 3, 5, 6, 10, 12, 13, 14                    | NORPAC   | Hokuyo Maru     |
| 23 Feb.2014        | St. 2, 3, 5, 6, 10, 12, 13, 14                    | NORPAC   | Hokuyo Maru     |
| 20 Feb.2015        | St. 2, 3, 5, 6, 10, 12, 13, 14                    | NORPAC   | Hokuyo Maru     |
| 22 Feb.2016        | St. 2, 3, 5, 6, 10, 12, 13, 14                    | NORPAC   | Hokuyo Maru     |
| 25 Feb.2017        | St. 2, 6, 10, 12, 14                              | NORPAC   | Hokuyo Maru     |

2010年以降)を用いて実施した。調査点は、石狩湾と岩内湾において産卵群を対象とした漁業が行われている海域とその周辺に設定し (Fig. 2)、各調査点において80リングネット (口径80 cm, 目合0.33 mm, 2006~2009年), またはNORPACネット (口径45 cm, 目合0.33 mm, 2010~2018年) による鉛直曳き採集を実施した (Table 1)。スケトウダラの卵は分離浮性卵で、この海域では主に表層から150 m層まで分布することから (金丸ら, 1979)、曳網は150 m深から表面までとし、海底の深さが150 mより浅い場合は海底直上からとした。

採集した標本は船上において約5%の海水ホルマリンで固定後、実体顕微鏡下でスケトウダラ卵を同定し、卵の発生StageをNakatani and Maeda (1981および1989)に準じて、次のとおり区分した。

Stage 1: 受精から前期胞胚期

Stage 2: 後期胞胚期から原口閉鎖直前

Stage 3: 原口閉鎖から胚体卵周4分3まで

Stage 4: 胚体卵周4分の3から胚体卵周1巡まで

Stage 1の卵は受精してからほぼ1日以内と推定されるため (遊佐, 1954)、本研究では、Stage1の分布域を産卵場と見なした。

採集された卵数と採集ネットのろ水量から調査点毎の卵分布密度を計算した。ろ水量は調査ごとに実施した無網試験より算出した100 mあたりの回転数から求めたろ水計1回転あたりろ水量に、ネット開口部に装着したろ水計の回転数を乗じて求めた。なお、沿岸寄りの調査点に深度が浅い点があるため (Table 2)、深度の違いを考慮し卵分布密度を100 m<sup>3</sup>の採集個数に換算して比較検討した。卵分布密度の年比較には、石狩湾の全調査点の卵分布密度の平均値を用いた。ただし、岩内湾については荒天欠測が多く、数年を除いて採集量が僅かなため本報では定量的な検討を行わなかった。

水温観測は定期海洋観測調査 (中央水産試験場 資源

Table 2 Location of the sampling stations in Ishikari Bay and Iwanai Bay

| St | Latitude(N)                        | Longitude(E) | Depth(m) |
|----|------------------------------------|--------------|----------|
| 1  | 43°15.10'                          | 141°14.80'   | 24       |
| 2  | 43°20.10'                          | 141°09.80'   | 40       |
| 3  | 43°20.14'                          | 140°59.80'   | 51       |
|    | *2006-2009: 43°20.10'N 140°59.80'E |              |          |
| 4  | 43°25.10'                          | 141°04.80'   | 63       |
| 5  | 43°20.14'                          | 140°49.98'   | 80       |
|    | *2006-2009: 43°20.10'N 140°49.80'E |              |          |
| 6  | 43°30.10'                          | 140°59.80'   | 94       |
| 7  | 43°25.10'                          | 140°49.80'   | 348      |
| 8  | 43°30.10'                          | 140°49.80'   | 468      |
| 9  | 43°25.10'                          | 140°39.80'   | 485      |
| 10 | 43°30.10'                          | 140°39.80'   | 693      |
| 11 | 43°30.10'                          | 140°29.80'   | 700      |
| 12 | 43°30.11'                          | 140°29.81'   | 468      |
| 13 | 43°30.12'                          | 140°29.82'   | 763      |
| 14 | 43°30.13'                          | 140°29.83'   | 1,286    |

管理部 海洋環境グループ, 海洋速報 <http://www.hro.or.jp/list/fisheries/research/central/section/kankyau/sokuhou/index.html>, 2019年4月19日閲覧) の一環として実施した。観測定点のうち石狩湾および岩内湾海域とその周辺に設定された調査点を用いた。

CTDにより最大水深500 m (500 m未満は海底直上) の計測と、表面水温を表面採水により棒状温度計で計測した。

石狩湾の水温鉛直分布の検討には海洋環境 (水温や海流の状況) の経年変化を把握できるように水深約700 mと深い沖合域のSt. 10 (Table 2) の観測値を用いた。

水温水平分布図は定期海洋観測データからOcean Data Viewで作図した (Schlitzer, R., Ocean Data View, <https://odv.awi.de>, 2019.)。



Table 3 Annual catch of eggs (numbers/100 m<sup>3</sup>) of each stage

| Year                 | St                   | Stage1  | Stage2 | Stage3 | Stage4 | Total                | Year                 | St                   | Stage1 | Stage2 | Stage3 | Stage4 | Total |     |
|----------------------|----------------------|---------|--------|--------|--------|----------------------|----------------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|-------|-----|
| 2006                 | 1                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 2010                 | 2                    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |     |
|                      | 2                    | 0       | 0      | 6      | 0      | 6                    |                      | 3                    | 0      | 0      | 8      | 8      | 17    |     |
|                      | 3                    | 4       | 0      | 15     | 312    | 332                  |                      | 5                    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |     |
|                      | 4                    | 0       | 0      | 0      | 57     | 57                   |                      | 6                    | 0      | 11     | 17     | 17     | 44    |     |
|                      | 6                    | 2       | 8      | 123    | 12     | 145                  |                      | 10                   | 6      | 3      | 0      | 0      | 9     |     |
|                      | 7                    | 0       | 20     | 691    | 113    | 824                  | Mean density ( 2-10) |                      | 1      | 3      | 5      | 5      | 14    |     |
|                      | 8                    | 3       | 26     | 3      | 32     | 64                   | Mean density (12-14) |                      | 22     | 22     | 12     | 3      | 59    |     |
|                      | 9                    | 0       | 16     | 21     | 0      | 37                   | 2                    | 58                   | 0      | 0      | 0      | 0      | 58    |     |
|                      | 10                   | 0       | 112    | 39     | 1      | 152                  | 3                    | 0                    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |     |
|                      | 11                   | 0       | 22     | 15     | 1      | 39                   | 2011                 | 5                    | 0      | 0      | 0      | 15     | 15    |     |
|                      | Mean density ( 1-11) |         | 1      | 20     | 91     | 53                   |                      | 166                  | 6      | 100    | 35     | 41     | 6     | 183 |
| Mean density (12-14) |                      | 0       | 0      | 3      | 7      | 10                   |                      | 0                    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |     |
| 2007                 | 1                    | 0       | 0      | 14     | 0      | 14                   |                      | Mean density ( 2-10) |        | 32     | 7      | 8      | 4     | 51  |
|                      | 2                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    |                      | Mean density (12-14) |        | 0      | 0      | 0      | 0     | 0   |
|                      | 3                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 2                    | 0                    | 43     | 86     | 245    | 374    |       |     |
|                      | 5                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 3                    | 0                    | 10     | 376    | 109    | 495    |       |     |
|                      | 6                    | 1       | 1      | 0      | 1      | 4                    | 5                    | 0                    | 150    | 7      | 0      | 157    |       |     |
| 10                   | 0                    | 12      | 4      | 1      | 17     | 6                    | 0                    | 200                  | 194    | 11     | 405    |        |       |     |
| Mean density ( 1-11) |                      | 0       | 4      | 4      | 1      | 6                    | 10                   | 0                    | 170    | 30     | 0      | 200    |       |     |
| Mean density (12-14) |                      | No data |        |        |        | Mean density ( 2-10) |                      | 0                    | 115    | 139    | 73     | 326    |       |     |
|                      |                      |         |        |        |        | Mean density (12-14) |                      | 0                    | 63     | 76     | 52     | 191    |       |     |
| 2008                 | 1                    | 0       | 31     | 69     | 76     | 176                  | 2                    | 0                    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |     |
|                      | 2                    | 35      | 70     | 45     | 5      | 155                  | 3                    | 0                    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |     |
|                      | 3                    | 4       | 17     | 13     | 9      | 43                   | 5                    | 0                    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |     |
|                      | 4                    | 0       | 3      | 6      | 0      | 9                    | 6                    | 0                    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |     |
|                      | 5                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 10                   | 0                    | 4      | 4      | 0      | 8      |       |     |
|                      | 6                    | 0       | 0      | 8      | 6      | 14                   | Mean density ( 2-10) |                      | 0      | 1      | 1      | 0      | 2     |     |
|                      | 7                    | 0       | 1      | 0      | 0      | 1                    | Mean density (12-14) |                      | 0      | 2      | 3      | 5      | 10    |     |
|                      | 8                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 2                    | 0                    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |     |
|                      | 9                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 3                    | 12                   | 0      | 60     | 0      | 72     |       |     |
|                      | 10                   | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 5                    | 0                    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |     |
|                      | 11                   | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 6                    | 0                    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |     |
| Mean density ( 1-11) |                      | 4       | 11     | 13     | 9      | 36                   | 10                   | 0                    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |     |
| Mean density (12-14) |                      | 2       | 0      | 1      | 0      | 3                    | Mean density ( 2-10) |                      | 2      | 0      | 12     | 0      | 14    |     |
| 2009                 | 1                    | 0       | 36     | 24     | 0      | 59                   | Mean density (12-14) |                      | 1      | 1      | 6      | 2      | 10    |     |
|                      | 2                    | 0       | 6      | 108    | 57     | 171                  | 2                    | 82                   | 0      | 27     | 0      | 110    |       |     |
|                      | 3                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 3                    | 0                    | 0      | 35     | 12     | 47     |       |     |
|                      | 4                    | 0       | 5      | 9      | 0      | 14                   | 5                    | 8                    | 23     | 132    | 8      | 171    |       |     |
|                      | 5                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 6                    | 21                   | 42     | 21     | 0      | 84     |       |     |
|                      | 6                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 10                   | 0                    | 0      | 0      | 0      | 0      |       |     |
|                      | 7                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | Mean density ( 2-10) |                      | 22     | 13     | 43     | 4      | 82    |     |
|                      | 8                    | 27      | 1      | 0      | 0      | 28                   | Mean density (12-14) |                      | 215    | 65     | 426    | 4      | 710   |     |
|                      | 9                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 2                    | 0                    | 33     | 0      | 149    | 182    |       |     |
|                      | 10                   | 9       | 0      | 0      | 0      | 9                    | 3                    | 0                    | 0      | 0      | 58     | 58     |       |     |
|                      | 11                   | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 5                    | 0                    | 0      | 0      | 7      | 7      |       |     |
| Mean density ( 1-11) |                      | 3       | 4      | 13     | 5      | 26                   | 6                    | 0                    | 10     | 0      | 68     | 78     |       |     |
| Mean density (12-14) |                      | No data |        |        |        | 10                   | 756                  | 428                  | 63     | 13     | 1,260  |        |       |     |
| 2010                 | 1                    | 0       | 36     | 24     | 0      | 59                   | Mean density ( 2-10) |                      | 151    | 94     | 13     | 59     | 317   |     |
|                      | 2                    | 0       | 6      | 108    | 57     | 171                  | Mean density (12-14) |                      | 0      | 0      | 0      | 1      | 1     |     |
|                      | 3                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 2                    | 91                   | 41     | 50     | 8      | 190    |       |     |
|                      | 4                    | 0       | 5      | 9      | 0      | 14                   | 6                    | 11                   | 4      | 0      | 4      | 18     |       |     |
|                      | 5                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 10                   | 0                    | 0      | 0      | 0      | 0      |       |     |
|                      | 6                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | Mean density ( 2-10) |                      | 34     | 15     | 17     | 4      | 69    |     |
|                      | 7                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | Mean density (12-14) |                      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |     |
|                      | 8                    | 27      | 1      | 0      | 0      | 28                   | 2                    | 0                    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |     |
|                      | 9                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 3                    | 0                    | 0      | 0      | 58     | 58     |       |     |
|                      | 10                   | 9       | 0      | 0      | 0      | 9                    | 5                    | 0                    | 0      | 0      | 7      | 7      |       |     |
|                      | 11                   | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 6                    | 0                    | 10     | 0      | 68     | 78     |       |     |
| Mean density ( 1-11) |                      | 3       | 4      | 13     | 5      | 26                   | 10                   | 756                  | 428    | 63     | 13     | 1,260  |       |     |
| Mean density (12-14) |                      | No data |        |        |        | Mean density ( 2-10) |                      | 151                  | 94     | 13     | 59     | 317    |       |     |
|                      |                      |         |        |        |        | Mean density (12-14) |                      | 0                    | 0      | 0      | 1      | 1      |       |     |
| 2011                 | 1                    | 0       | 36     | 24     | 0      | 59                   | 2                    | 91                   | 41     | 50     | 8      | 190    |       |     |
|                      | 2                    | 0       | 6      | 108    | 57     | 171                  | 6                    | 11                   | 4      | 0      | 4      | 18     |       |     |
|                      | 3                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | 10                   | 0                    | 0      | 0      | 0      | 0      |       |     |
|                      | 4                    | 0       | 5      | 9      | 0      | 14                   | Mean density ( 2-10) |                      | 34     | 15     | 17     | 4      | 69    |     |
|                      | 5                    | 0       | 0      | 0      | 0      | 0                    | Mean density (12-14) |                      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |     |



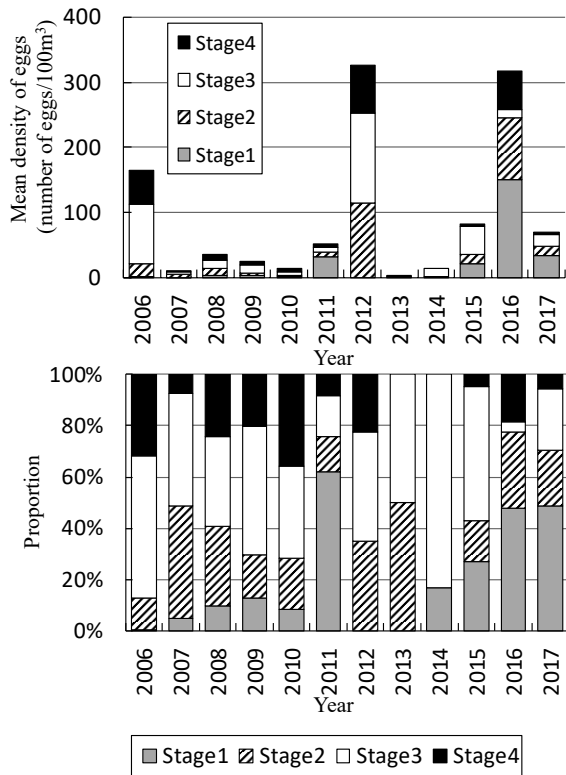


Fig.3 Mean density (numbers /100 m<sup>3</sup>) and proportion of walleye pollock eggs in Ishikari Bay from 2006 to 2017

た。2015年はStage 3の値が43個と最も高く、次いでStage 1の卵が22個であった。Stage 1の割合は、2006～2014年は、2011年を除き0～20%と低かった。2011年はStage 1が32個と全体の62%を占めていた (Fig.3下図)。2014年以降はStage 1の割合が増加し、2015年は27%、2016年および2017年はそれぞれ48%、49%であった。

調査点別に見ると、平均分布密度が高い2006、2012、2015、2016年はほとんどの調査点で卵が採集されたが、2006年はSt. 3、7で高く、次いで石狩湾の沖側のSt. 6、10となっており、石狩湾奥のSt. 1～2では低かった。2016年は沖合寄りのSt. 10で突出して高く、2012年と2015年には調査点間の偏りは2006年や2016年と比較して小さかった。これら以外の加入量が多くない年級群では、2008、2009、2017年は沿岸寄りのSt. 1～2で100個台、2011年では沖合寄りのSt. 6で100個台と高かったが、2007、2010、2013、2014年は全ての調査点で密度が100個未満の低い値であった (Fig.4, Table 3)。

発生Stage別で見ると、卓越発生年ではStage 1の値は2015年に沿岸寄りのSt. 2で82個とやや高く、2016年では沖合寄りのSt. 10で756個と高密度に分布していた。2006年と2012年は0～4個と低かった。Stage 2の値は2006、2016年では沖合寄りのSt. 10で高かったが、2012年はSt.

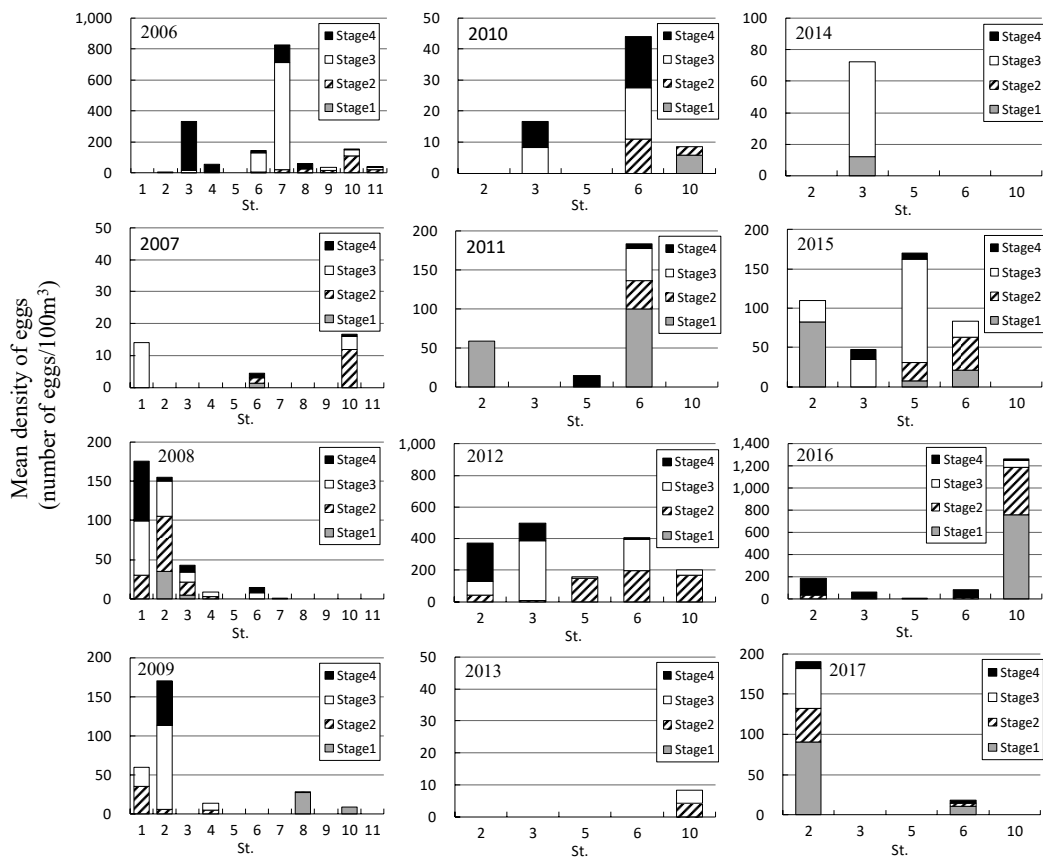


Fig.4 Mean density of walleye pollock eggs at stations in Ishikari Bay from 2006 to 2017 (numbers /100 m<sup>3</sup>)

5, 6, 10と沿岸寄りから沖合寄りにかけて高かった。Stage 3およびStage 4の値は2016年で沿岸寄りのSt. 2で2015年ではSt. 5で高かったが, 2006年ではSt. 3, 6, 7で2012年ではSt. 2, 3, 6で沿岸寄りから沖合寄りにかけて高かった。以上の通り, 卓越発生年では発生Stage別の出現状況が異なっていた。これ以外の年ではStage 1の密度は2008, 2011, 2017年以外では低く, 主にStage 2以上の卵が分布していた。Stage 2以上の卵は2008, 2009, 2014, 2017年では主にSt. 1~3の沿岸寄りに, 2007年は沿岸寄りと沖合寄りの両方に, 2010, 2011年はSt. 6, 2013年はSt. 10と沖合寄りに分布していた (Fig. 4, Table 3)。

岩内湾は湾全体の平均値で見ると, 平均分布密度が高い2012年ではStage 1の卵は採集されずStage 2~4が高かったが, 2015年はStage 1とStage 3が高く, Stage 4は低かった (Table 3)。両年とも石狩湾の同年の結果と同じであった。

水温 石狩湾のSt. 10における2月の水温鉛直分布を見ると, 卓越発生年では2006年は表面水温が5.3℃で, 水深150 mで4.9℃, 水深200 mでは4.3℃であった, 2012年は50 m以浅では2006年よりやや高く50 m以深では2006年並みであった。2015年では表面水温は6.7℃, 表面~20 mでは7℃前後と高く, それ以深では2006, 2012年と似た傾向を示した。2016年は表面水温が6.9℃と高く, 150 mでは6.5℃, 200 mで4.5℃で, この調査の中で最も高かった (Fig. 5)。これ以外の年では2007, 2010, 2011, 2017年は2016年同様, 表面水温が5.7~6.8℃と高く, 100 mで6.1~6.5℃, 200 mでも5.8~6.8℃と高かった。2008, 2013, 2014年は表面水温が4.2~4.5℃, 100 mでは3.2~4.8℃, 200 mでは1.5~3.2℃と低かった (Fig. 5)。以上の

通り, 石狩湾において卵分布密度が高い卓越発生年に共通した特徴的な水温鉛直分布の傾向は認められなかった。

産卵場と考えられている檜山海域, 岩内湾および石狩湾の表面水温分布を卓越発生年で見ると, 2006年は檜山海域および岩内湾が5℃, 石狩湾は4~5℃といずれも低い水温となっていた (Fig. 6)。2012年も3海域とも5℃と低く, また海域差がほとんどなかった。2015および2016年は檜山海域が8~9℃, 岩内湾が7℃台, 石狩湾が5~6℃と各年2006, 2012年より高かった。なお, これ以外の年では2007, 2009, 2010, 2011, 2013, 2017年は檜山海域が7~9℃, 岩内湾が6~7℃, 石狩湾が5~6℃と水温は高く, 2008年, 2014年は檜山海域が5~6℃, 岩内湾が4~6℃, 石狩湾が3~5℃と水温は低かった。

卵発生の適水温範囲が0~7℃である (中谷ら, 1993) ことから, 7℃の等温線の分布位置を見ると, 2006, 2012年は檜山海域以北に7℃以上の水温は観察されず, 2015年および2016年は積丹半島の西側に分布していた。それ以外の年では2009, 2010年は石狩湾に7℃台の水温, 2007, 2011, 2013年は岩内湾周辺海域に7℃以上の水温が観察され, 2017年は檜山海域に7℃以上の水温が観察された。2008, 2014年は檜山海域以北に7℃以上の水温は観察されなかった (Fig. 6)。

石狩湾の表面水温と卵分布密度の関係をを見ると, 卵分布密度が高かった2006年や2012年の表面水温は4~5℃と低かったが, 2015年は6℃台, 2016年は5~6℃と1℃程度高かった。一方, 2008および2014年は2006年同様に表面水温が低かったが, 卵分布密度は低かった。なお, 卓越発生年の2006, 2012, 2015, 2016年とそれ以外の年の石狩湾海域の表面水温 (Fig. 5) の平均値には有意差が認められなかった (t検定,  $P=2.23$ )。

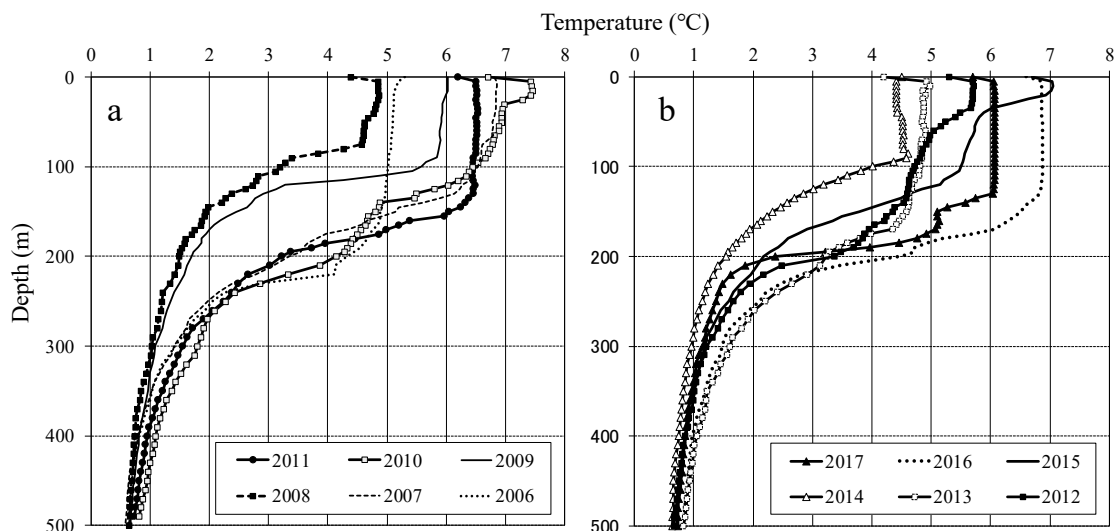


Fig. 5 Vertical distributions of water temperature at station 10 in Ishikari Bay in February in a) 2006-2011 and b) 2012-2017

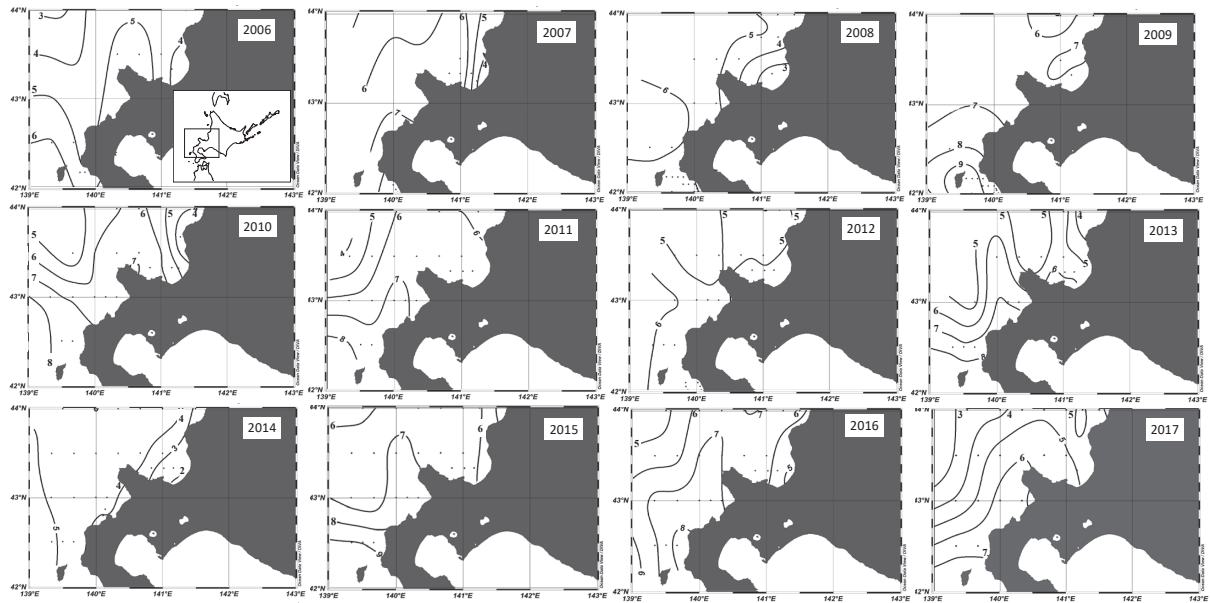


Fig. 6 Surface water temperature distributions in February from 2006 to 2017 around the western coast of Hokkaido

## 考 察

本稿では、2006年～2017年2月の石狩湾および岩内湾におけるスケトウダラ卵分布密度のモニタリング結果を取りまとめた。その結果、石狩湾に出現するスケトウダラ卵の分布密度から卓越年級群の発生を予測できる可能性が高いことがわかった。本資源は断続的に発生する卓越年級群を主体に資源が構成される傾向があり、TAC管理や将来動向の予測には未加入資源の豊度推定が必要である。これについては本稿執筆時点では仔稚魚期と1歳魚を対象とした計量魚群探知機による現存量推定値を用いているが（2018年度資源評価書）、調査船による同一時期の定点調査であるため、未成魚の主分布域を外したり、分布域が経年的に変化していったりする可能性もあるため、卵期における豊度把握につながる石狩湾の卵採集調査は、加入量の事前予測を補足するための有益な情報となり、仔稚魚幼期調査結果の解釈の深化につながる。

一方、2015年は相対的には石狩湾における卵の分布密度が高く、岩内湾でも調査期間中で最も高い卵分布密度を記録した。しかし、岩内湾では他の卓越年級群の発生年に卵分布密度が顕著に高かったわけではない。今後も石狩湾と岩内湾で卵採集調査を実施することにより卓越年級群の早期把握の確度は上がると思われるが、卵の分布する時期は、特に岩内湾海域は海況が悪く、調査ができないことが多い。今後も、調査船の限られた運航日数の中で行うには、石狩湾の調査をより優先的に進めることが効率的と考えられる。

石狩湾で卵が著しく多く出現した年級群が卓越加入する傾向があるということは、石狩湾が主たる産卵場分布

となる、あるいは積丹半島以南が主産卵場であっても石狩湾までの卵の輸送過程で生残率が高いか否かが、少なくとも2006年級群以降における卓越要因の一部となっていることが指摘できる。一方、本海域のスケトウダラの加入量は2月の北部日本海、特に石狩湾周辺海域の表面水温と強い負の相関があることが報告されている（Funamoto, 2007）が、本研究の対象期間では、卓越発生年に低水温傾向であったとはいえ、石狩湾の水温分布が近年の卓越要因となっている可能性は小さいことが分かった。

水温以外に加入量に影響を及ぼす要因として、Funamoto *et al.* (2014) は初期生活史において移送される場所や流路等をあげている。板谷ら (2009) は4月の仔稚魚調査から道西日本海において仔稚魚が多く分布するのは水深の浅い沿岸域と報告しており、移送される場所が重要であることを示唆している。本研究の結果でも、石狩湾内における各発生Stageの卵分布に年変動が観察されており、他海域から石狩湾への輸送が年によって異なることが確認できた。現在、シミュレーションによる粒子追跡実験などにより、産卵場から成育場への移送について年と産卵場別の比較と検討が行なわれており（日本海区水産研究所、未公表）、加入量との関係が明らかになっていくと期待される。また孵化後の初期生残については、石狩湾中央に流入する石狩川に由来した栄養塩が石狩湾東部の春季ブルーミングを支え、それが石狩湾産ニシン資源の再生産に影響している可能性が指摘されている（星野, 2017）。今後は卵や仔魚の輸送過程とともに孵化後の餌料環境についても詳細な検討が必要となる。

2014年以降、Stage 1の卵が石狩湾内に多く出現する

ようになったということは、石狩湾内での産卵が増えて  
いる可能性が示唆される。近年は2010, 2012年級群の加  
入で産卵親魚量に回復の兆候がみられており（2018年資  
源評価書）、さらに、産卵場自体が後志南部から積丹半島、  
石狩湾海域へと北偏している可能性が指摘されている  
（美坂ら, 2019）。今後さらに北偏傾向が継続すると、産  
卵場から成育場までの輸送距離が短くなることにより加  
入まで生残しやすい環境が続くこととなるため、卓越年  
級群が産卵親魚量の増加につながり、さらに高豊度年級  
群が発生するというように、資源回復がより顕著に進む  
可能性がある。本研究から石狩湾の卵分布状況を把握す  
る重要性が確認された。今後も石狩湾のスケトウダラの  
卵分布密度と発生Stage別のモニタリングは上記の観点  
から必要であると考えられる。本調査の継続とともに海  
洋環境や資源動向を注視していく必要がある。

## 謝 辞

本研究にあたり、標本採集、観測に携わってきた稚内  
水産試験場試験調査船北洋丸、中央水産試験場試験調  
査船おやしお丸船員各位に深く感謝する。本稿をまとめる  
にあたり、編集者および査読者には非常に有意義なアド  
バイスをいただいた。深く感謝の意を表する。

なお、本研究に用いたデータの一部は水産庁の委託事  
業「我が国周辺水域漁業資源評価調査」および補助事業  
「資源量推定等高精度化推進事業」によって得られたも  
のである。

## 引用文献

- Funamoto T. Temperature-dependent stock-recruitment model for walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) around northern Japan. *Fish. Oceanogr.* 2007; 16: 515-525.
- Funamoto T, Yamamura O, Shida O, Itaya K, Mori K, Hiyama Y, Sakurai Y. Comparison of factors affecting recruitment variability of walleye pollock *Theragra chalcogramma* in the Pacific Ocean and the Sea of Japan off northern Japan. *Fish. Sci.* 2014; 80: 117-126.
- 星野 昇. 石狩湾におけるニシン資源の変動要因. 月刊海洋 2017; 47: 357-363.
- 石野光弘, 境磨, 山下夕帆, 千村昌之, 山下紀生. 平成30年度スケトウダラオホーツク海南部の資源評価. 平成30年度我が国周辺水域の漁業資源評価 第1分冊. 水産庁増殖推進部・国立研究開発法人水産研究・教育機構, 東京. 2019; 394-418.
- 板谷和彦, 三宅博哉, 和田昭彦, 宮下和士. 北海道日本海・オホーツク海沿岸域におけるスケトウダラ仔稚魚の分布. 水産海洋研究 2009; 73: 80-89.
- 金丸信一, 北野 裕, 吉田久春. カムチャッカ半島周辺海域のスケトウダラ(*Theragra chalcogramma*)の卵・稚魚の分布について. 北海道区水産研究所研究報告 1979; 44: 1-23.
- 美坂 正, 星野 昇, 渡野邊雅道, 本間隆之, 志田 修, 三原行雄, 板谷和彦, 三宅博哉. 北海道日本海海域におけるスケトウダラ産卵群の分布変化. 北海道水産試験場研究報告 2019; 95: 55-68.
- 三宅博哉, 田中伊織. 北海道日本海のスケトウダラ資源の変動. 月刊海洋 2006; 38: 187-191.
- 三宅博哉, 板谷和彦, 浅見大樹, 嶋田 宏, 渡野邊雅道, 武藤卓志, 中谷邦敏. 卵分布からみた北海道西部日本海におけるスケトウダラ産卵場形成の現状. 水産海洋研究 2008; 72: 265-272.
- 三宅博哉. 音響学的手法を用いたスケトウダラ北部日本海系群の資源動態評価と産卵場形成に関する研究. 北海道水産試験場研究報告 2012; 81: 1-56.
- Nakatani T, Maeda T. Transport Process of the Alaska Pollack eggs in Funka Bay and the adjacent waters, Hokkaido. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish* 1981; 47: 1115-1118.
- Nakatani T, Maeda T. Distribution of copepod nauplii during the early life stage of walleye pollock in Funka Bay and vicinity, Hokkaido. *Alaska Sea Grant Report*, 89-1, Univ. Alaska, 1989; 217-240.
- 中谷敏邦, 前田辰昭. スケトウダラの初期生活史. 北海道水産試験場研究報告 1993; 42: 15-22.
- 境 磨, 山下夕帆, 石野光弘, 千村昌之, 山下紀生. 平成30年度スケトウダラ太平洋系群の資源評価. 平成30年度我が国周辺水域の漁業資源評価 第1分冊. 水産庁増殖推進部・国立研究開発法人水産研究・教育機構, 東京. 2019; 419-470.
- 千村昌之, 境 磨, 山下夕帆, 石野光弘, 山下紀生. 平成30年度スケトウダラ根室海峡の資源評価. 平成30年度我が国周辺水域の漁業資源評価 第1分冊. 水産庁増殖推進部・国立研究開発法人水産研究・教育機構, 東京. 2019; 375-393.
- 山下夕帆, 千村昌之, 境 磨, 石野光弘, 山下紀生. 平成30年度スケトウダラ日本海北部系群の資源評価. 平成30年度我が国周辺水域の漁業資源評価 第1分冊. 水産庁増殖推進部・国立研究開発法人水産研究・教育機構, 東京. 2019; 310-374.
- 遊佐多津雄. スケトウダラ *Theragra chalcogramma* (Pallas) “Alaska Pollack” の正常発生に就いて. 北海道区水産研究所研究報告 1954; 10: 1-15.



# キツネメバル仔魚の成長と生残に与える光条件および給餌開始日の影響

金田友紀\*, 高畠信一

北海道立総合研究機構栽培水産試験場

The influence of light and first feeding day on the growth and the survival rate of fox jacopever *Sebastes vulpes* larvae

TOMONORI KANETA\* and SHINICHI TAKABATAKE

Mariculture Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, Muroran, Hokkaido, 051-0013, Japan

In order to establish the efficient production of fox jacopever *Sebastes vulpes*, we investigated the influence of light and first feeding day on the growth and survival rate of fox jacopever larvae. Fox jacopever larvae were reared for 12 days under high illuminance (1,700 lx), medium illuminance (200 lx), or low illuminance (0 lx), with first feeding day being on days 0, 3, 6, 9, or 12. The total length was measured, the rotifers in the alimentary canal were counted, and the number of dead larvae was counted every 3 days. Under high and medium illuminance conditions, the length and survival rate of the day 0 first feeding groups was greater (survival rates were 86.7% and 61.1% for high and medium illuminance conditions, respectively) than the other groups (survival rates were under 1.3%). Under low illuminance all fish died by day 9, regardless of feeding regime. The larvae could not recover from being starved until 3 days after birth. Hence, illuminance greater than 200 lx and feeding immediately after birth are necessary for the production of fox jacopever.

キーワード：PNR, キツネメバル, 給餌開始日, 生残, 成長, 光条件

キツネメバル *Sebastes vulpes* は日本海沿岸、神奈川県以北の太平洋及び朝鮮半島の東岸から南部に分布するカサゴ目フサカサゴ科の魚類で、沿岸の岩礁域に生息している（佐々木, 2003）。また、大型魚は高値で取引されている水産有用種である。北海道における栽培漁業としては、日本海の漁業協同組合で種苗生産と放流が行われ、北海道立総合研究機構栽培水産試験場において、より効率的な放流種苗生産技術の開発が進められている（高畠・川崎, 2019）。

一般に仔魚の主摂餌感覚は視覚であるとされる（川村, 1991）。清野・平野（1978）はクロダイを例に、光が強いほど餌生物および飼育対象仔魚が正の走光性により集まり、仔魚の摂餌量が多くなると論じている。しかし、キツネメバルの種苗生産においては、仔魚が気泡を誤飲してしまうエアークロウ（尾形ら, 1987；高畠, 2011）を防ぐため仔魚の収容水槽は遮光されている。また、川辺ら（1996）は、シマアジ仔魚において開口後の絶食期間

が長期化すると、その後の摂餌率や生残率は低く、回復しないことを報告し、その境界日をPoint of No Returnと呼んでいる（Blaxter and Hempel, 1963；Yin and Blaxter, 1986）。このように、種苗生産における海産仔魚の初期生残には、水槽の照度と給餌開始日が大きく影響していると考えられるが、胎生魚であるキツネメバルにおいてはこれらが明らかになっていない。そこで、本研究では、効率的なキツネメバル種苗生産技術の確立を目的として、仔魚飼育における適切な光条件及び給餌開始日を明らかにした。

## 材料と方法

**飼育条件** 窓を遮光幕で覆い直射日光が入射しない飼育棟に、側面を遮光率95%の遮光幕で囲った100 Lポリカーボネート円形水槽15基を設置し、実験を行った（Fig.1）。水量は80 Lとし、水温15～16℃の濾過海水を1

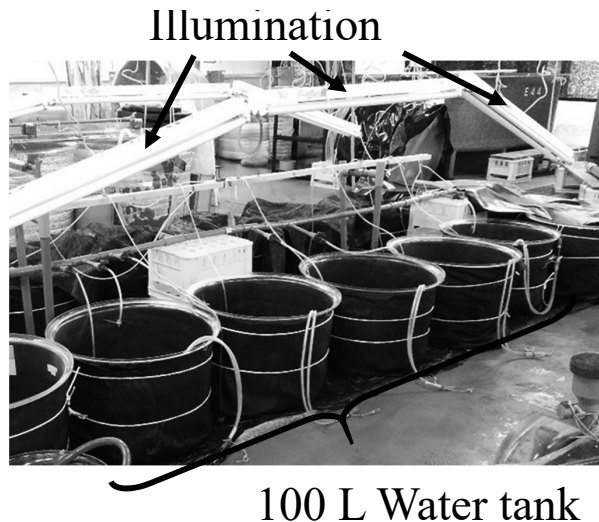


Fig. 1 Schema of experimental water tank.

L/minの流量で掛け流した。また、市販のエアーストーンによるエアレーションを施し、供給する空気量は気泡の目視で、実験に用いたすべての水槽で同程度とした。

**供試魚** キツネメバルの仔魚は2018年12月に人工授精した親魚から、2019年6月27日から28日にかけての夜間に産出されたものを飼育実験に用いた。6月28日9時に、これら仔魚を500尾ずつ、各水槽に収容した。

**飼育実験** 通常、キツネメバルの種苗生産では、水槽収容日から12日目までの仔魚期にシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* sp. complex (以下、ワムシと称する) だけを給餌し、その後、成長に合わせアルテミア *Artemia* sp., 配合飼料を給餌する。そこで、本研究の実験期間はワムシの単独給餌期間である水槽収容日から12日目までとした。なお、本研究では、産出日を0日齢とした。

各水槽の上部に蛍光灯 (National, FA42019F-RDM, 40 W蛍光管) を設置し、24時間点灯した。それぞれの水槽上面を、何も覆わない強照度区 (5基)、遮光率85~90 %の遮光幕 (日本ワイドクロス株式会社, BK1013) で覆った中照度区 (5基) および黒色のビニールシート (ユニチカ, CS-400) で覆った低照度区 (5基) の3つの実験区を設定した。各照度区の水面直上での照度を照度計 (コニカミノルタ, T-10) にて計測し、強照度区を1,700 lx (実測値 1,618 lx~1,827 lx), 中照度区を200 lx (実測値 190 lx~205 lx) 及び低照度区を0 lx (実測値 0.0 lx) に設定した。

各照度区について、給餌を実験開始日から0日目, 3日目, 6日目, 9日目および12日目に開始する水槽を設定した。給餌開始日以降は毎日9時と16時に、仔魚の成長に合わせワムシの密度を1.0個体/mLから5.0個体/mLへと

増加させて与えた。また、通常の飼育同様、ワムシの栄養強化のため、給餌前に市販の濃縮クロレラ (クロレラ工業株式会社, スーパー生クロレラ-V12) を各飼育水槽内に5 mL注入した。

**成長** 産出日から3日ごとに、9時の給餌の1時間後に各水槽からキツネメバルの仔魚10尾を無作為に取り上げ、麻酔薬 (DSファーマアニマルヘルス株式会社, FA100) にて麻酔をかけた後、万能投影機に投射して全長を計測した。また、計測日ごとに、0日目給餌開始群の各照度区、ならびに強照度区の0日目給餌開始群および3日目給餌開始群の平均全長について、3群の場合は一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合にはTukeyの方法による多重比較を、2群の場合は $t$ -testによる平均値の差の検定を行った。

**摂餌率と摂餌量** 上記の計測に用いた標本について、川辺ら (1996) にしたがって、摂餌率=ワムシを摂餌していた仔魚個体数/観察した仔魚尾数 $\times 100$ として摂餌率を求めた。ワムシの摂餌の確認は、全長計測後、直ちに10 %ホルマリン溶液にて仔魚を固定し、実体顕微鏡下で仔魚の消化管部分を体外に摘出し、さらに胃・腸壁を破って確認した。摂餌率を求める際に消化管から取り出したワムシについて、判別可能なワムシはそのまま個体数を計数し、ワムシの消化が進み原型をとどめないものについては、ワムシが取り込んだクロレラの塊 (緑色の色素で判別可能) をワムシの代替として計数し、ワムシ摂餌量を求めた。さらに、解剖の際、眼球の黒色色素の有無を目視で観察した。また、上記平均全長と同様の方法で、摂餌量についても多重比較を行った。

**生残率** 実験中の生残率は、3日ごとに各水槽の底掃除を行い、死亡魚を計数して求めた。実験終了時の生残率は、産出から12日目に、各水槽のすべての個体を取り上げ、生残していた仔魚を計数して開始時収容数500尾から求めた。ただし、計測に用いた供試個体数を開始時収容数から差し引いた。また、尤度比検定により、強照度区および中照度区における0日目給餌開始群の12日目の生残率を比較した。

## 結 果

**成長** 0日目給餌開始群における各照度区的全長計測結果をFig. 2に示す。実験開始時の全長は $5.38 \pm 0.14$  mmであった。

0日目給餌開始群の全長は、3日齢では強照度区は $5.40 \pm 0.17$  mm, 中照度区は $5.44 \pm 0.10$  mmであり、両区の間で有意差はなかったが ( $p > 0.05$ ), 低照度区は $5.10 \pm 0.12$  mmと、強照度区や中照度区よりも小さく ( $p < 0.01$ ),

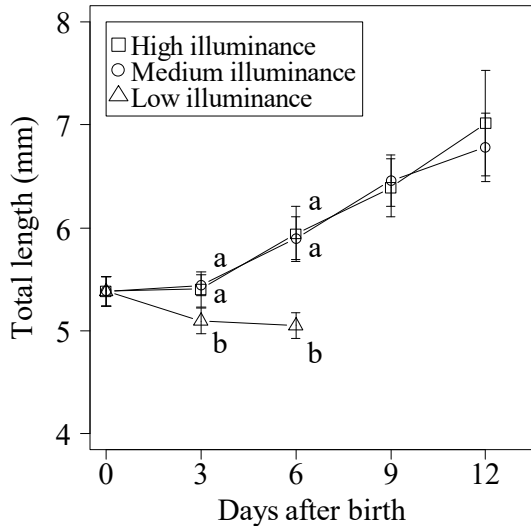


Fig. 2 Growth (mean  $\pm$  SD) of fox jacopever larvae fed from day zero after birth under low (0 lx), medium (200 lx) and high (1,700 lx) illuminance. All fish under low illuminance died before day 9. Alphabetical letters denote statistically significant differences ( $p < 0.001$ ).

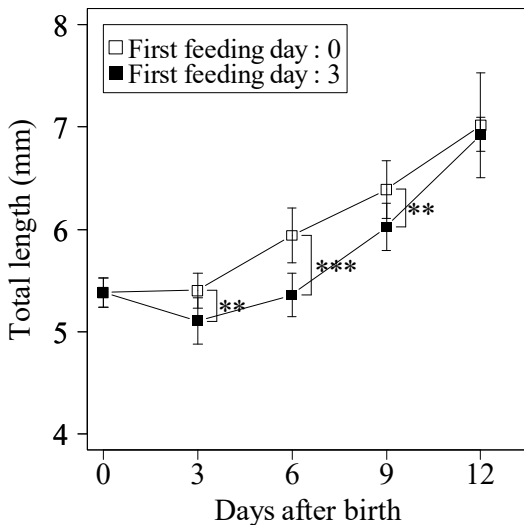


Fig. 3 The influence of first feeding day (Day 0 and Day 3) on the growth (mean  $\pm$  SD) of fox jacopever larvae under high illuminance (1,700 lx). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\* indicates  $p < 0.001$ .

成長に差がみられた。6日齢では強照度区は $5.94 \pm 0.27$  mm, 中照度区は $5.90 \pm 0.21$  mmと、両区の間で有意差はなかったが ( $p > 0.05$ ), 低照度区は $5.05 \pm 0.12$  mmと、強照度区や中照度区よりも小さく ( $p < 0.001$ ), 成長に差がみられた。低照度区では実験開始9日目にはすべて死滅した。実験終了日には強照度区は $7.02 \pm 0.51$  mm, 中照度区は $6.78 \pm 0.33$  mmと両照度区間で有意差はなく ( $p > 0.05$ ), 同様な成長を示した。

強照度区における0日目および3日目給餌開始群の全長

計測結果をFig. 3に示す。強照度区における0日目給餌開始群および3日目給餌開始群の全長は、3日齢では0日目給餌開始群が $5.40 \pm 0.17$  mmと、3日目給餌開始群の $5.10 \pm 0.23$  mmと比べ有意に大きかった ( $p < 0.01$ )。6日齢では0日目給餌開始群が $5.94 \pm 0.27$  mmと、3日目給餌開始群の $5.36 \pm 0.21$  mmと比べ有意に大きかった ( $p < 0.001$ )。9日齢では0日目給餌開始群が $6.39 \pm 0.28$  mmと、3日目給餌開始群の $6.03 \pm 0.23$  mmと比べ有意に大きく ( $p < 0.01$ ), いずれも成長に差がみられた。12日齢では0日目給餌開始群が $7.02 \pm 0.51$  mm, 3日目給餌開始群が $6.93 \pm 0.17$  mmと両群の全長に有意な差はなかった ( $p > 0.05$ )。

**摂餌率と摂餌量** 摂餌率をFig. 4に示す。強照度区 (Fig. 4a) においては、0日目給餌開始群では給餌開始日である0日齢以降、ほぼすべての個体の消化管内でワムシを確認できた。3日目給餌開始群では給餌開始日である3日齢には10尾中1尾だけだったが、6日齢以降はすべての個体でワムシを確認できた。6日目給餌開始群は給餌開始日である6日齢以降、すべて空胃であった。

中照度区 (Fig. 4b) においては、0日目給餌開始群では給餌開始日である0日齢以降、すべての個体の消化管内でワムシを確認できた。3日目給餌開始群では給餌開始日である3日齢には10尾中1尾、6日齢には10尾中7尾で、9日齢にはすべての個体でワムシを確認できたが、12日齢には生残していた6尾中5尾でワムシを確認できたが1尾は空胃であった。6日目給餌開始群は給餌開始日である6日齢以降、すべて空胃であった。

低照度区 (Fig. 4c) においては、0日目給餌開始群の3日齢に1個体のみ消化管内でワムシを確認したが、それ以外はすべて空胃だった。

消化管内でワムシを確認できた強照度区および中照度区における0日目および3日目給餌開始群について、消化管内のワムシ数の推移をFig. 5に示す。強照度区においては、0日目給餌開始群では、0日齢のワムシ数は平均19.6個、3日齢は平均40.1個、6日齢は平均79.6個、9日齢は平均102.6個、12日齢は平均98.0個であった。3日目給餌開始群では、3日齢は平均1.0個、6日齢は平均30.4個、9日齢は平均47.4個、12日齢は平均91.5個であった。

中照度区においては、0日目給餌開始群では、0日齢のワムシ数は平均9.2個、3日齢は平均57.4個、6日齢は平均75.4個、9日齢は平均98.0個、12日齢は平均73.4個であった。3日目給餌開始群では、3日齢は平均2.3個、6日齢は平均16.8個、9日齢は平均35.2個、12日齢は平均58.2個であった。

消化管内のワムシ数は、0日目給餌開始群の強照度区と中照度区の間には、0日齢および3日齢で有意な差 ( $p < 0.01 \sim 0.05$ ) があったが、0日齢では強照度区が、3



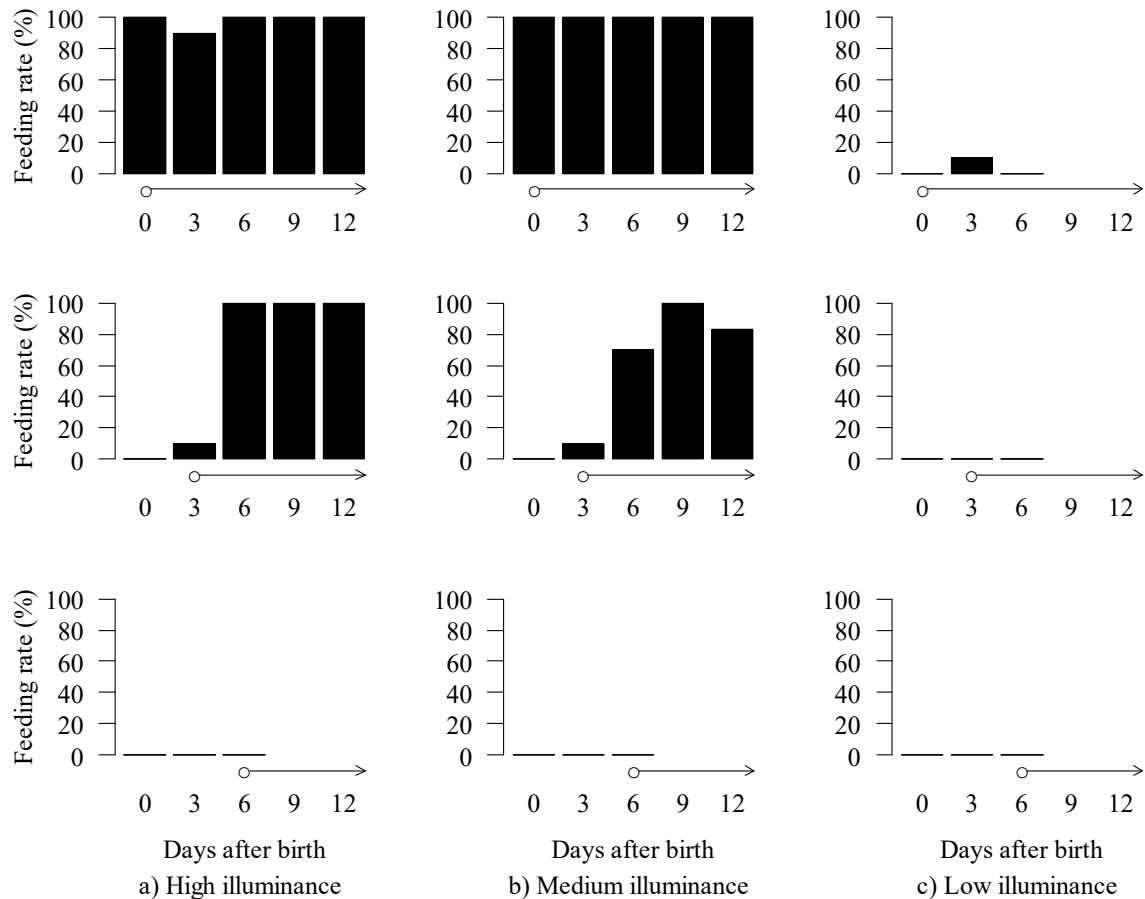


Fig. 4 Feeding rate of fox jacopever larvae on rotifer at a) high (1,700 lx), b) medium (200 lx), or c) low (0 lx) illuminance. Open circles indicate first feeding day. Arrows show the period of feeding.

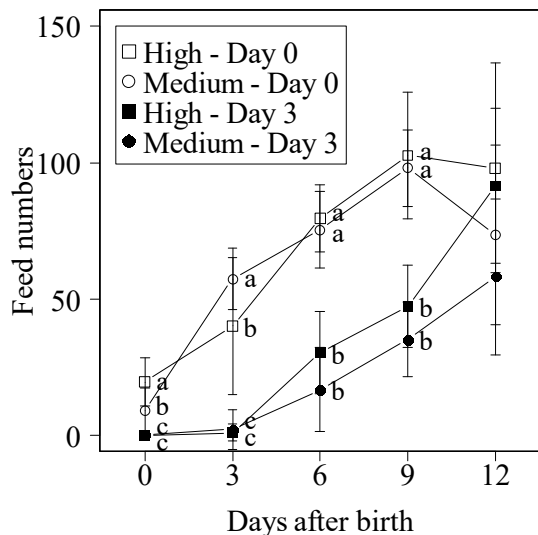


Fig. 5 The influence of light (high (1,700 lx) and medium (200 lx) illuminance) and first feeding day (Day 0 and 3 after birth) on the number of rotifers consumed by fox jacopever larvae (mean  $\pm$  SD). Different alphabetical letters denote statistically significant differences.

日齢では中照度区が大きく、明確な傾向はなかった。12日齢を除き強照度区および中照度区のいずれにおいても、0日目給餌開始群のワムシ数は3日目給餌開始群のワムシ数よりも多かった ( $p < 0.001 \sim 0.01$ )。また、3日目給餌開始群の強照度区と中照度区間に有意な差はなかった ( $p > 0.05$ )。

強照度区において、給餌開始から3日目の消化管ワムシ数は0日目給餌開始群と3日目給餌開始群との間で有意差はなかった ( $p > 0.05$ ) が、6日目の0日目給餌開始群は3日目給餌開始群よりも有意に大きかった ( $p < 0.001$ )。

中照度区において、給餌開始から3日目および6日目の消化管ワムシ数は、0日目給餌開始群が3日目給餌開始群よりも有意に大きかった ( $p < 0.001$ )。

解剖の際、眼球を目視観察したところ、すべての個体で黒色色素が確認できた (Fig. 6)。

**生残率** 実験期間中の生残率の推移をFig. 7に示す。強照度区 (Fig. 7a) では、0日目給餌開始群の生残率は9日齢まで99.2 %から96.6 %へと緩やかに低下し、12日齢には86.7 %となった。

3日目給餌開始群の生残率は3日齢には96.3 %であった

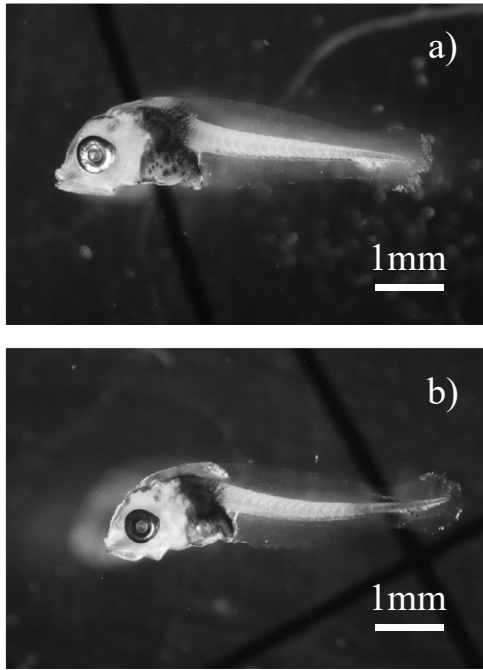


Fig.6 Photographs of fox jacopever larvae on the day of birth a) fed (high (1,700 lx) illuminance) and b) unfed (low (0 lx) illuminance). The eyes are pigmented.

が、6日齢から9日齢には87.3 %から79.4 %に減少し、12日齢には1.3 %となった。6日目以降の給餌開始群の生残率は、いずれも3日齢には95.3～99.6 %であったが、6日齢には77.3～90.4 %に減少し、9日齢には0.0 %となった。

中照度区 (Fig.7b) では、0日目給餌開始群の生残率は9日齢まで99.4 %から93.0 %まで緩やかに低下したが、12日齢には61.1 %となり、強照度区よりも低下の度合いが大きかった。3日目給餌開始群の生残率は3日齢には99.0 %であったが、6日齢から9日齢には88.8 %から76.8 %に減少し、12日齢には1.3 %となった。6日目以降の給餌開始群の生残率は、いずれも3日齢には97.6～99.0 %であったが、6日齢に85.0～89.2 %に減少し、9日齢には0.0 %となった。

低照度区 (Fig.7c) ではいずれの給餌開始群の生残率も3日齢には96.9～100.0 %と強・中照度区と同程度であったが、6日齢には80.0～89.6 %に減少し、9日齢には0.0 %となった。

尤度比検定の結果、実験最終日における0日目給餌開始群の、強照度区の生残率86.7 %は中照度区の61.1 %よりも有意に高かった ( $p < 0.001$ )。

## 考 察

0日目給餌開始群において、強照度区および中照度区の仔魚は日数の経過とともに順調に成長した。実験期間

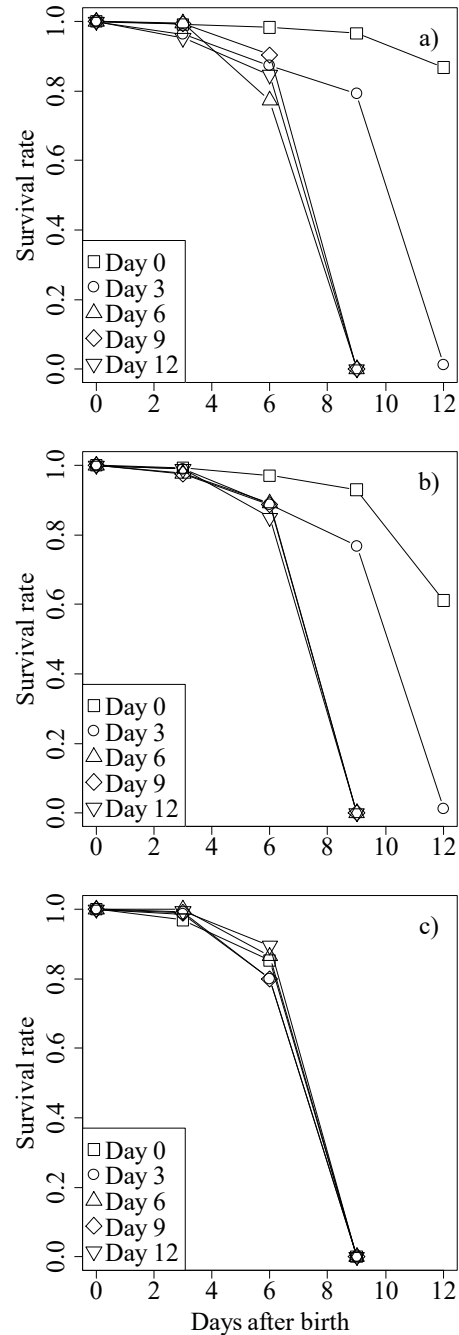


Fig.7 Survival rate of fox jacopever larvae under a) high (1,700 lx), b) medium (200 lx), or c) low (0 lx) illuminance.

中の日間成長率は強照度区で0.14 mm/day、中照度区で0.12 mm/dayであった。これは永沢 (2001) が天然から採取した仔魚の体長計測と耳石を用いた日齢解析で報告している体長9.5 mm未満の仔魚の成長式SL (標準体長) = 0.15D (日数) + 5.59の係数と近い値であり、本実験の強照度区および中照度区における成長は正常であったと考えられる。これらのことから、本実験でのワムシ給餌量はキツネメバル仔魚が健全な成長をするのに十分な量

であったといえる。

水族養殖学や魚類栄養学を専門とし、魚類の消化と栄養についてとりまとめた竹内(1991)は、消化率への影響要因として光は特に言及していない。また、スジアラ仔魚の3~4日齢において24時間明期では自然な光周期よりも消化酵素(トリプシン)の活性が高いとしているが6~7日齢ではその差はなく、暗期でもある程度の活性がみられた(與世田ら, 2003)。これらのことから、一度摂餌された餌は光のある・なしに関わらず消化、吸収されるものとする、成長の良・不良はどれだけ摂餌できるかに依存していると考えられる。0日目給餌開始群の各照度区の成長を比較すると、中照度区は強照度区と遜色なく成長していたが、周囲にワムシが十分にあって低照度区では成長しなかった。また、ワムシ摂餌量は、中照度区では強照度区と同程度であったのに対し低照度区ではほぼ0であったことから、中照度区の設定照度である200 lx程度以上の照度があれば飼育に十分であることがわかった。このことは、清野・平野(1978)が稚仔魚の摂餌活動が停止する明るさは、魚種および餌料によって異なるが、 $10^{-2}$ ~ $10^1$  lxであることが多いとし、 $10^2$  lx程度あればほとんどが摂餌できるとしている光条件に合致する。さらに、実験最終日における生残率は強照度区の方が中照度区よりも高く、本実験の範囲内に限っては、より明るいことが飼育にとって好条件であることが示唆された。一方で、低照度区では摂餌量がないか、もしくは極めて少なかったことから、低照度のためワムシを視認できなかったと推察される。仔魚の眼の発達レベルは低いが(Blaxter and Staines, 1970)、黒色色素が認められたときから機能する(石田・川村, 1985)。本実験に用いたキツネメバル仔魚においても産出直後から眼球には黒色色素が観察されたことから、照度は視覚に作用していたと考えられる。

仔魚期には重大な飢餓状態を経験すると、その後、餌があっても摂餌量が回復しなくなる限界点PNR(Point of No Return)がある。本研究において、給餌開始日を変えた実験の結果、強照度区や中照度区のように十分な光環境下においても、3日目以降の給餌開始では成長の鈍化および生残率の低下を引き起こした。また、給餌開始日からの日数を揃えて比較すると、3日目給餌開始群のワムシ摂餌量は0日目給餌開始群より少なく、餌があっても摂餌量が回復しなかったことから、多くの仔魚は産出から3日齢目にはすでにPNRを超えていたと考えられる。

水槽で飼育しているキツネメバルでは、産出は夜間に行われることが多い(高島, 2011)。産出直後の仔魚は既に開口し餌を食べ始めると考えられるが、種苗生産に

おいては夜間のため餌を与えられない場合や、作業が休日にも及ぶ場合もある。従って、生残率を低下させず、かつ、人の都合に合わせた給餌管理技術を開発することは種苗生産の効率化の課題として重要である。そこで、産出仔魚の収容水槽はエアリー喰い防止のため遮光環境とし、産出翌朝に収容水槽の遮光幕を外すか仔魚を飼育用水槽に収容し直して200 lx以上の照度の照明を当てるとともに、ただちに餌を給餌することで摂餌不足による成長の停滞や生残率の低下を防ぐことができると考える。なお、今回の実験では、キツネメバル仔魚にエアリー喰いによる障害は認められなかった。

## 謝 辞

本原稿をまとめるにあたり、有意義なご助言を頂いた道総研栽培水産試験場の森 立成博士、ならびに図書出版委員各位に感謝申し上げます。また、文献の収集、整理にご助力いただいた道総研中央水産試験場(現釧路水産試験場)の園木詩織博士にお礼申し上げます。

## 引用文献

- Blaxter JHS, Hempel G. The influence of egg size on herring larvae. *J. Cons., Cons. Int. Explor. Mer.* 1963 ; 28 : 211-240.
- Blaxter JHS, Staines M. Pure-cone retinae and retinomotor responses in larvae teleost. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 1970 ; 50 : 449-460.
- 石田健一, 川村軍蔵. 海産魚類の初期生活史7-感覚器の分化過程. *海洋と生物* 1985 ; 36 : 8-14.
- 川辺勝俊, 村井 衛, 隆島史夫. シマアジ仔魚の摂餌・生残におよぼす絶食の影響とPNR. *水産増殖* 1996 ; 44 (3) : 279-283.
- 川村軍蔵. I. 発育過程の形態学的側面1. 感覚器官. 「水産学シリーズ83魚類の初期発育(田中克編)」恒星社厚生閣, 東京. 1991 ; 9-20.
- 清野通康, 平野礼次郎. 海産魚稚仔魚の飼育環境条件, とくに光条件について. *月刊海洋科学* 1978 ; 10 : 728-733.
- 松岡正信, 三谷卓美. 長崎港近海で採集されたマイワシ卵のふ化・飼育(予報). *西海区水産研究所研究報告* 1989 ; 67 : 15-22.
- 永沢 亨. 日本海におけるメバル属魚類の初期生活史. *日本海区水産研究所研究報告* 2001 ; 51 : 1-132.
- 尾形康夫. キツネメバルの仔稚魚について. *福島県水産種苗研究所研究報告* 1984 ; 1 : 47-50.

- 尾形康夫, 鈴木章一, 石井孝幸, 石川幸児, 泉 茂彦, 菊地正信. キツネメバルの種苗生産に関する研究. 福島県水産種苗研究所研究報告 1987 ; 2 : 57-74.
- 佐々木正義. 41. キツネメバル. 上田吉幸, 前田圭司, 嶋田 宏, 鷹見達也編, 漁業生物図鑑 新 北のさかなたち, 北海道新聞社, 北海道. 2003 ; 194-195.
- 高畠信一. キツネメバルの種苗生産技術開発について. 北水試だより 2011 ; 82 : 5-8.
- 高畠信一, 川崎琢真. 3.2 放流基礎調査事業 (キツネメバル). 平成29年度道総研栽培水産試験場事業報告書 2019 ; 15-16.
- 竹内俊郎. 3. 消化と栄養. 「魚類生理学 (板沢靖男・羽生 功編)」恒星社厚生閣, 東京. 1991 ; 67-101.
- Yin MC, Blaxter JHS. Morphological changes during growth and starvation of larval cod (*Gadus morhua* L.) and flounder (*Platichthys flesus* L.). *J. Exp. Mar. Biol. Eco.* 1986 ; 104 : 215-228.
- 與世田兼三, 團 重樹, 藤井あや, 黒川優子, 川合真一郎. 異なった日周条件がスジアラ仔魚の初期摂餌, 初期生残および消化酵素活性に及ぼす影響. 水産増殖 2003 ; 51 : 179-188.

# Development of quantitative RT-PCR targeting *gyrB* mRNA for *Flavobacterium psychrophilum* infecting chum salmon *Oncorhynchus keta*

NAOYUKI MISAKA<sup>\*1</sup>, MAKOTO HATAKEYAMA<sup>2</sup> and KUNIO SUZUKI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mariculture Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization,  
Muroran, Hokkaido 051-0013,

<sup>2</sup>Salmon and Freshwater Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization,  
Eniwa, Hokkaido 061-1433,

<sup>3</sup>Formerly: Salmon and Freshwater Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization,  
Eniwa, Hokkaido 061-1433, Japan

サケ冷水病原菌の*gyrB* mRNAを対象とした定量RT-PCR法の開発

三坂尚行<sup>\*1</sup>, 畑山 誠<sup>2</sup>, 鈴木邦夫<sup>3</sup>

<sup>1</sup>北海道立総合研究機構栽培水産試験場, <sup>2</sup>北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場

<sup>3</sup>元北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場

We developed reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) targeting *Flavobacterium psychrophilum gyrB* mRNA for rapid detection of live bacteria in chum salmon *Oncorhynchus keta* fry. The mRNA was detected at  $6.0 \times 10^1$ – $6.0 \times 10^9$  copies/μl with high correlation ( $R^2 = 0.9998$ ). In March 2008, a BCWD outbreak occurred among chum salmon fry in a salmon hatchery in Hokkaido, Japan. The daily mortality peaked in mid–late March and decreased in early April when cumulative mortality reached 2.3%. During the disease course, the culturable cells and *gyrB* mRNA in kidney tissue samples from moribund individuals were identified and quantified by culture and RT-qPCR, respectively. The prevalence and concentration of *gyrB* mRNA was 60% and  $4.9 \times 10^3$  copies/mg on March 21, and 100% and  $5.6 \times 10^4$  copies/mg on March 26, respectively. No *gyrB* mRNA was detected on March 31, whereas culture prevalence was 95%, 100%, and 40% on March 21, 26, and 31, respectively. These results suggest that the RT-qPCR assay provides rapid quantitative detection of live bacteria in chum salmon fry.

**Keywords:** bacterial coldwater disease, chum salmon, *Flavobacterium psychrophilum*, *gyrB* mRNA, quantification, RT-qPCR,

*Flavobacterium psychrophilum* (Bernardet *et al.*, 1996) is the causative agent of bacterial coldwater disease (BCWD) and rainbow trout fry syndrome (Nematollahi *et al.*, 2003 ; Barnes and Brown, 2011). This bacterium has been isolated from salmonids, including rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Lorenzen *et al.*, 1997 ; Dalsgaard and Madsen, 2000), coho salmon *O. kisutch* (Baliarda *et al.*, 2002 ; Taylor, 2004), Atlantic salmon *Salmo salar* (Ekman *et al.*, 1999 ;

Cipriano, 2005) and chum salmon *O. keta* (Misaka and Suzuki, 2007). In Japan, BCWD was initially reported in diseased coho salmon in the 1980s (Wakabayashi *et al.*, 1991). Since then, rainbow trout (Wakabayashi *et al.*, 1994), masu salmon *O. masou* (Amita *et al.*, 2000) and ayu *Plecoglossus altivelis* (Iida and Mizokami, 1996 ; Liu *et al.*, 2001) have been affected by BCWD.

In northern Japan, chum salmon is one of the most impor-



tant fish species for coastal fisheries. In Hokkaido prefecture, located in northern Japan, chum salmon resources have rapidly increased since the 1970s due to an intensive hatchery program (Miyakoshi *et al.*, 2013). Around one billion artificially raised chum salmon fry weighing approximately 1–1.5 g (Takahashi, 2015) have been released into the coastal areas of Hokkaido from 145 rivers and 74 net pens in fisheries' ports, and about 40 million adults return to the coastal area annually (Miyakoshi *et al.*, 2016). Recently, we reported a 3.3%–90% prevalence of *F. psychrophilum* in ovarian fluid from returning chum salmon female adults in eight rivers in Hokkaido by culture, and the obtained isolates exhibited virulence in salmonid juveniles including chum salmon (Misaka and Suzuki, 2007). Moreover, chum salmon fry mortality due to BCWD has occurred in several Hokkaido salmon hatcheries, and isolates have been obtained from kidney tissue samples in moribund and dead individuals to date, although the cumulative mortality was less than a few percent in each incidence.

Many diagnostic BCWD methods have been reported to detect *F. psychrophilum*, such as specific antigen detection in tissue samples by immunofluorescence (Madetoja *et al.*, 2000 ; Aoki *et al.*, 2005), specific gene detection by PCR (Urdaci *et al.*, 1998 ; Wiklund *et al.*, 2000), and culturable cells by bacterial culture (Nematollahi *et al.*, 2003 ; Barnes and Brown, 2011). Immunofluorescence and PCR are rapid and sensitive methods to detect the bacteria, however, these methods detect even though dead bacteria. Culture methods can detect only live bacteria, but are difficult due to the fastidious nature of *F. psychrophilum* (Michel *et al.*, 1999 ; Wiklund *et al.*, 2000 ; Tirola *et al.*, 2002 ; Nematollahi *et al.*, 2003 ; Barnes and Brown, 2011), and require 48–96 h to produce macroscopic colonies (Holt *et al.*, 1993), resulting in diagnosis delay (del Cerro *et al.*, 2002). Thus, rapid and reliable methods are required for detection of live *F. psychrophilum* in fish reared in salmon hatcheries.

Recently, a quantitative real-time PCR (qPCR) assay targeting *F. psychrophilum*-specific genes has been reported (Orieux *et al.*, 2011 ; Marancik and Wiens, 2013 ; Strepparava *et al.*, 2014). Moreover, to evaluate bacterial growth activities, reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) targeting mRNA expressed by the *gyrB* gene, encoding the subunit B protein of bacterial DNA gyrase, has been developed for human-related bacteria (Tani *et al.*, 2012 ; Okuno *et al.*, 2015). Izumi and Wakabayashi (2000) described *gyrB* have higher substitution rate of nucleotide

and seems to be more appropriate for taxonomic analysis than commonly used 16SrDNA. RT-qPCR assays quantify only live bacterial cells because bacterial mRNA has a short half-life, measured in minutes, and is, therefore, a good indicator of cell viability (Arraiano *et al.*, 1988 ; Belasco, 1993 ; Alifano *et al.*, 1994 ; Sheridan *et al.*, 1998). Additionally, RT-qPCR takes only several hours to perform, providing rapid diagnosis.

The purpose of this study is to develop RT-qPCR targeting *gyrB* mRNA of *F. psychrophilum* to detect live bacteria rapidly and to evaluate the usefulness of this method in chum salmon fry naturally infected with the bacterium.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions** Twelve *Flavobacterium psychrophilum* strains and 13 other bacterial strains were used to verify the specificity of *gyrB* qPCR and *gyrB* mRNA RT-qPCR assay. *F. psychrophilum* strains were previously isolated from salmonids including chum salmon, masu salmon, coho salmon, rainbow trout, and ayu, and were cultured using modified *Cytophaga* broth (CBm ; Wakabayashi and Egusa, 1974). The species, origin, and culture conditions of the other bacteria are summarized in Table 1.

**Batch culture** *F. psychrophilum* type strain NCIMB 1947<sup>T</sup> was cultured in CBm while shaking for 72 h at 15°C. At 0, 9, 24, 33, 48, 53, and 72 h post inoculation, an aliquot of the bacterial culture was sampled. One ml of each aliquot of the bacterial culture was used for both qPCR of the *gyrB* gene and the RT-qPCR assay for *gyrB* mRNA. A 100 µL sample of each bacterial culture aliquot was also serially diluted 10-fold in CBm, inoculated onto CAm (CBm with 1.5% agar), and incubated for 4–5 days at 15°C to examine culturable cell numbers, which were expressed as colony forming units (CFU). qPCR and RT-qPCR were conducted as described below.

**Cloning of *gyrB* gene** To clone a part of *F. psychrophilum* type strain NCIMB 1947<sup>T</sup> *gyrB* gene, PCR was performed using primers PSY-G1F and PSY-G1R to amplify 1,017 base pair product (Izumi and Wakabayashi, 2000). PCR amplification was performed using a GeneAmp<sup>®</sup> 2400 PCR thermal cycler (Applied Biosystems) in a 25 µL reaction mixture containing 1 µL of DNA template (100 µg/mL), 0.2 µM of each primer, and 12.5 µL of AmpliTaq Gold<sup>®</sup> PCR Master Mix (Applied Biosystems). Cycling conditions were

**Table 1** Strains, hosts, and culture medium of *Flavobacterium psychrophilum* and other bacteria used to verify the specificity of reverse transcription quantitative real-time PCR assay

| Species                               | Strain                  | Host fish     | tissue          | Isolate year | Culture medium                         | Remarks                  |
|---------------------------------------|-------------------------|---------------|-----------------|--------------|----------------------------------------|--------------------------|
| <i>Flavobacterium psychrophilum</i>   | NCIMB1947 <sup>T</sup>  | coho salmon   |                 | Unknown      | modified <i>Cytophaga</i> <sup>a</sup> |                          |
| <i>F. psychrophilum</i>               | FPC814                  | rainbow trout |                 | 1991         | modified <i>Cytophaga</i> <sup>a</sup> |                          |
| <i>F. psychrophilum</i>               | FPC840                  | ayu           |                 | 1987         | modified <i>Cytophaga</i> <sup>a</sup> |                          |
| <i>F. psychrophilum</i>               | Fa-A                    | ayu           | kidney          | 2002         | modified <i>Cytophaga</i> <sup>a</sup> | Misaka and Suzuki (2007) |
| <i>F. psychrophilum</i>               | Fp-B                    | coho salmon   | kidney          | 2002         | modified <i>Cytophaga</i> <sup>a</sup> | Misaka and Suzuki (2007) |
| <i>F. psychrophilum</i>               | Fp-C                    | masu salmon   | kidney          | 2002         | modified <i>Cytophaga</i> <sup>a</sup> | Misaka and Suzuki (2007) |
| <i>F. psychrophilum</i>               | Fp-D                    | rainbow trout | kidney          | 2002         | modified <i>Cytophaga</i> <sup>a</sup> | Misaka and Suzuki (2007) |
| <i>F. psychrophilum</i>               | Fp-K                    | chum salmon   | Ovarian fluid   | 2004         | modified <i>Cytophaga</i> <sup>a</sup> | Misaka and Suzuki (2007) |
| <i>F. psychrophilum</i>               | Fp-O                    | chum salmon   | Ovarian fluid   | 2004         | modified <i>Cytophaga</i> <sup>a</sup> | Misaka and Suzuki (2007) |
| <i>F. psychrophilum</i>               | Fp-T                    | chum salmon   | kidney          | 2005         | modified <i>Cytophaga</i> <sup>a</sup> | Misaka and Suzuki (2007) |
| <i>F. psychrophilum</i>               | Fp-W                    | masu salmon   | kidney          | 2005         | modified <i>Cytophaga</i> <sup>a</sup> | Misaka and Suzuki (2007) |
| <i>F. psychrophilum</i>               | Fp-Z                    | chum salmon   | kidney          | 2005         | modified <i>Cytophaga</i> <sup>a</sup> | Misaka and Suzuki (2007) |
| <i>F. branchiophilum</i>              | ATCC35035               |               |                 |              | modified <i>Cytophaga</i> <sup>a</sup> |                          |
| <i>F. limicola</i>                    | NBRC103156 <sup>T</sup> |               |                 |              | tryptic soy broth                      |                          |
| <i>F. granuli</i>                     | NBRC102009 <sup>T</sup> |               |                 |              | R2A <sup>b</sup>                       |                          |
| <i>F. columnare</i>                   | Fc-1                    | chum salmon   | caudal peduncle | 2005         | modified <i>Cytophaga</i> <sup>a</sup> |                          |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>        | NBRC103044 <sup>T</sup> |               |                 |              | 702 medium <sup>c</sup>                |                          |
| <i>P. fluorescens</i>                 | NBRC101042              |               |                 |              | 702 medium                             |                          |
| <i>Aeromonas salmonicida</i>          | NCIMB1102               |               |                 |              | tryptic soy broth                      |                          |
| <i>Vibrio anguillarum</i>             | NCIMB828                |               |                 |              | tryptic soy broth                      |                          |
| <i>Bacillus subtilis</i>              | ATCC6633                |               |                 |              | tryptic soy broth                      |                          |
| <i>B. cereus</i>                      | ATCC1178                |               |                 |              | tryptic soy broth                      |                          |
| <i>Micrococcus luteus</i>             | ATCC9341                |               |                 |              | tryptic soy broth                      |                          |
| <i>Chryseobacterium daecheongense</i> | NBRC102008 <sup>T</sup> |               |                 |              | R2A                                    |                          |
| <i>Renibacterium salmoninarum</i>     | Rs-3                    | chum salmon   | kidney          | 2004         | SKDM <sup>d</sup>                      | Suzuki and Sakai (2007)  |

a: Wakabayashi & Egusa (1974) b: Reasoner & Geldreich (1985) c: Takehara et al (2008) d: Austin et al. (1983)

an initial denaturation at 95 °C for 10 min ; followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 45 s, and extension at 72 °C for 1 min ; and a final extension at 72 °C for 7 min. An aliquot of PCR product (15 µL) was electrophoresed on a 0.8% agarose gel containing 50 µg/mL ethidium bromide. The target band (1,017 base pairs) was purified using a Suprec-01<sup>TM</sup> filter cartridge (Takara Bio Inc.), and then ligated into pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vectors (Promega). The recombinant plasmid pGEM-T/*gyrB* was transformed into *Escherichia coli* JM109 (Takara Bio Inc.).

**In vitro transcription of standards** The recombinant plasmid was extracted from the transformed *E. coli* using a Flexi Prep Kit (Amersham Bioscience), linearized with the restriction enzyme *SalI*, and purified using Suprec-01<sup>TM</sup> (Takara Bio Inc.) filtration cartridges. The single strand RNA transcripts were produced using a MEGAscript<sup>®</sup> T7 Transcription Kit (Ambion) and electrophoresed on MOPS/formaldehyde gels to confirm the presence of single bands of the target size. The transcripts were purified using a MEGAscript<sup>®</sup> T7 Kit, and the absence of plasmid DNA in the aliquot was confirmed by PCR targeting the *gyrB* gene. The RNA yield and purity of the transcripts were determined spectrophotometrically by measuring the absorbance ratio at 260/280 nm. The transcript concentration was calculated by

the molecular weight and Avogadro number. Serial 10-fold dilutions of the transcripts at  $6.0 \times 10^1$ – $6.0 \times 10^9$  copies/µL in NANOpure water (Barnstead/ThermoFisher Corp.) were used as standards for the RT-qPCR assay described below.

**cDNA synthesis** cDNA synthesis of RNA standard samples and unknown samples was conducted using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

**Evaluation of reverse transcription efficiency** An RNA standard serially diluted from  $6.0 \times 10^1$ – $6.0 \times 10^9$  copies/µL was reverse transcribed to cDNA and as used as a qPCR template determine the efficiency of reverse transcription. Samples were diluted 2-fold for cDNA synthesis. The cDNA samples were stored at –20 °C.

**RNA extraction** Total RNA from bacterial culture samples and kidney tissue samples from chum salmon fry stored in RNAlater<sup>TM</sup> solution (Ambion) were extracted using an RNAqueous<sup>®</sup>-4PCR Kit (Ambion). Briefly, 1 mL of bacterial culture sample centrifuged at  $8,000 \times g$  for 5 min at 4 °C and the kidney tissue samples collected aseptically (10–20 mg per fish) were mixed with 100 µL of RNAlater<sup>TM</sup> solution and stored at 4 °C for 24 h. Then, the bacterial culture and kidney samples were centrifuged at  $8,000 \times g$  for 5 min at 4 °C, and the supernatants were discarded. The samples

were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. No genomic DNA remained because following RNA extraction, DNA in the samples was digested using a Turbo DNA-free™ Kit (Ambion). Thus, the samples were diluted 1.2-fold.

**DNA extraction** DNA was extracted from bacterial culture samples and kidney tissue samples (10–20 mg per fish) using a Sepa Gene kit (Eidia Co. Ltd). The extracted DNA was dissolved in 1  $\mu\text{L}$  of NANOpure water per 1 mg kidney tissue or 10  $\mu\text{L}$  of bacterial culture. The DNA yield and purity were determined spectrophotometrically by measuring the absorbance ratio at 260/280 nm.

**RT-qPCR assay for *gyrB* mRNA** To quantify cDNA generated by reverse transcription of RNA, RT-qPCR was conducted with a TaqMan probe using a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The primers and probe were designed using Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems) based on the nucleotide sequence of the *gyrB* gene paralog *parE* of *F. psychrophilum* strain FPC828 (GenBank accession number AB012859). The sequences of forward primer PSY-945GF, reverse primer PSY-1015GR, and TaqMan probe PSY-966GP were 5'-CGGCTTCGGGTTCTATCACA-3', 5'-AGGCTTACCACGCAAGCTAAAC-3', and 5'-AATCTCGTGATGTAAATAC-3', respectively. The TaqMan probe consisted of an oligonucleotide with a 5' 6-carboxy-fluorescein (FAM) reporter fluorescent dye and a 3' non-fluorescent quencher plus minor groove binder. The 50  $\mu\text{L}$  reaction mixture contained 25  $\mu\text{L}$  of TaqMan® Universal PCR Master Mix with no UNG (Applied Biosystems), 0.9  $\mu\text{M}$  of each primer, 0.25  $\mu\text{M}$  of TaqMan probe, and 5  $\mu\text{L}$  of cDNA (10 ng/ $\mu\text{L}$ ). The reactions were performed in duplicate for each sample. The amplification program was  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min followed by 45 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s and  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min.

**Specificity determination of primers and probe** To determine the specificity of the primers and probe, DNA extracted from the stationary phase of the pure bacteria cultures, including 12 strains of *F. psychrophilum* and 13 strains of other bacteria (Table 1) were quantified by qPCR. The DNA concentration in the samples was adjusted to approximately 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Evaluation of the extraction efficiency of *gyrB* mRNA in kidney tissue samples** The efficiency of the *gyrB* mRNA extraction from kidney tissue samples was evaluated by RT-qPCR. Kidney tissue samples (approximately 10 mg per fish) were collected from apparently healthy chum salmon

fry weighing around 1 g, mixed with 100  $\mu\text{L}$  of RNAlater™, and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Kidney tissue samples from 10 individuals were pooled, and 20 mg of the pooled samples were spiked with 10  $\mu\text{L}$  of RNA standard samples at concentrations of  $6.0 \times 10^3$ ,  $6.0 \times 10^5$ ,  $6.0 \times 10^7$ , and  $6.0 \times 10^9$  *gyrB* mRNA copies/ $\mu\text{L}$  and then homogenized. NANOpure water was used as a non-spiked control. Total RNA was extracted from the spiked samples.

The RNA concentration in each sample was determined by RT-qPCR assay, and the extraction efficiency was calculated.

**Fish from naturally occurring BCWD outbreaks** In early March 2008, a BCWD outbreak occurred in around 750,000 chum salmon fry, each weighing approximately 1 g, reared in a pond at a salmon hatchery in Hokkaido, Japan. Number of dead fry was counted everyday and daily mortality was recorded from March 5 to April 5. Water temperature was recorded from March 5 to April 5. In early March, a low percentage of individuals exhibited disease symptoms including a slightly eroded caudal fin and anemia. From these observations, we concluded a possible BCWD outbreak since this hatchery had a BCWD outbreak in March and April of the previous year (2007). In this previous outbreak, moribund and dead chum salmon fry reared in the facility displayed symptoms typical of BCWD including a severely eroded caudal fin, spleen hypertrophy, and anemia. *F. psychrophilum* was isolated from most of the kidney tissue samples of the dead individuals.

Kidney tissue samples (10–20 mg per fish) from 25 individuals of the 2008 outbreak were collected on March 21, 26, and 31, respectively. Cold CBm was used to homogenize 20 of these samples (100  $\mu\text{L}$  per sample), and they were cultured using CAM at  $15^{\circ}\text{C}$  for 5 days. Five of these samples were used for RT-qPCR described above.

**Correlation analyses** Linear regression and square regression coefficient ( $R^2$ ) were analyzed using Microsoft Excel 2007 (Microsoft).

## RESULTS

**Specificity of primers and probe** The specificity of the primers and the TaqMan probe was confirmed. The concentration of *gyrB* in culture samples from 12 strains of *Flavobacterium psychrophilum* was  $1.2\text{--}8.1 \times 10^7$  copies/ $\mu\text{L}$ , whereas no amplification products were detected in the 13 strains of other bacteria except for *F. branchiophilum*,

Table 2 Threshold PCR cycle number ( $C^T$ ) and quantification of *gyrB* DNA of *Flavobacterium psychrophilum* and other bacteria by quantitative real-time PCR assay

| Species                               | $C^T$ | Copies $\mu\text{L}^{-1}$ |
|---------------------------------------|-------|---------------------------|
| <i>Flavobacterium psychrophilum</i>   | 17.60 | $1.2 \times 10^7$         |
| <i>F. psychrophilum</i>               | 15.04 | $6.6 \times 10^7$         |
| <i>F. psychrophilum</i>               | 15.18 | $6.0 \times 10^7$         |
| <i>F. psychrophilum</i>               | 17.46 | $1.3 \times 10^7$         |
| <i>F. psychrophilum</i>               | 15.20 | $6.0 \times 10^7$         |
| <i>F. psychrophilum</i>               | 14.74 | $8.1 \times 10^7$         |
| <i>F. psychrophilum</i>               | 17.54 | $1.3 \times 10^7$         |
| <i>F. psychrophilum</i>               | 16.48 | $2.6 \times 10^7$         |
| <i>F. psychrophilum</i>               | 16.70 | $2.2 \times 10^7$         |
| <i>F. psychrophilum</i>               | 15.26 | $5.7 \times 10^7$         |
| <i>F. psychrophilum</i>               | 16.02 | $3.5 \times 10^7$         |
| <i>F. psychrophilum</i>               | 17.04 | $1.8 \times 10^7$         |
| <i>F. branchiophilum</i>              | 35.46 | $7.8 \times 10^1$         |
| <i>F. limicola</i>                    |       | N.D. <sup>a</sup>         |
| <i>F. granulii</i>                    |       | N.D.                      |
| <i>F. columnare</i>                   |       | N.D.                      |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>        |       | N.D.                      |
| <i>P. fluorescens</i>                 |       | N.D.                      |
| <i>Aeromonas salmonicida</i>          |       | N.D.                      |
| <i>Vibrio anguillarum</i>             |       | N.D.                      |
| <i>Bacillus subtilis</i>              |       | N.D.                      |
| <i>B. cereus</i>                      |       | N.D.                      |
| <i>Micrococcus luteus</i>             |       | N.D.                      |
| <i>Chryseobacterium daecheongense</i> |       | N.D.                      |
| <i>Renibacterium salmoninarum</i>     |       | N.D.                      |

a: Not detected

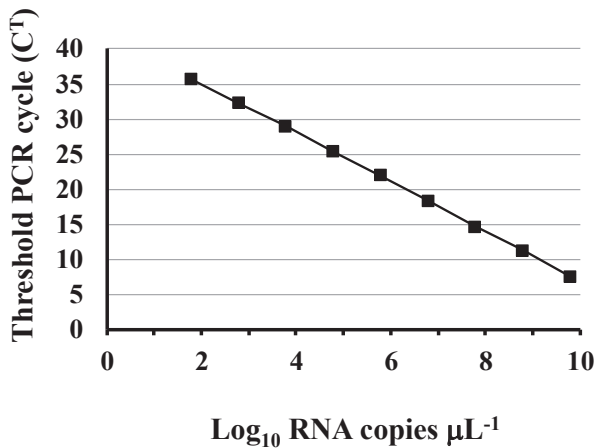


Fig. 1 Standard curve of threshold PCR cycles ( $C^T$ ) versus log concentration of *gyrB* gene cDNA by reverse transcription of mRNA in *Flavobacterium psychrophilum*

which yielded  $7.8 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  by the assay (Table 2).

**Reliability and detection limit of RT-qPCR assay for *gyrB* mRNA** The threshold PCR cycle number ( $C^T$ ) values plotted against the standard samples (log concentration of *gyrB* mRNA) gave a regression line from  $6.0 \times 10^1$ – $6.0 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$  (Fig. 1). The  $R^2$  value was 0.9998, demonstrat-

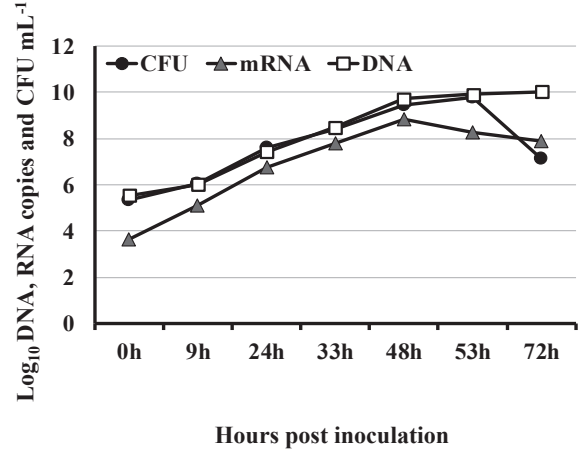


Fig. 2 Transition in concentrations of DNA, mRNA and culturable cell number (CFU) of *Flavobacterium psychrophilum* during batch culture using *Cytophaga* broth at 15°C

ing a high correlation. The slope of the reaction was  $-3.51$ , and the amplification efficiency was 0.927. The lower detection limit in the reaction was  $6.0 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ , corresponding to  $1.4 \times 10^2$  copies/mg of kidney tissue samples.

**Evaluation of reverse transcription and extraction efficiency of *gyrB* mRNA in kidney tissue samples** The efficiency of reverse transcription from serially diluted RNA samples at  $6.0 \times 10^3$ – $6.0 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$  to cDNA was almost 100% (range, 91.3%–126.6%). The extraction efficiency (ratio of the concentration of RNA standard samples to the concentration of spiked RNA standard samples in kidney tissue) was approximately 40% (Table 3) because the samples were diluted 5-fold in extracting RNA, 1.2-fold in DNase treatment and 2-fold in reverse transcription (total 12-fold).

**Batch culture** The culturable number of bacteria was  $2.2 \times 10^5$  CFU/mL at 0 h post inoculation. It increased to  $5.8 \times 10^9$  CFU/mL on 53 h, and decreased to  $1.4 \times 10^7$  CFU/mL on 72 h post inoculation (Fig. 2). The *gyrB* mRNA concentration at 0 h post inoculation was  $4.2 \times 10^3$  copies/mL. It increased to  $6.5 \times 10^8$  copies/mL on 48 h, and decreased to  $7.8 \times 10^7$  copies/mL on 72 h post inoculation. The *gyrB* DNA concentration was  $3.5 \times 10^5$  copies/mL at 0 h post inoculation, continued to increase during culture and reached to  $1.1 \times 10^{10}$  copies/mL on 72 h post inoculation. Thus, *gyrB* mRNA concentration to culturable cell count (CFU) or DNA concentration was well correlated in the log phase of the culture. The ratio of mRNA concentration to culturable cell concentration was approximately 0.1–0.2 in log phase and 0.03–0.6 in stationary phase.

Table 3 Extraction efficiency of RNA in spiked kidney tissues by reverse transcription real-time PCR assay

| Standard samples                  | Spiked samples                       |                                    | Extraction efficiency |
|-----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| RNA copies $\mu\text{L}^{-1}$ (A) | Threshold PCR cycle number ( $C_T$ ) | RNA copies $\mu\text{L}^{-1}$ (B)* | (B)/(A) (%)           |
| $6.0 \times 10^9$                 | 12.19                                | $1.9 \times 10^8$                  | 37.4                  |
| $6.0 \times 10^7$                 | 19.15                                | $1.9 \times 10^6$                  | 37.4                  |
| $6.0 \times 10^5$                 | 25.74                                | $2.4 \times 10^4$                  | 48.0                  |
| $6.0 \times 10^3$                 | 32.89                                | $2.1 \times 10^2$                  | 39.6                  |
| None (control)                    | 37.04                                | $1.4 \times 10^1$                  | -                     |

\* The samples were diluted 12-fold (diluted 5-fold in extracting RNA, 1.2-fold Dnase treatment and 2-fold in reverse transcription)

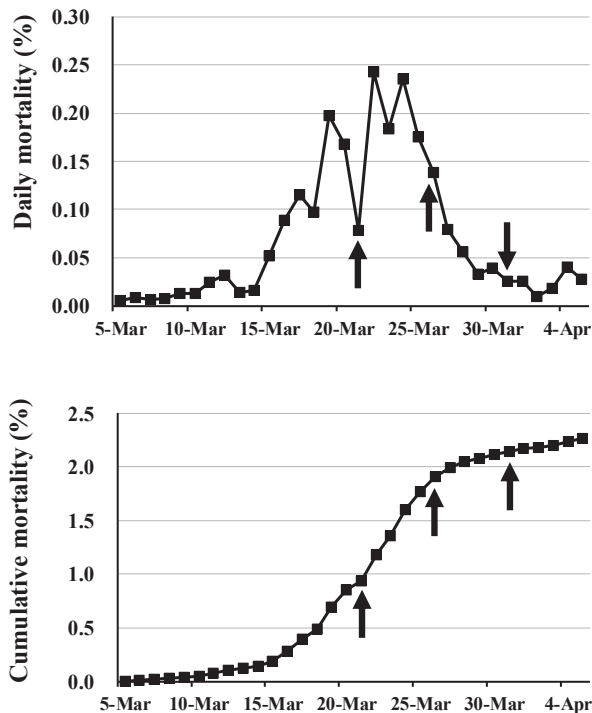


Fig.3 Transition in daily mortality rate (a) and cumulative mortality rate (b) of chum salmon fry due to BCWD in a hatchery. Arrows show sampling date.

**Naturally infected chum salmon fry** In March 2008, a low percentage of chum salmon fry (approximately 10,000–20,000 individuals) reared in one pond in a hatchery exhibited disease symptoms including a slightly eroded caudal fin typical of BCWD. Daily mortality increased to 0.05% on March 15 and peaked at 0.24% from March 22 to 24, finally decreasing to 0.03% in late March (Fig. 3a). The cumulative mortality reached 2.3% on April 5 (Fig. 3b). The water temperature in this pond was recorded everyday, and gradually increased from 7.5 °C on March 5 to 9.2 °C on April 5. The prevalence by culture (number of positive samples/number of samples tested) was 95% on March 21, increasing to 100% on March 26 and decreasing to 40% on March 31 (Table 4). On March 21, the prevalence and concentration of

*gyrB* mRNA, as determined by RT-qPCR, were 60% and  $4.9 \times 10^3$  copies/mg kidney tissue, respectively, 100 % and  $5.6 \times 10^4$  copies/mg on March 26. On March 31, *gyrB* mRNA was not detected in any samples.

## DISCUSSION

**Specificity of RT-qPCR** This study revealed that the specificity of the RT-qPCR assay targeting *gyrB* mRNA was sufficiently high because all strains of *Flavobacterium psychrophilum* were detected and quantified at the same level, whereas no amplification was detected in the other bacteria used except for *F. branchiophilum*, showing a weak cross-reaction. *F. branchiophilum* is the causative agent of bacterial gill disease in freshwater fishes (Wakabayashi *et al.*, 1989 ; Bullock, 1990) and has been isolated from salmonids (Heo *et al.*, 1990 ; Turnbull, 1993). However, the bacterium has only been detected in external organs including gill tissue and on the skin's surface and has not been reported in internal organs (kidney tissue and others) to date (Wakabayashi, 2004). Strepparava *et al.* (2014) reported a weak cross-reaction with the highest *F. branchiophilum* pure DNA concentrations ( $10^6$  cells per reaction and 50 copies detected) in a qPCR targeting *F. psychrophilum rpoC*, encoding RNA polymerase  $\beta'$  subunit, and considered the results as negative. This finding is consistent with our results. Thus, the weak cross-reaction with *F. branchiophilum* observed in our study could probably be negligible for quantitative detection of *F. psychrophilum* in chum salmon fry. Our report is the first on RT-qPCR targeting *F. psychrophilum gyrB* mRNA for rapid detection of live bacteria. The specificity of designed primers and probe used in this study targeting specific region of *gyrB* gene of *F. psychrophilum* is sufficiently high because all *F. psychrophilum* strains used in this study were detected same level in RT-qPCR as described above. However, the *gyrB* gene sequence corresponding to PSY-945GF and PSY-1015GR in



Table 4 Detection rate and average concentration of *gyrB* mRNA of *Flavobacterium psychrophilum* in chum salmon fry kidney tissue samples of during naturally occurring outbreak of bacterial coldwater disease Numbers in parenthesis indicate minimum and maximum value

| Sampling date | Culture        | RT-qPCR        |                                                                          |
|---------------|----------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------|
|               | Prevalence (%) | Prevalence (%) | Concentration (copies mg <sup>-1</sup> of kidney tissue)                 |
| Mar 21        | 95             | 60             | 4.9 x 10 <sup>3</sup><br>(2.2x 10 <sup>3</sup> - 1.6 x 10 <sup>4</sup> ) |
| Mar 26        | 100            | 100            | 5.6 x 10 <sup>4</sup><br>(1.1x 10 <sup>3</sup> - 1.2 x 10 <sup>5</sup> ) |
| Mar 31        | 40             | ND*            | ND                                                                       |

\* Not detected

the strain OKA9805 isolated from ayu (Izumi and Wakabayashi, 2000) has one mutation in each primer region (accession number AB034737). Izumi *et al.* (2003) suggested *F. psychrophilum* strains isolated from ayu have unique genotype compared to strains isolated from other species by PCR-RFLP analysis. So developed method in this study might not be suitable for detection of *F. psychrophilum* in ayu.

**Effectiveness of RT-qPCR** Bacterial mRNA has a short half-life, measured in minutes, and could be a good indicator of cell viability (Arraiano *et al.*, 1988 ; Belasco, 1993 ; Alifano *et al.*, 1994 ; Coutard *et al.*, 2005 ; Elliot, 2012). The RT-qPCR assay developed in this study could be a rapid and reliable method to quantify specific mRNA of *F. psychrophilum* and could quantify *F. psychrophilum*-specific mRNA despite the presence of other bacteria, thereby allowing the detection of live, proliferative bacteria in chum salmon fry reared in salmon hatcheries. In *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease, RT-PCR was used to detect viable cells (Cook and Lynch, 1999), and RT-qPCR was verified to quantify the pathogen viability (Suzuki and Sakai, 2007).

Bacterial culture is a renowned method to quantify live proliferative bacteria because it can be conducted inexpensively and has a higher sensitivity. However, culture takes a relatively long time to produce macroscopic colonies, sub-culture and identification of bacteria such as PCR (usually 5–8 days). Additionally, other fast-growing bacteria could interfere with colony detection (Kumagai *et al.*, 2004).

This study showed a relatively low sensitivity of the RT-qPCR assay compared to that of culture. Although in batch

culture the ratio of the concentration of *gyrB* mRNA to that of the culturable cell concentration was well correlated in log phase at 9–48 h post inoculation, the ratio of mRNA concentration to culturable cell (or DNA) concentration was approximately 0.1–0.2. This suggests a low mRNA concentration in the kidney tissue samples of moribund fish in BCWD outbreaks as well as in batch culture and a somewhat lower sensitivity of the RT-qPCR assay for field fish samples compared to that of culture methods. Perhaps the extraction efficiency of RNA being approximately 40%, which was estimated by a spiking test, may be attributed to these results. However, irrespective of this disadvantage, *gyrB* mRNA could be an indicator of *F. psychrophilum* growth activity. Additionally, the slope of reaction between the threshold PCR cycle number and log concentration in RNA standard samples or spiked RNA standard samples in kidney tissue were almost same, -3.51 and -3.43, respectively (data not shown). This result indicates the effectiveness of RT-qPCR. The *gyrB* gene encodes subunit B of bacterial DNA gyrase, playing an essential role in DNA replication in all bacterial species (Roberts and Shapiro, 1997). Furthermore, *gyrB* gene is a housekeeping gene, and a single copy exists in most bacterial genomes. Wu *et al.* (2015) reported complete genome sequence of *F. psychrophilum* strain ATCC 49418<sup>T</sup> (=NCIMB1947<sup>T</sup>), and this strain has single copy of *gyrB* gene (accession number CP007207). Thus, expression of *gyrB* gene can be used as an indicator of bacterial growth (Tani *et al.*, 2012).

**Relationship among mRNA, DNA and CFU** The expression levels in *F. psychrophilum* obtained in this study were generally lower than other human-related bacterial spe-

cies including *Escherichia coli* (Tani *et al.*, 2012) and *Legionella pneumophila* (Okuno *et al.*, 2015). *GyrB* expression in *F. psychrophilum* was upregulated at 8°C compared with 20°C (Hesami *et al.*, 2011). Batch culture was conducted at 15°C in this study, however, water temperature in hatcheries rearing chum salmon fry in Hokkaido below 10°C in many cases. BCWD typically occurs at water temperature below 16°C and most prevalent and serious at 10°C and below (Starliper, 2011). Also, we conducted batch culture experiment up to 72 h post inoculation, the mRNA expression peaked on 48 h. Suzuki and Sakai (2007) has conducted batch culture experiment using *Renibacterium salmoninarum* up to 34 days post inoculation, and they confirmed the correlation among CFU, concentration of DNA and mRNA of bacterium through the experiment nevertheless the mRNA expression peaked on 14 days. Thus, we should conduct batch culture experiment in different temperature using various strains of *F. psychrophilum* for longer period to confirm the reliability of this study.

In this study in a salmon hatchery with a history of BCWD, the disease reoccurred in chum salmon fry reared in the facility. The fish showed disease signs typical of BCWD and mortality due to the disease. The pathogen among the rearing fry were detected and quantified by RT-qPCR for *gyrB* mRNA, which could reflect the mortality profile of the disease. The pathogen increased as the disease progressed from March 21 to March 26. No *gyrB* mRNA was detected on March 31, when the daily mortality decreased to low levels. Culture prevalence also coincided well with the disease course, and the sensitivity of culture method was higher than that of RT-qPCR. These results suggest that the RT-qPCR assay allowed for the rapid and reliable detection of live and proliferative *F. psychrophilum* quantitatively in chum salmon fry in salmon hatcheries. The cause of the discrepancy between prevalence by culture and that by RT-qPCR on March 31 remains unclear. The difference of sample number (RT-qPCR: n = 5, culture : n = 20) may attribute this result. *F. psychrophilum* has been reported as a subclinical infection in some salmonid populations (Dalsgaard and Madsen, 2000 ; Wiklund *et al.*, 2000 ; Madetoja *et al.*, 2000). A subclinical infection or pathogen carriers in chum salmon fry and a somewhat higher sensitivity of the culture method compared with that of the RT-qPCR method might have influenced the results.

In this study, disease might already a bit progressed in chum salmon fry sampled in a hatchery on March 21, so ar-

tificial infection experiment and sampling of diseased fish during course of the disease must be conducted to confirm the usefulness RT-qPCR method. Many artificial infection of *F. psychrophilum* have been conducted by injection experiment (Madsen and Dalsgaard, 1999 ; Garcia *et al.*, 2000). These methods bypass the non-specific defense mechanism located in the skin, so do not appropriate to evaluate the concentration of pathogen in internal organs. Immersion infection experiment is appropriate method, however, establishment of infection could difficult without some treatment (Madsen and Dalsgaard, 1999 ; Madetoja *et al.*, 2000). Although we failed to several immersion infection experiments using chum salmon fry, immersion infection experiment is needed to apply the RT-qPCR method to rapid diagnosis of BCWD. In analysis of RT-qPCR, PCR and culture using chum salmon fry, another fish has used in each method. Using same organ from one individual is favorable to compare the results among these methods, however, chum salmon fry in hatchery is small described above and is difficult to collect kidney tissue samples for three methods from one individual. Further experiment is needed using more big fish to compare the usefulness of these methods.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the staff of Hokkaido Salmon Propagation Association for their assistance in sample collection. This study was supported by a grant from the Hokkaido government.

## LITERATURE CITED

- Alifano P, Bruni CB, Carlomagno MS. Control of mRNA processing and decay in prokaryotes. *Genetica* 1994 ; 94 : 157-172.
- Amita K, Hoshino M, Honma T, Wakabayashi H. An investigation on the distribution of *Flavobacterium psychrophilum* in Umikawa river. *Fish Pathol.* 2000 ; 35 : 193-197.
- Aoki M, Kondo M, Kawai K, Oshima S. Experimental bath infection with *Flavobacterium psychrophilum*, inducing typical signs of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry syndrome. *Dis. Aquat. Org.* 2005 ; 67 : 73-79.
- Arraiano CM, Yancey SD, Kushner SR. Stabilization of discrete mRNA breakdown products in *ams pnp rnb* multiple mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*

- 1988 ; 170 : 4625–4633.
- Austin B, Embley TM, Goodfellow M. Selective isolation of *Renibacterium salmoninarum*. *FEMS Microbiol. Letters* 1983 ; 17 : 111–114.
- Baliarda A, Faure D, Urdaci MC. Development and application of a nested PCR to monitor brood stock salmonid ovarian fluid and spleen of detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Appl. Microbiol.* 2002 ; 92 : 510–516.
- Barnes ME, Brown ML. A review of *Flavobacterium psychrophilum* biology, clinical signs, and bacterial cold water disease prevention and treatment. *Open Fish. Sci. J.* 2011 ; 4 : 40–48.
- Belasco JG. mRNA degradation in prokaryotic cells: an overview. In “control of messenger RNA stability” (ed by Belasco J. G., Braorman G.). Academic Press, san Diego, CA 1993 ; pp. 3–12.
- Bernardet JF, Segers P, Vancanneyt M, Berthe F, Kesters K, Vandamme P. Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. [Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996 ; 46 : 128–148.
- Bullock GL. Bacterial gill disease of freshwater fishes. *Fish Dis. Leaflet.* 1990 ; 84 : 1–3.
- Del Cerro A, Mendoza MC, Guijarro JA. Usefulness of a TaqMan-based chain reaction assay for the detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Appl. Microbiol.* 2002 ; 93 : 149–156.
- Cipriano RC. Intraovum infection caused by *Flavobacterium psychrophilum* among eggs from captive Atlantic salmon broodfish. *J. Aquat. Anim. Health* 2005 ; 17 : 275–283.
- Cook M, Lynch WH. A sensitive nested reverse transcriptase PCR assay to detect viable cells of the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 1999 ; 65 : 3042–3047.
- Coutard F, Pommepuy M, Loaec S, Hervio-Heath D. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state. *J. Appl. Microbiol.* 2005 ; 98 : 951–961.
- Dalsgaard I, Madsen L. Bacterial pathogens in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), reared at Danish freshwater farms. *J. Fish Dis.* 2000 ; 23 : 199–209.
- Ekman E, Borjeson H, Johansson N. *Flavobacterium psychrophilum* in Baltic salmon *Salmo salar* brood fish and their offspring. *Dis. Aquat. Org.* 1999 ; 37 : 159–163.
- Elliot DG. Bacterial kidney disease. In “AFS-FHS (American Fisheries Society-Fish Health Section). FHS blue book: suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens” 2016 edition, 2012 ; AFS-FHS, Bethesda, Maryland.
- Garcia C, Pozet F, Michel C. Standardization of experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry syndrome. *Dis. Aquat. Org.* 2000 ; 42 : 191–197.
- Heo GJ, Kasai K, Wakabayashi H. Occurrence of *Flavobacterium branchiophila* associated with bacterial gill disease at a trout hatchery. *Fish Pathol.* 1990 ; 25 : 99–105.
- Hesami S, Metcalf DS, Lumsden JS, MacInnes JI. Identification of cold-temperature-regulated genes in *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011 ; 77 : 1593–1600.
- Holt RA, Rohovec JS, Fryer JL. Bacterial cold-water disease. In “Bacterial diseases of fish” (ed by Inglis V., Robert R. J., Bromage N. R.). Blackwell Scientific Publications, Oxford 1993 ; pp. 3–22.
- Iida Y, Mizokami A. Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Fish Pathol.* 1996 ; 31 : 157–164.
- Izumi S, Wakabayashi H. Sequencing of gyrB and their application in the identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR. *Fish Pathol.* 2000 ; 35 : 93–94.
- Izumi S, Aranishi F, Wakabayashi H. Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Dis. Aquat. Org.* 2003 ; 56 : 207–214.
- Kumagai A, Nakayasu C, Oseko N. Effect of tobramycin supplementation to medium on isolation of *Flavobacterium psychrophilum* from ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.* 2004 ; 39 : 75–78.
- Liu H, Izumi S, Wakabayashi H. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in various organs of ayu *Plecoglossus altivelis* by *in situ* hybridization. *Fish Pathol.* 2001 ; 36 : 7–11.
- Lorenzen E, Dalsgaard I, Bernardet JF. Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome I : phenotypic and genomic studies. *Dis. Aquat. Org.* 1997 ; 31 : 197–208.
- Madetoja J, Nyman P, Wiklund T. *Flavobacterium psy-*

- chrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.* 2000 ; 43 : 27–38.
- Madsen L, Dalsgaard I. Reproducible methods for experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.* 1999 ; 36 : 169–176.
- Marancik DP, Wiens GD. A real-time polymerase chain reaction assay for identification and quantification of *Flavobacterium psychrophilum* and application to disease resistance studies in selectively bred rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *FEMS Microbiol.* 2013 ; 339 : 122–129.
- Michel C, Antonio D, Hedrick RP. Production of viable cultures of *Flavobacterium psychrophilum*: approach and control. *Res. Microbiol.* 1999 ; 150 : 351–358.
- Misaka N, Suzuki K. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in chum salmon *Oncorhynchus keta* and virulence of isolated strains to salmonid fishes. *Fish Pathol.* 2007 ; 42 : 201–209.
- Miyakoshi Y, Nagata M, Kitada S, Kaeriyama M. Historical and current hatchery programs and management of chum salmon in Hokkaido, northern Japan. *Rev. Fish. Sci.* 2013 ; 21 : 469–479.
- Miyakoshi Y, Fujiwara M, Ando D, Nagata M. Return of chum salmon released from a river and a net-pen in eastern Hokkaido. *Sci. Rep. Hokkaido Fish. Res. Inst.* 2016 ; 89 : 9–15.
- Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F, Haesebrouck F. *Flavobacterium psychrophilum* infection in salmonid fish. *J. Fish. Dis.* 2003 ; 26 : 563–574.
- Okuno T, Tani K, Yamaguchi N, Nasu M. Expression of *gyrB* and 16S ribosomal RNA genes as indicators of growth and physiological activities of *Legionella pneumophila*. *Biocont. Sci.* 2015 ; 20 : 67–70.
- Orieux N, Bourdineaud JP, Douet DG, Daniel P, Le Hénaff M. Quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), tissues by qPCR. *J. Fish. Dis.* 2011 ; 24 : 811–821.
- Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985 ; 49 : 1–7.
- Roberts RC, Shapiro L. Transcription of genes encoding DNA replication proteins is coincident with cell cycle control of DNA replication in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 1997 ; 179 : 2319–2330.
- Sheridan GEC, Masters CI, Shallcross JA, Mackey BM. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998 ; 64 : 1313–1318.
- Starliper CE. Bacterial coldwater disease of fish caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Advanced. Res.* 2011 ; 2 : 97–108.
- Strepparava N, Wahli T, Segner H, Petrini O. Detection and quantification of *Flavobacterium psychrophilum* water and fish tissue samples by quantitative real time PCR. *BMC Microbiol.* 2014 ; 14 : 105.
- Suzuki K, Sakai DK. Real-time PCR for quantification of viable *Renibacterium salmoninarum* in chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Dis. Aquat. Org.* 2007 ; 74 : 209–223.
- Takahashi M. Status of hatchery production of chum salmon population in Japan. *Bull. Fish. Res. Agen.* 2015 ; 39 : 49–84.
- Takehara M, Saimura M, Inaba H, Hirohara H. Poly( $\gamma$ -diaminobutanoic acid), a novel poly(amino acid), coproduced with poly ( $\epsilon$ -L-lysine) by two strains of *Streptomyces celluloflavus*. *FEMS Microbiol. Letters* 2008 ; 286 : 110–117.
- Tani K, Kobayashi T, Sakotani A, Kenzaka T, Nasu M. Expression of the *gyrB* gene as an indicator of growth activity of *Escherichia coli*. *J. Environ. Biotech.* 2012 ; 12 : 33–38.
- Taylor PW. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in eggs and sexual fluids of Pacific salmonids by a polymerase chain reaction assay: implications for vertical transmission of bacterial coldwater disease. *J. Aquat. Anim. Health* 2004 ; 16 : 104–108.
- Tirola M, Valtonen ET, Rintamäki-Kinnunen P, Kulomaa MS. Diagnosis of flavobacteriosis by direct amplification of rRNA genes. *Dis. Aquat. Org.* 2002 ; 51 : 93–100.
- Turnbull JF. Bacterial gill disease and fin rot. In “Bacterial diseases of fish” (ed. by Inglis V, Robert RJ, Bromage NR). Blackwell Scientific Publications, Oxford 1993 ; pp. 40–57.
- Urdaci MC, Chakroun C, Faure D, Bernardet JF. Development of a polymerase chain reaction for identification and detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Res. Microbiol.* 1998 ; 149 : 519–530.
- Wakabayashi H, Egusa S. Characteristics of myxobacteria associated with some freshwater fish diseases in Japan.

- Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 1974 ; 13 : 751–757.
- Wakabayashi H, Huh GJ, Kimura N. *Flavobacterium branchiophilum* sp. Nov., a causative agent of bacterial gill disease of freshwater fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1989 ; 39 : 213–216.
- Wakabayashi H, Horiuchi M, Bunya T, Hoshiai G. Outbreaks of coldwater disease in coho salmon in Japan. *Fish Pathol.* 1991 ; 26 : 211–212.
- Wakabayashi H, Toyama T, Iida T. A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. *Fish Pathol.* 1994 ; 29 : 101–104.
- Wakabayashi H. Bacterial gill disease: BGD. In “Infectious and parasitic diseases of fish and shellfish” (ed. by Wakabayashi H and Muroga K). Kouseisha Kouseikaku, Tokyo 2004 ; pp. 169–173.
- Wiklund T, Madsen L, Bruun MS, Dalsgaard I. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish tissue and water samples by PCR amplification. *J. Appl. Microbiol.* 2000 ; 88 : 299–307.
- Wu AK, Kropinski AM, Lumsden JS, Dixon B, MacInnes JI. Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* ATCC 49418<sup>T</sup>. *Stand. Genomic Sci.* 2015 ; 10 : 3.



## サケ稚魚の魚体中トリグリセリド含量と肝臓中グリコーゲン含量の栄養状態評価指標としての有効性

虎尾 充\*

北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場

Validity of fish triglyceride content and liver glycogen content as indicators of nutritional status in chum salmon *Oncorhynchus keta* fry

MITSURU TORAO\*

Salmon and Freshwater Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization,  
Eniwa, Hokkaido, 061-1433, Japan

Changes in triglyceride (TG) and phospholipid (PL) content in fish body, and glycogen (GC) content in liver of chum salmon *Oncorhynchus keta* fry during fasting and refeeding treatments were examined for their validity as nutritional status indicators. TG content and TG/PL ratio linearly increased or decreased in relation to fasting and refeeding days. On the other hand, GC content reacted more rapidly. The change in PL content was small and decreased relative to fed controls after 20 days. Fasting until the third day results in GC consumption, followed by TG consumption. After the 20th day of fasting, lipids are almost all consumed, and energy may have been obtained by digestion of body tissues. These results suggest that the TG content in the fish body is suitable for evaluating the nutritional status of salmon fry after release.

キーワード：グリコーゲン含量，再給餌，サケ稚魚，脂質含量，絶食

サケ *Oncorhynchus keta* は一回繁殖性の遡河回遊魚で、太平洋に生息するサケ属魚類の中では最も分布範囲が広い種である (Salo, 1991)。日本では北海道・東北の沿岸を中心に漁獲され、北日本における最重要漁業資源の1つである。北海道におけるサケの来遊数 (沿岸漁獲数と河川捕獲数の合計) は1970年代半ばから飛躍的に増加し、1990年代から2000年代までは高い資源水準を維持していた (Miyakoshi *et al.*, 2013)。日本では積極的に人工孵化放流が行われており、サケ資源の多くは 孵化放流によって造成されている (小林, 2009; Nagata *et al.*, 2012; Miyakoshi *et al.*, 2013; Kitada, 2014)。北海道におけるサケ資源の増大は、北太平洋の生息環境がサケにとって好適であったことに加え、給餌飼育や適期放流の実践など 孵化放流技術の向上が寄与したと考えられている (Beamish and Bouillon, 1993; Kaeriyama, 1998; 小林, 2009; 関, 2013)。北太平洋全体でみるとサケ資源は比較的安定した高水準が続いている (Irvine *et al.*, 2018) が、

近年、北海道では放流数に大きく変化はないにもかかわらず、来遊資源が減少傾向にあり (Miyakoshi *et al.*, 2013)、早急な資源変動要因の解明と対策が求められている。

サケの孵化放流魚の生残率を高めるためには、健康な稚魚を環境が良好な時期に放流する「健苗育成・適期放流」が重要であり (関, 2013)、そのため、種苗性評価の指標として、肥満度・海水適応力・遊泳能力・ATP量・栄養状態等について有効性が検討されてきた (関, 2013)。成長や栄養状態が悪い個体では海水適応能が低くなる傾向があることが知られる (橋本1979; 1982)。また、最近、汽水域でサケ稚魚の成長率が低下している現象が指摘され (Kaneko *et al.* 2015)、実験条件下では淡水飼育時の絶食が海水移行後の成長率低下につながる可能性が示唆されている (Nakamura *et al.*, 2019)。放流されたサケ稚魚は10日間程度の短期間で河川を 降下し河口域に達する (小林・石川, 1964; 眞山ら, 1983; 虎

尾ら, 2010; Hasegawa and Takahashi, 2013) が, 長距離河川を降下するサケ稚魚の中には1ヶ月程度河川に滞在する個体もあり (Kasugai *et al.*, 2013), 降河中に栄養状態が低下する個体もみられる (水野・三坂, 未発表)。これらのことから, 放流後の河川内でのサケ稚魚の栄養状態の把握は, その後の沿岸域での生き残りへの影響評価も含めて注目される。

魚類仔稚魚の栄養状態は生残と関連する重要な要因である。そのため, 形態学的・組織学的手法 (Theilacker, 1978; 1986) や, RNA/DNA比, 脂質含量などの体成分分析 (例えば, Foley *et al.*, 2016; Zenitani, 1995), 血液性状 (Congleton and Wagner, 2006) など, 様々な手法で栄養状態評価が試みられてきた。サケ稚魚でも絶食に伴う魚体中の脂質含量やタンパク質含量の変化が調べられ (Akiyama and Nose, 1980; 秋山ら, 1983), 栄養状態の評価が試みられている。魚類にとって脂質は主要なエネルギー源として消費されるほか, 残りは貯蔵脂質あるいは組織脂質として魚体内に蓄積される (会田・潮, 2013)。脂質の中でも中性脂質は主に肝臓・体脂肪組織・筋組織に蓄積され, 貯蔵脂質として利用される。主要な中性脂質であるトリグリセリド (以下, TG) は, サケの貯蔵エネルギーとしても重要であることがわかっている (Azuma *et al.*, 1998; Nomura *et al.*, 2000)。一方, 生体膜などの組織脂質の主成分としてはリン脂質 (以下, PL) があり, 摂餌状態などに左右されにくいとされる (会田・潮, 2013) ことから, TG/PL比を栄養状態の指標とすることもある。また, 一般に魚類では, 糖利用能は脂質やタンパク質に比べて低いとされるが, 炭水化物の分解物であるグルコースはエネルギー源として使用されるとともに, 一部は筋肉や肝臓にグリコーゲン (以下, GC) として貯蔵される (会田・潮, 2013)。貯蔵されたGCは, 脂質やタンパク質よりも先にエネルギー源として使用される (会田・潮, 2013) ことから, 短期的な栄養状態の指標となりうる。サクラマス幼魚ではこれらの肝臓中TG含量とGC含量を指標とした栄養状態評価が行われているが (三坂ら, 2004), サケ稚魚では, どの程度であれば飢餓状態にあるのかなど, 栄養状態の指標としての判定基準は明確ではない。

本研究では, 淡水飼育中のサケ稚魚で絶食と再給餌試験を行い, 魚体中TG含量とPL含量, 肝臓中GC含量の変化を明らかにし, 栄養状態指標としての有効性を検討した。

## 試料及び方法

### 絶食試験

**1.供試魚および飼育** 試験には, 実験室で飼育したサケ稚魚を用いた。2017年10月30日に千歳川で採卵されたサケ受精卵を, 同年12月に北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場の立体式孵化器に収容した。2018年3月1日に, 浮上した稚魚をアトキンス式飼育水槽 (幅35 cm×高さ35 cm×長さ3.5 m) に収容し飼育用水を掛け流しで飼育した。給餌は, 市販のサケ用配合飼料 (EXます1号および2号, 日本農産) を給餌率3%で与えた。

稚魚が体重約0.8 gに成長した2018年4月12日に絶食群と給餌群の比較試験を開始した。アトキンス式水槽に稚魚を約400尾ずつ分収し, 一方は継続して給餌率3%で飼育し (給餌群), 他方は給餌を止め絶食群として2018年5月18日までの36日間飼育した。試験期間中の水温は, 8.3~9.1℃であった。絶食・給餌比較試験期間中に死亡魚が出現した場合は計数して取り上げ, 生残率を求めた。

**2.試料の採取** 絶食・給餌比較試験の開始1日後から7日後までは毎日, その後は, 10日後, 20日後, 30日後に, 給餌群と絶食群からそれぞれ12尾の稚魚をサンプリングした。サンプリングした稚魚は, 麻酔後に尾叉長 (FL, mm) と体重 (BW, g) を測定し, 肥満度 (K) を次式で求めた。

$$K = BW \times 100 / (FL/10)^3$$

測定後, 稚魚は体成分の分析まで-80℃で凍結保存した。

### 再給餌試験

**1.供試魚および飼育** 2018年9月15日に千歳川で採卵されたサケ受精卵をさけます・内水面水産試験場の立体式孵化器に収容した。2018年12月27日に浮上した稚魚をアトキンス式飼育水槽に収容し, 配合飼料を給餌率3%で与えた。稚魚の体重がおおよそ1gに成長した2019年3月14日から3月29日までの15日間絶食させ, その後3月16日から配合飼料の給餌を再開し, 再給餌開始後20日目の4月19日まで飼育した。飼育用水は掛け流しとし, 飼育期間中の水温は 7.5~8.3℃であった。

**2.試料の採取** 絶食開始前および絶食15日目にサケ稚魚のサンプリングを行った。また, 再給餌後3, 5, 7, 10, 15, および20日目にもサンプリングを行い, 絶食試験と同様に魚体測定を行い, 分析まで凍結保存した。

### 体成分分析

栄養状態の指標として, 魚体中のTGとPL含量, 肝臓中のGC含量の定量を行った。TGとPL, GC含量は, 三坂ら (2004) および清水ら (2016) を参考に以下の方法

で測定した。

凍結保存しておいたサケ稚魚を保冷材上で解凍したのち、頭部と尾柄部をメスで切除し消化管も除去した。肝臓は重量を測定したのち、GC含量の測定に用いた。頭部と尾柄部除去後の魚体重量を測定した後にTGおよびPL含量の測定に用いた。エタノールとジエチルエーテルを3:1(体積比)で混合した溶液10 mL中に0.3~0.7 gの魚体を入れ、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズした。これを4℃、2,500 rpm(約1,300×g)で20分間遠心分離した。得られた上澄み100 μLを試験管に取り、TG量はGPO・DAOS法に基づく測定キットであるトリグリセライドE-テストワコー、PL量はコリンオキシダーゼ・DAOS法に基づく測定キットであるリン脂質C-テストワコー(いずれも和光純薬製)の発色試薬2 mLをそれぞれ加えて呈色させ、分光光度計で600 nmの吸光度を測定して定量した。TG量とPL量は、魚体中の含有率(%)で示した。また、リン脂質含量に対するトリグリセリド含量の比(TG/PL比)も求めた。

GC含量は、重量を測定した肝臓(10~300 mg)を1.5 mLの30%水酸化カリウム溶液中で加熱分解した後、8

mLの99.5%エタノールを加えてよく攪拌した。20分間氷冷後、2,500 rpmで20分間冷却遠心した。上澄みを捨て、蒸留水1 mLを加えて沈殿を破碎しエタノール5 mLを加えて20分間氷冷した。20分間冷却遠心分離し、グリコーゲンを沈殿させた。沈殿物に蒸留水1 mLと2 N 塩酸50 μLを加え中和したのち、2 Nの硫酸1 mLを加えた。これを沸騰水中で2時間煮沸してグリコーゲンをグルコースに分解し、20分間の氷冷後に、20分間冷却遠心したのち、その上澄みを分析に用いた。上澄み300 μLを試験管に取り、ムタローゼ-GOD法に基づく測定キットであるグルコースC-IIテストワコー(和光純薬製)の発色試薬2 mLを加えて呈色させ、分光光度計で505 nmの吸光度を測定して濃度を求めた。GC含量は肝臓中の含有率(%)で示した。

絶食試験におけるTG含量、PL含量、TG/PL比およびGC含量について、対照群と絶食群の統計検定をマンホイットニー検定で行った。

## 結 果

### 絶食試験

Fig.1とTable1に 飼育期間中のサケ稚魚の体サイズの変化を示した。試験開始時のサケ稚魚の体サイズは、平均尾叉長 $47.4 \pm 4.1$  mm, 平均体重 $0.81 \pm 0.21$  gで、肥満度は $7.44 \pm 0.45$ であった。給餌群は試験開始30日後、平均尾叉長 $62.9 \pm 4.5$  mm, 体重 $1.85 \pm 0.34$  gまで成長し、肥満度は $7.35 \pm 0.28$ であった。一方、絶食群の30日後の体サイズは、平均尾叉長 $47.9 \pm 2.8$  mmで試験開始時からほとんど変化せず、平均体重は $0.61 \pm 0.14$  gへと減少した。肥満度も $5.51 \pm 0.59$ へと低下した。

給餌群では試験期間中に死亡した稚魚は出現しなかった。一方、絶食群では絶食開始21日後からへい死が出現し、絶食後25日目以降に斃死魚が増加した。絶食群の試験終了時の生存率は70.8%であった(Fig.2)。

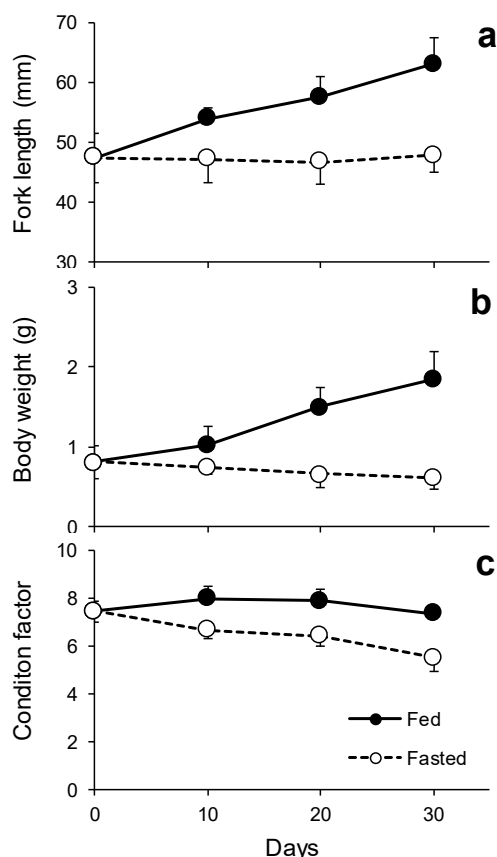


Fig.1 Changes in fork length, body weight, and condition factor of fed (solid circle) and fasted (open circle) chum salmon fry. All parameters are mean  $\pm$  standard deviations (n=10).

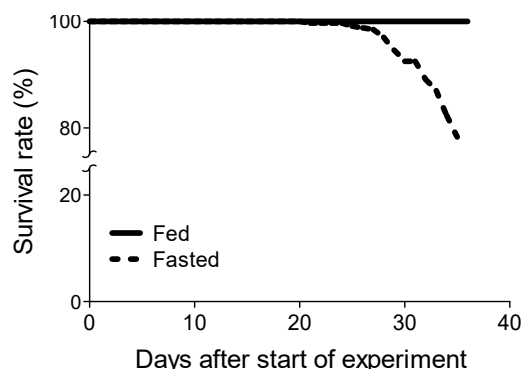


Fig.2 Survival rates of fed and fasted chum salmon fry during the experiment.

Table 1 Mean ( $\pm$  SD) fork length (mm), body weight (g), condition factor, triglyceride and phospholipid contents in the fish body, and glycogen contents in the liver during fed and fasted treatments of chum salmon fry. Bold italics indicate Mann-Whitney statistical significance ( $p < 0.05$ ).

| Fed group          |              |                       |                      |                       |                                   |                                   |                                   |                                   |
|--------------------|--------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Date of experiment | Sampling day | Mean fork length (mm) | Mean body weight (g) | Mean condition factor | Nutritional condition indicators  |                                   |                                   |                                   |
|                    |              |                       |                      |                       | Triglyceride content (%)          | Phospholipid content (%)          | TG/PL ratio                       | Glycogen content (%)              |
| Apr. 12, 2018      | 0            | 47.4 $\pm$ 3.85       | 0.81 $\pm$ 0.21      | 7.44 $\pm$ 0.45       | 1.87 $\pm$ 0.34                   | 0.78 $\pm$ 0.04                   | 2.40 $\pm$ 0.44                   | 3.54 $\pm$ 1.65                   |
| Apr. 13, 2018      | 1            | 47.8 $\pm$ 3.18       | 0.92 $\pm$ 0.20      | 8.30 $\pm$ 1.02       | 1.81 $\pm$ 0.45                   | 0.78 $\pm$ 0.08                   | 2.34 $\pm$ 0.60                   | 3.09 $\pm$ 0.79                   |
| Apr. 14, 2018      | 2            | 48.4 $\pm$ 2.24       | 0.91 $\pm$ 0.11      | 7.99 $\pm$ 0.35       | 1.79 $\pm$ 0.64                   | 0.85 $\pm$ 0.21                   | 2.10 $\pm$ 0.50                   | 3.99 $\pm$ 1.03                   |
| Apr. 15, 2018      | 3            | 47.0 $\pm$ 3.07       | 0.84 $\pm$ 0.17      | 7.98 $\pm$ 0.34       | 1.65 $\pm$ 0.46                   | 0.76 $\pm$ 0.05                   | 2.18 $\pm$ 0.61                   | <b>4.50 <math>\pm</math> 0.89</b> |
| Apr. 16, 2018      | 4            | 49.2 $\pm$ 2.43       | 0.96 $\pm$ 0.14      | 8.02 $\pm$ 0.66       | 1.61 $\pm$ 0.30                   | 0.81 $\pm$ 0.10                   | 1.99 $\pm$ 0.37                   | <b>6.27 <math>\pm</math> 0.91</b> |
| Apr. 17, 2018      | 5            | 49.0 $\pm$ 3.02       | 0.97 $\pm$ 0.19      | 8.15 $\pm$ 0.63       | <b>1.95 <math>\pm</math> 0.28</b> | 0.79 $\pm$ 0.11                   | <b>2.51 <math>\pm</math> 0.49</b> | <b>5.38 <math>\pm</math> 1.34</b> |
| Apr. 18, 2018      | 6            | 49.3 $\pm$ 2.71       | 0.95 $\pm$ 0.16      | 7.91 $\pm$ 0.59       | 1.47 $\pm$ 0.24                   | 0.80 $\pm$ 0.05                   | 1.85 $\pm$ 0.32                   | <b>5.97 <math>\pm</math> 1.05</b> |
| Apr. 19, 2018      | 7            | 49.8 $\pm$ 1.29       | 0.98 $\pm$ 0.09      | 7.90 $\pm$ 0.27       | 1.84 $\pm$ 0.33                   | 0.80 $\pm$ 0.04                   | 2.29 $\pm$ 0.42                   | <b>5.19 <math>\pm</math> 0.91</b> |
| Apr. 22, 2018      | 10           | 50.3 $\pm$ 3.32       | 1.03 $\pm$ 0.22      | 7.99 $\pm$ 0.50       | <b>1.53 <math>\pm</math> 0.64</b> | 0.82 $\pm$ 0.04                   | <b>1.87 <math>\pm</math> 0.82</b> | <b>5.62 <math>\pm</math> 1.12</b> |
| May 2, 2018        | 20           | 57.5 $\pm$ 3.22       | 1.50 $\pm$ 0.24      | 7.89 $\pm$ 0.48       | <b>2.22 <math>\pm</math> 0.21</b> | <b>0.75 <math>\pm</math> 0.05</b> | <b>2.96 <math>\pm</math> 0.28</b> | <b>5.24 <math>\pm</math> 1.18</b> |
| May 12, 2018       | 30           | 62.9 $\pm$ 4.26       | 1.85 $\pm$ 0.34      | 7.35 $\pm$ 0.28       | <b>2.26 <math>\pm</math> 0.21</b> | <b>0.81 <math>\pm</math> 0.06</b> | <b>2.79 <math>\pm</math> 0.34</b> | <b>3.82 <math>\pm</math> 1.02</b> |

| Fasted group       |              |                       |                      |                       |                                   |                                   |                                   |                                   |
|--------------------|--------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Date of experiment | Sampling day | Mean fork length (mm) | Mean body weight (g) | Mean condition factor | Nutritional condition indicators  |                                   |                                   |                                   |
|                    |              |                       |                      |                       | Triglyceride content (%)          | Phospholipid content (%)          | TG/PL ratio                       | Glycogen content (%)              |
| Apr. 13, 2018      | 1            | 47.5 $\pm$ 2.6        | 0.80 $\pm$ 0.16      | 7.36 $\pm$ 0.41       | 1.70 $\pm$ 0.55                   | 0.79 $\pm$ 0.03                   | 2.14 $\pm$ 0.65                   | 1.22 $\pm$ 1.24                   |
| Apr. 14, 2018      | 2            | 47.9 $\pm$ 2.1        | 0.83 $\pm$ 0.11      | 7.52 $\pm$ 0.36       | 1.71 $\pm$ 0.41                   | 0.84 $\pm$ 0.08                   | 2.05 $\pm$ 0.50                   | 1.19 $\pm$ 1.35                   |
| Apr. 15, 2018      | 3            | 49.0 $\pm$ 1.9        | 0.87 $\pm$ 0.11      | 7.31 $\pm$ 0.38       | 1.74 $\pm$ 0.36                   | 0.77 $\pm$ 0.04                   | 2.25 $\pm$ 0.44                   | <b>0.85 <math>\pm</math> 0.65</b> |
| Apr. 16, 2018      | 4            | 46.1 $\pm$ 1.2        | 0.70 $\pm$ 0.05      | 7.11 $\pm$ 0.35       | 1.39 $\pm$ 0.39                   | 0.85 $\pm$ 0.05                   | 1.65 $\pm$ 0.48                   | <b>0.16 <math>\pm</math> 0.11</b> |
| Apr. 17, 2018      | 5            | 46.8 $\pm$ 2.0        | 0.76 $\pm$ 0.13      | 7.36 $\pm$ 0.58       | <b>1.22 <math>\pm</math> 0.40</b> | 0.78 $\pm$ 0.07                   | <b>1.61 <math>\pm</math> 0.59</b> | <b>0.15 <math>\pm</math> 0.10</b> |
| Apr. 18, 2018      | 6            | 47.5 $\pm$ 2.7        | 0.79 $\pm$ 0.14      | 7.28 $\pm$ 0.38       | 1.38 $\pm$ 0.29                   | 0.89 $\pm$ 0.08                   | 1.56 $\pm$ 0.32                   | <b>0.13 <math>\pm</math> 0.06</b> |
| Apr. 19, 2018      | 7            | 46.1 $\pm$ 3.0        | 0.70 $\pm$ 0.15      | 7.05 $\pm$ 0.61       | 1.39 $\pm$ 0.96                   | 0.76 $\pm$ 0.04                   | 1.84 $\pm$ 1.28                   | <b>0.05 <math>\pm</math> 0.07</b> |
| Apr. 22, 2018      | 10           | 48.0 $\pm$ 1.5        | 0.74 $\pm$ 0.09      | 6.68 $\pm$ 0.34       | <b>1.15 <math>\pm</math> 0.59</b> | 0.80 $\pm$ 0.04                   | <b>1.45 <math>\pm</math> 0.74</b> | <b>0.03 <math>\pm</math> 0.02</b> |
| May 2, 2018        | 20           | 46.6 $\pm$ 3.6        | 0.67 $\pm$ 0.17      | 6.41 $\pm$ 0.43       | <b>0.68 <math>\pm</math> 0.41</b> | <b>0.66 <math>\pm</math> 0.04</b> | <b>1.04 <math>\pm</math> 0.63</b> | <b>0.09 <math>\pm</math> 0.04</b> |
| May 12, 2018       | 30           | 47.8 $\pm$ 2.7        | 0.61 $\pm$ 0.14      | 5.51 $\pm$ 0.59       | <b>0.10 <math>\pm</math> 0.07</b> | <b>0.68 <math>\pm</math> 0.05</b> | <b>0.15 <math>\pm</math> 0.11</b> | <b>0.11 <math>\pm</math> 0.08</b> |

飼育期間中の尾叉長、体重、肥満度、TG含量、PL含量、TG/PL比、GC含量の変化をTable 1に示した。PL含量は、給餌群、絶食群ともに0.7~0.9%で変動は小さかったが、絶食20日目と30日目には、給餌群に対して絶食群でPL含量の有意な低下が認められた。

給餌群のTG含量は、試験開始時の1.9 %から変動しつつ増加傾向を示し、30日後には2.3 %となった。一方、絶食群のTG含量は、絶食日数の経過とともに減少し、試験開始10日後には1.2 %、20日後には0.7 %、30日後には0.1 %となった。TG/PL比は、試験開始時に2.4で、給餌群では増加傾向がみられ、1.8~3.0の範囲にあった。絶食群では絶食日数とともにTG/PL比は低下し、10日後には1.5、20日後には1.0、30日後には0.2を下回った。絶食群の魚体中TG含量およびTG/PL比は、絶食日数とともに直線的に減少した (Fig.3)。

肝臓中GC含量は試験開始時には3.5  $\pm$  1.7 %であった。給餌群のGC含量は試験開始後4日目まで上昇し、4~6 %で推移した。一方、絶食群のGC含量は絶食1日後に1.2%、3日後に0.85%に減少し、4日目には0.16%と急激に減少し、それ以降は0.05~0.09%と極めて低い値で推移した

(Table 1, Fig.3)。対照群に対して絶食群の肝臓中GC含量は、絶食3日目以降、有意に低い値を示した。

#### 再給餌試験

1. 飼育期間中のサケ稚魚の体サイズの変化 15日間の絶食期間中には体長の変化よりも体重の減少が顕著に見られ、平均体重は1.07  $\pm$  0.16 gから0.90  $\pm$  0.14 gまで減少した (Table 2)。これに伴い、肥満度も7.41  $\pm$  0.37から6.42  $\pm$  0.37へと低下した。再給餌後は体重、肥満度とも回復する傾向が見られ、再給餌20日目には体重1.18  $\pm$  0.23 g、肥満度は7.80  $\pm$  0.57となった。

2. トリグリセライド、リン脂質、TG/PL比の変化 絶食開始前のサケ稚魚のTG含量は1.08  $\pm$  0.36 %で、その後、15日間の絶食によって0.23  $\pm$  0.14 %まで低下した (Table 2, Fig.4)。再給餌3日目のTG含量は0.20  $\pm$  0.23 %で回復はみられず、再給餌5日目に0.60  $\pm$  0.17 %となりTG含量の増加が見られた。その後、TG含量は緩やかに増加し、再給餌20日目には1.18  $\pm$  0.26 %となった。魚体中のTG含量は、再給餌によって直線的な増加が認められた。PL含量はTG含量に比べて変動は小さく、絶



食開始前のPL含量は $0.87 \pm 0.03$  %, 絶食15日後には $0.78 \pm 0.03$  %となった。再給餌開始後は、10日目まで $0.79 \sim 0.84$  %で変化は小さく、再給餌15日目以降に絶食前の含量と同程度の $0.94$  %となった。TG/PL比は、PL含量の変動が小さいため、TG含量の変化と同様の変化を示し、試

験開始時には $1.24 \pm 0.41$  , 絶食15日後には $0.30 \pm 0.18$ と大きく減少した。再給餌開始後は緩やかに直線的に増加し20日目には絶食開始前と同程度の $1.26 \pm 0.30$ となった。

3.グリコーゲン含量の変化 GC含量は、絶食後15日後には $0.04$ %と極めて低い値となった (Table 2, Fig.4)。

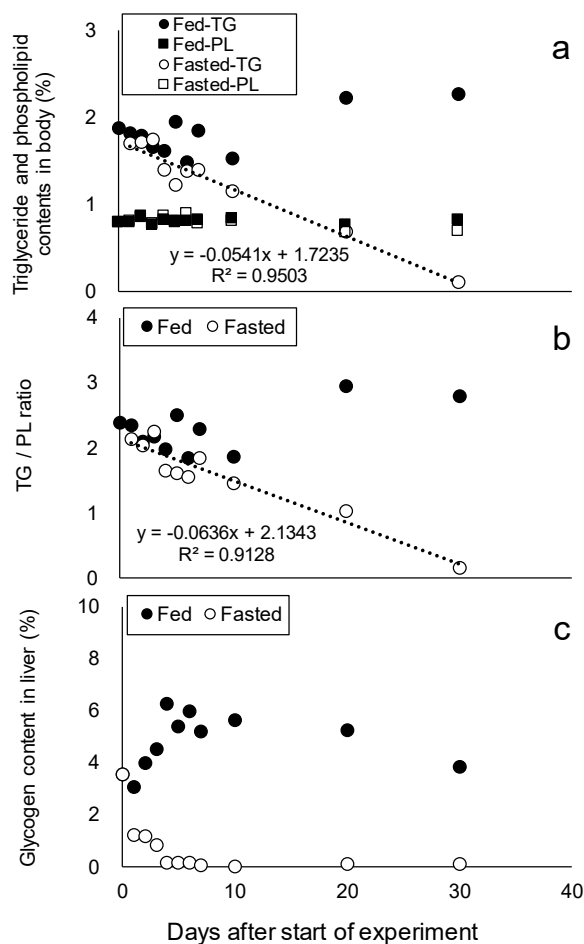


Fig.3 Changes in triglyceride (TG) and phospholipid (PL) contents in fish body (a), TG/PL ratio (b), and glycogen (GC) content in the liver (c). Data points are medians of 10 samples. The line has been fitted by linear regression analysis for TG contents and the TG/PL ratio of the fasted group.

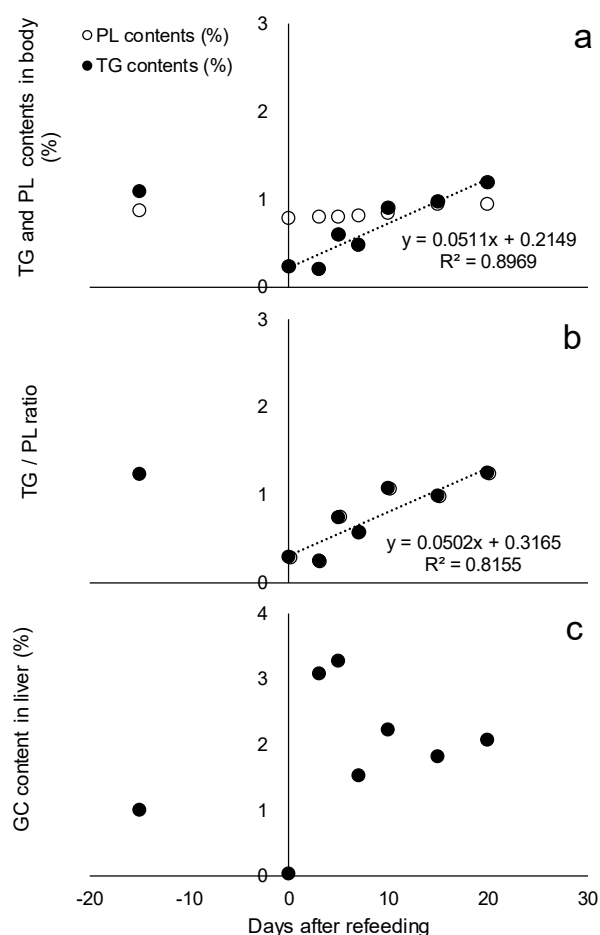


Fig.4 Changes in triglyceride (TG) and phospholipid (PL) contents in fish body (a), TG/PL ratio (b), and glycogen (GC) content in the liver (c) during the re-feeding experiment. Data points are medians of 10 samples, with linear regression analysis for TG contents and TG/PL ratio after being re-fed.

Table 2 Mean ( $\pm$  SD) fork length (mm), body weight (g), condition factor, triglyceride and phospholipid contents in the fish body, and glycogen contents in the liver during fasted and re-fed treatments of chum salmon fry.

| Date of experiment | Sampling            | Mean fork length (mm) | Mean body weight (g) | Mean condition factor | Nutritional condition indicators |                          |                 |                      |
|--------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------------|-----------------|----------------------|
|                    |                     |                       |                      |                       | Triglyceride content (%)         | Phospholipid content (%) | TG/PL ratio     | Glycogen content (%) |
| Mar. 14, 2019      | initial             | $52.4 \pm 2.53$       | $1.07 \pm 0.16$      | $7.41 \pm 0.37$       | $1.08 \pm 0.36$                  | $0.87 \pm 0.03$          | $1.24 \pm 0.41$ | $1.02 \pm 0.69$      |
| Mar. 29, 2019      | Fasted for 15 days  | $51.8 \pm 2.70$       | $0.90 \pm 0.14$      | $6.42 \pm 0.37$       | $0.23 \pm 0.14$                  | $0.78 \pm 0.03$          | $0.30 \pm 0.18$ | $0.04 \pm 0.03$      |
| Apr. 2, 2019       | Day 3 of refeeding  | $50.1 \pm 3.40$       | $0.93 \pm 0.21$      | $7.33 \pm 0.52$       | $0.20 \pm 0.23$                  | $0.79 \pm 0.08$          | $0.25 \pm 0.26$ | $3.09 \pm 0.55$      |
| Apr. 4, 2019       | Day 5 of refeeding  | $51.6 \pm 2.82$       | $0.97 \pm 0.19$      | $7.01 \pm 0.52$       | $0.60 \pm 0.17$                  | $0.80 \pm 0.05$          | $0.76 \pm 0.22$ | $3.29 \pm 0.79$      |
| Apr. 6, 2019       | Day 7 of refeeding  | $50.3 \pm 3.37$       | $0.89 \pm 0.20$      | $6.91 \pm 0.55$       | $0.48 \pm 0.23$                  | $0.81 \pm 0.05$          | $0.58 \pm 0.27$ | $1.54 \pm 0.72$      |
| Apr. 9, 2019       | Day 10 of refeeding | $51.8 \pm 3.50$       | $1.04 \pm 0.22$      | $7.39 \pm 0.62$       | $0.90 \pm 0.21$                  | $0.84 \pm 0.04$          | $1.08 \pm 0.25$ | $2.24 \pm 0.45$      |
| Apr. 14, 2019      | Day 15 of refeeding | $51.5 \pm 3.45$       | $1.03 \pm 0.20$      | $7.47 \pm 0.56$       | $0.97 \pm 0.43$                  | $0.94 \pm 0.23$          | $1.00 \pm 0.27$ | $1.83 \pm 0.43$      |
| Apr. 19, 2019      | Day 20 of refeeding | $53.1 \pm 3.29$       | $1.18 \pm 0.23$      | $7.80 \pm 0.57$       | $1.18 \pm 0.26$                  | $0.95 \pm 0.05$          | $1.26 \pm 0.30$ | $2.09 \pm 0.57$      |



その後、再給餌を行うと、3日目には3.1 %、絶食5日目には3.3 %と急激に増加した。その後7日目には1.5 %に減少し、その後は再給餌10日目に2.2 %、15日目に1.8 %、20日目2.1 %と比較的安定して推移した。

## 考 察

サケ稚魚では、絶食に伴って魚体中TG含量と肝臓中GC含量が減少することが示された。また、絶食後の再給餌によって、これらが増加することも確認された。魚体中TG含量と肝臓中GC含量はいずれも、絶食および再給餌に対応して増減したが、その反応性には違いが見られた。TG含量が比較的緩やかに減少・増加するのに対して、GC含量は絶食1日目から急激に減少し (Fig. 3c)、再給餌でも急激に増加し再給餌3日目には肝臓にGCとして蓄積されていた。さらに、再給餌3日目と5日目の肝臓中GC含量 (平均3%) は、絶食前のGC含量 (平均1%) より高く (Fig. 4c)、その後7日目以降は2%前後で安定したが、絶食前よりも高い含量で推移した。これは、サケ稚魚では長期間の絶食を経験すると、摂餌を再開した際に栄養を蓄積するような反応が働いた可能性がある。同様の現象は、淡水飼育時に比較的短期間 (5日間) の絶食を経験させたサケ稚魚を低水温で海水移行させた場合にも観察されており (Nakamura *et al.*, 2019)、一時的に成長よりも栄養蓄積にエネルギーを配分する反応が生じていると考えられる。一方、魚体中PL含量の変化は、TG含量やGC含量に比べて非常に小さかった。リン脂質は生体膜を構成する組織脂質の成分であり (会田・潮, 2013)、栄養状態によって変化しにくいとされる。この性質を利用して、TG/PL比を仔稚魚の栄養状態の指標とした研究もある (Zenitani, 1995)。本研究でも、絶食によってTG含量は速やかに減少し、絶食5日目には給餌群に対して有意に低い値となった (Fig. 3a, Table 1)。対して、PL含量は0.8%程度で安定し、給餌群に対して有意な低下が見られたのは絶食後20日目以降であった。伴ら (1996) は、サケの絶食と再給餌にともなう血清中タンパク質量と総脂質量、組織切片による肝臓中グリコーゲン細胞数の変化から、サケ稚魚が飢餓に至る過程には2つの段階があることを示唆した。第一段階 (絶食開始から10 日目) では脂質を中心に蓄積していた栄養が消費され、第二段階 (絶食10 日目から20 日目) では蓄積していた栄養が消費し尽くされ、栄養源を筋肉等の体組織に転換するとしている。本研究で絶食20日目以降にPL含量が低下したのは、蓄積栄養がほぼ消費されてしまい栄養源が体組織の分解に切り替わったことを示唆しているかも知れない。本研究から想定されるサケ稚魚の

飢餓に至る過程は次のようなものと考えられる。絶食3日目まで肝臓中GCが主に消費され、その後、絶食5日目以降に貯蔵脂質であるTGの消費も急激に進む。魚体中TG含量が1%を下回る絶食20日目以降は、組織脂肪であるPL含量の減少が見られることから、蓄積栄養が不足し体組織の分解によってエネルギーを得る段階に移行したと想定される。この段階にいたると、死亡する個体も出現しはじめ (Fig. 2)、生体維持が困難な状態になる個体も出現するものと考えられる。このような飢餓から死亡に至る過程は、伴ら (1996) の示した過程とおおむね一致する。

サケ稚魚の魚体中TG含量と肝臓中GC含量の栄養状態指標としての有効性を検討すると、魚体中TG含量がより適していると考えられる。肝臓中GC含量は絶食によって数日単位の短期間で0.1%以下の極めて低い水準まで減少した。また、肝臓中GC含量がこの水準まで下がっても、直接的に死亡につながるものではなかった。他のサケ属魚類でもGCが短期間の絶食で減少することが報告されている (Sheridan and Mommsen, 1991) 他、河川で採集した野生サケ稚魚の肝臓中GCの含量も飼育中のサケ稚魚に比べて低く、飼育魚も河川放流後は野生魚の水準以下まで減少する (清水ら, 2015)。そのため、河川内に比較的長期に滞在する放流魚の栄養状態の評価は難しいと考えられる。一方、魚体中TG含量は絶食期間中に肝臓中GCに比べ緩やかに減少し、絶食日数とTG含量には負の相関が認められた (Fig. 3a)。また野外調査の結果では、魚体中TG含量は放流前の飼育稚魚が1.2%で、その後河川で採集された野生魚、放流魚とも同程度の0.9%程度であった (清水ら, 2015)。コイの絶食に伴う生理的变化を調べた結果では、初めにGCが消費され、GC枯渇後はエネルギー源として脂質、ついで体タンパク質が消費される (Shimeno *et al.*, 1990)。体タンパクが消費される段階は、伴ら (1996) の第2段階に相当し、体内の恒常性が乱れ環境に対する抵抗性にも影響が現れる段階である。したがって、栄養状態の評価をする場合には、魚体中の脂質含量の蓄積を把握することが重要と考えられ、放流後のサケ稚魚の栄養状態の評価は、魚体中TG含量によって行うのが適当である。なお、サケ稚魚においても、栄養状態の指標としてTG/PL比はTG含量と同様に有効と考えられるが、絶食日数とTG含量、TG/PL比の関係をみると (Fig. 3), TG含量もTG/PL比もほとんど違いはない。したがって、TG含量のみで十分評価は可能である。

魚体中のTG含量がどの程度あれば健苗と考えられるのか、サケ稚魚の栄養状態評価の基準を検討すると、魚体中TG含量が0.6%程度あれば十分脂質の蓄積がある状

態であり、0.2%以下だと死亡につながる可能性のある低栄養状態と評価できる。サクラマス稚魚では肝臓中TG含量が飢餓状態の指標となることが示されており、TG含量が0.2%以下になると死亡魚が発生する（三坂ら、2004）。本研究では、絶食によって死亡魚が出現し始めた絶食20日目の平均TG含量が0.7%で、生残率が80%を下回った絶食30日目には平均TG含量は0.1%となっていた。また、再給餌試験においては、15日間絶食後のTG含量は0.2%まで低下していた。これらのことから、サケ稚魚でも魚体中TG含量が0.2%を下回ると飢餓による死亡が生じる水準であると考えられる。また、絶食試験では、魚体中TG含量と絶食日数の関係式（Fig. 3a；TG含量 =  $-0.0541 \times \text{絶食日数} + 1.7235$ ）が得られた。絶食試験中には絶食21日目から死亡魚が出現した。死亡魚が出現する直前の20日目のTG含量を求めると、0.64%となり、魚体中TG含量が0.6%以上あれば、蓄積栄養が十分残されている状態の目安になると考えられる。ただし、GC含量、TG含量ともに個体差が大きい（Table 1）、これ以下の値であったとしても必ずしもすぐに死亡につながるわけではない。千歳川を降河するサケ稚魚を調査した結果では、魚体中TG含量はおおむね0.5%以上であり（清水ら、2016）、飢餓による死亡が生じる水準の0.2%を上回っているが、本研究で十分な蓄積量として示唆された0.6%を下回る個体もいたことになる。これがサケ稚魚の生残にどのように影響するか、今後、野外で採集されるサケ稚魚の脂質含量を調査し、検証する必要がある。

サケでは、海洋生活初期に重要な減耗時期があると考えられている（Healey, 1982；Bax, 1983；Farley *et al.*, 2008）。加えて、サケの生残率の変動の大部分が河川水温と関連した稚魚期の死亡で説明できる（Morita *et al.*, 2015）との報告もあり、降海前の河川生活期における減耗の重要性も指摘されている。サケ放流魚では河川距離や放流時期が河川滞在時間と関係しており、長距離河川では放流時期が早いと長く河川に滞在し、河川滞在時間が長いと河川下流での再捕率が低いとの研究がある（Kasugai *et al.*, 2013）。このことは、河川内での長期間の滞在が減耗につながっている可能性を示唆する。具体的な減耗要因については不明であるが、水温や餌条件、長期間の河川滞在によって栄養状態が低下し、遊泳力や捕食者からの回避能力が低下し減耗につながっている可能性はある。また、実験的には淡水飼育時の絶食が降海後の成長率の低下につながることを示唆されており（Nakamura *et al.*, 2019）、今後、河川内での栄養状態が、汽水域・沿岸域でのサケ稚魚の成長や生残にどのような影響を与えるのかも検証していく必要がある。

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、一般社団法人日本海さけ・ます増殖事業協会から種卵提供のご協力を頂きました。ここに記して厚くお礼申し上げます。

## 引用文献

- 会田勝美, 潮 英樹. 代謝. (会田勝美, 金子豊二編)「増補改訂版魚類生理学の基礎」. 恒星社厚生閣, 2013 : 204-215.
- Akiyama T, Nose T. Changes in body weight, condition factor and body composition of fingerling chum salmon with various sizes during starvation. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture* 1980 ; 1 : 71-78.
- 秋山敏男, 村井武四, 能勢健嗣. 放流シロザケ稚魚の体成分の変化. 養殖研究所研究報告1983 ; 4 : 107-112.
- Azuma T, Yada T, Ueno Y, Iwata M. Biochemical approach to assessing growth characteristics in salmonid, *N. Pac. Anadr. Fish Comm. Bull.* 1998 ; 1 : 103-111.
- 伴 真俊, 長谷川裕康, 江連睦子. 絶食と再給餌がさけ幼魚に与える生理学的影響. 北海道さけ・ますふ化場研究報告 1996 ; 50 : 117-123.
- Bax NJ. Early marine mortality of marked juvenile chum salmon (*Oncorhynchus keta*) released in Hood Canal, Puget Sound, Washington, in 1980. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1983 ; 40 : 426-435.
- Beamish R, Bouillon DR. Pacific salmon production trends in relation to climate. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1993 ; 50 : 1002-1016.
- Congleton JL, Wagner T. Blood-chemistry indicators of nutritional status in juvenile salmonids. *J. Fish Biol.* 2006 ; 69 : 473-490.
- Farley Jr EV, Moss JH, Beamish RJ. A review of the critical size, critical period hypothesis for juvenile Pacific salmon. *N. Pac. Anadr. Fish Comm. Bull.* 2008 ; 4 : 311-317.
- Foley CJ, Bradley DL, Hook TO. A review and assessment of the potential use of RNA:DNA ratios to assess the condition of entrained fish larvae. *Ecological Indicators* 2016 ; 60 : 346-357.
- Hasegawa K, Takahashi S. Microscale environments along the seaward migration route of stocked Chum salmon fry. *Trans. Am. Fish. Soc.* 2013 ; 142 : 1232-1237.
- 橋本 進. 放流サケ稚魚の飼育に関する研究 I. 北海道さけ・ますふ化場研究報告 1979 ; 33 : 25-30.

- 橋本 進. 放流用サケ稚魚の飼育に関する研究Ⅱ. 餌の硬さ, 給餌の熟練度, 回数, 時刻及び用水の不足. 北海道さけ・ますふ化場研究報告 1982 ; 36 : 19-37.
- Healey MC. Timing and relative intensity of size-selective mortality of juvenile chum salmon (*Oncorhynchus keta*) during early sea life. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1982 ; 39 : 952-957.
- Irvine JR, Munro AR, Templin W, Thiess M, Grant S, Neatherlin E. Status Overview for Pacific Salmon Populations in the Eastern North Pacific Ocean. *N. Pac. Anadr. Fish Comm. Tech. Rep.* 2018 ; 11 : 1-7.
- Kaeriyama M. Dynamics of chum salmon, *Oncorhynchus keta*, populations released from Hokkaido, Japan. *N. Pac. Anadr. Fish Comm. Bull.* 1998 ; 1 : 90-102.
- Kaneko N, Taniyama N, Inatani Y, Nagano Y, Fujiwara M, Torao M, Miyakoshi Y, Shimizu M. Circulating insulin-like growth factor I in juvenile chum salmon: relationship with growth rate and changes during downstream and coastal migration in northeastern Hokkaido, Japan. *Fish Physiol. Biochem.* 2015 ; 41 : 991-1003.
- Kasugai K, Torao M, Nagata M, Irvine JR. The relationship between migration speed and release date for chum salmon *Oncorhynchus keta* fry exiting a 110-km northern Japanese river. *Fish. Sci.* 2013 ; 79 : 569-577.
- Kitada S. Japanese chum salmon stock enhancement: current perspective and future challenges. *Fish. Sci.* 2014 ; 80 : 237-249.
- 小林哲夫. 「日本サケ・マス増殖史」北海道大学出版会, 札幌. 2009.
- 小林哲夫, 石川嘉郎. サケ稚魚の生態調査Ⅷ. 千歳川, 石狩川のサケ稚魚の生長と食性について. 北海道さけ・ますふ化場研究報告 1964 ; 18 : 7-15.
- 真山 紘, 関 二郎, 清水幾太郎. 石狩川産サケの生態調査Ⅱ. 1980年及び1981年春放流稚魚の降海移動と沿岸帯での分布回遊. 北海道さけ・ますふ化場研究報告 1983 ; 37 : 1-22.
- 三坂尚行, 水野伸也, 宮腰靖之, 竹内勝巳, 鷹見達也, 笠原 昇. 飢餓中のサクラマス当歳魚の肝臓におけるトリグリセライド含量およびグリコーゲン含量の変動. 日本水産学会誌 2004 ; 70 : 168-174.
- Miyakoshi Y, Nagata M, Kitada S, Kaeriyama M. Historical and current hatchery programs and management of chum salmon in Hokkaido, northern Japan. *Rev. Fish. Sci.* 2013 ; 21 : 469-479.
- Morita K, Nakashima A, Kikuchi M. River temperature drives salmon survivorship: is it determined prior to ocean entry? *R. Soc. open sci.* 2015 ; 2 : 14312.
- Nagata M, Miyakoshi Y, Urabe H, Fujiwara M, Sasaki Y, Kasugai K, Torao M, Ando D and Kaeriyama M. An overview of salmon enhancement and the need to manage and monitor natural spawning in Hokkaido, Japan. *Environ. Biol. Fish.* 2012 ; 92 : 311-323.
- Nakamura S, Kaneko N, Nonaka T, Kurita D, Miyakoshi Y, Shimizu M. Fasting in freshwater severely affects growth of juvenile chum salmon when entering cold seawater. *Fish. Sci.* 2019 ; 85 : 655-665.
- Nomura T, Urawa S, Ueno Y. Variations in muscle lipid content of high-seas chum and pink salmon in winter. *N. Pac. Anadr. Fish Comm. Bull.* 2000 ; 2 : 347-352.
- Salo EO. Life history of chum salmon. In: *Pacific salmon life histories* (Groot C. and Margolis, L. eds.), University of British Columbia Press, Vancouver. 1991 ; 231-309.
- 関 二郎. さけマス類の人工孵化放流に関する技術小史 (放流編). 水産技術 2013 ; 6 : 69-82.
- Sheridan MA, Mommsen TP. Effects of nutritional state on in vivo lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1991 ; 81 : 473-483.
- Shimeno S, Kheyyali D, Takeda M. Metabolic Adaptation to Prolonged Starvation in Carp. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* 1990 ; 56 : 35-41.
- 清水智仁, 伴 真俊, 宮内康行, 梅田勝博, 中尾勝哉, 藤井 真, 真山 紘. 千歳川を降河するふ化場産および野生産サケ稚魚の栄養状態. 水産技術 2016 ; 8 : 89-94.
- Theilacker GH. Effect of starvation on the histological and morphological characteristics of jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, larvae. *Fish. bull.* 1978 ; 76 : 403-413.
- Theilacker GH. Starvation-induced mortality of young sea-caught jack mackerel, *trachurus symmetricus*, determined with histological and morphological methods. *Fish. bull.* 1986 ; 84 : 1-17.
- 虎尾 充, 竹内勝巳, 佐々木義隆, 春日井潔, 村上 豊, 永田光博. 当幌川におけるカラフトマス放流魚と野生魚の降河生態. 北海道立水産孵化場研究報告 2010 ; 64 : 7-15.
- Zenitani H. Analysis of lipid components for determining the nutritional condition of sardine larvae *Sardinops melanostictus*. *Fish. Sci.* 1995 ; 61 : 725-726.



# 人工産卵床に埋設放流したサクラマス卵の稚魚期までの生残率

宮腰靖之<sup>1</sup>, 竹内勝巳<sup>2</sup>, 青山智哉<sup>2</sup>, 永田光博<sup>3</sup>

<sup>1</sup>北海道立総合研究機構水産研究本部

<sup>2</sup>北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場道南支場

<sup>3</sup>元北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場

Egg-to-fry survival of masu salmon planted in artificial spawning redds

YASUYUKI MIYAKOSHI<sup>\*1</sup>, KATSUMI TAKEUCHI<sup>2</sup>, TOMOYA AOYAMA<sup>2</sup> and MITSUHIRO NAGATA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Fisheries Research Department, Hokkaido Research Organization, Yoichi, Hokkaido 046-8555,

<sup>2</sup> Donan Research Branch, Salmon and Freshwater Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, Yakumo, Hokkaido, 043-0402.

<sup>3</sup> Formerly : Salmon and Freshwater Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, Eniwa, Hokkaido 061-1433, Japan

Embryo planting in artificial spawning redds has been examined as a cost-effective means for enhancement of salmon. To evaluate effectiveness, eyed masu salmon *Oncorhynchus masou masou* eggs were experimentally planted in artificial redds, and egg-to-fry survival was surveyed in six tributaries of the Ishikari River in 1999 and 2000. The egg-to-fry survival rates were 0–11.9 % in the five of the study rivers, while it was 49.4 % in the final river. Clear relationships were not observed between stream conditions, e.g. gravel composition, stream width, and egg-to-fry survivals.

キーワード：サクラマス, 産卵床, 生残率, 卵放流

サケ科魚類の卵放流は、放流手法の一つとして以前から実施されてきた (Harshbarger and Porter, 1982 ; Kennedy, 1988 ; Cowx, 1994 ; 小池ら, 2000)。卵での放流は、稚魚あるいは幼魚の段階まで飼育する放流方法と比べて経費がかからないことが長所とされてきた (Barlaup and Moen, 2001 ; Coghlan and Ringler, 2004)。特に発眼卵は受精直後卵と比べて衝撃に強く取り扱いが容易であり、卵を湿らせた布などで包めば上流部など遠方へ運んで放流することも可能であり (中村・土居, 2009)、溪流でのイワナ *Salvelinus leucomaenis*, ヤマメ (サクラマス *Oncorhynchus masou masou* の河川型), アマゴ *O. m. ishikawae* の発眼卵放流が研究されている (中村・土居, 2009 ; 水産総合研究センター, 2013)。北海道ではサクラマスの資源増殖を目的とした放流方法の研究が長く行われ、発眼卵の埋設放流も放流方法の一つとして研究されてきた (永田・坂本, 1989)。しかしながら、サクラマス

発眼卵の埋設放流の効果、すなわち放流から稚魚期までの生き残りを定量的に調べた結果が論文や研究報告として発表された事例は多くはない。そこで本報では、著者らが1999～2000年にサクラマスの発眼卵を数河川に埋設放流し、稚魚期までの生き残りを調べた結果について報告する。

## 材料と方法

**卵埋設放流** 本研究での試験放流には、北海道立水産孵化場森支場あるいは熊石支場で継代飼育したサクラマスから1999年および2000年の9月に採取した卵を使用した。採卵および受精した卵をふ化室で管理し、発眼した後、積算水温300℃前後の時点で死卵を取り除いて、その後、11月に人工産卵床に埋設放流した。調査河川は石狩川水系の当別川支流村田の沢、雨竜川支流幌似太刀別川、千

Table 1 Number and survival of eyed masu salmon eggs planted in the tributaries of the Ishikari River in 1999 - 2000

| River                                       | Murata-no-sawa River | Horoni Tachibetsu River | Izari River   | Moizari River | Ichankoppe River | Moichan River |
|---------------------------------------------|----------------------|-------------------------|---------------|---------------|------------------|---------------|
| <i>Egg planting in artificial redds</i>     |                      |                         |               |               |                  |               |
| Date of egg deposition                      | 2 Nov. 1999          | 16 Nov. 1999            | 13 Nov. 2000  | 14 Nov. 2000  | 13 Nov. 2000     | 14 Nov. 2000  |
| Number of eggs planted per redd             | 1,029                | 1,000                   | 1,200         | 1,200         | 1,200            | 1,200         |
| Number of redds constructed                 | 7                    | 9                       | 20            | 10            | 10               | 10            |
| Total number of eggs planted                | 7,200                | 9,000                   | 24,000        | 12,000        | 12,000           | 12,000        |
| Hatchery                                    | Kumaishi             | Kumaishi                | Mori          | Mori          | Mori             | Mori          |
| River strain                                | Shokanbetsu R.       | Shokanbetsu R.          | Shiribetsu R. | Shiribetsu R. | Shiribetsu R.    | Shiribetsu R. |
| Accumulated water temperature (°C)          | 360                  | 358                     | 367           | 376           | 367              | 376           |
| Water temperature (°C)                      | 6.4                  | 2.3                     | 5.1           | 8.7           | 5.1              | 5.4           |
| Discharge (m <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> ) | No Data              | No Data                 | 1.36          | 1.05          | 0.31             | 0.09          |
| Stream width (m)                            | 2.5                  | 3.5                     | 10.4          | 4.9           | 4.8              | 2.3           |
| Depth (m)                                   | No Data              | No Data                 | 0.24          | 0.35          | 0.17             | 0.16          |
| Mean particle size ( $D_g$ )*               | 11.7                 | 5.2                     | 8.8           | 6.4           | 10.8             | 8.6           |
| Percent of fine sand (<1mm)                 | 12.1                 | 22.7                    | 12.3          | 27.0          | 18.7             | 17.8          |
| <i>Survey of emerged fry</i>                |                      |                         |               |               |                  |               |
| Date of sampling for emerged fry            | 6 Jun. 2000          | 7 Jun. 2000             | 5 Jun. 2001   | 10 Apr. 2001  | 5 Jun. 2001      | 14 May 2001   |
| Water temperature (°C)                      | No Data              | No Data                 | 13.9          | 8.9           | 10.7             | 13.3          |
| Number of fry emerged                       | Estimate 120         | 0                       | 2,849         | 700           | 74               | 5,933         |
| Standard error                              | 58                   | 0                       | 844           | 411           | 49               | 2,430         |
| Furthest downstream distance (m)            | 500                  | -                       | 3,000         | 200           | 300              | 1,300         |
| Mean fork length (cm)                       | 3.7                  | -                       | 4.8           | 4.5           | 5.0              | 4.1           |
| Range of fork length (cm)                   | 2.8–4.7              | -                       | 3.1–6.0       | 3.1–5.9       | 4.1–6.0          | 3.0–5.7       |
| Mean body weight (g)                        | -                    | -                       | 1.3           | 1.0           | 1.4              | 0.9           |
| Range of body weight (g)                    | -                    | -                       | 0.3–2.5       | 0.3–2.7       | 0.6–2.6          | 0.2–2.5       |

\* Mean particle size is represented by geometric mean diameter ( $D_g$ ; McMahon *et al.*, 1996)

歳川支流の漁川, 茂漁川, モイチャン川, イチャンコッペ川である (Table 1)。放流日の時点での積算水温は 358–376°C であった。なお, これらの河川には放流地点よりも下流側にサクラマスが遡上不可能なダムがあるため, 自然産卵するサクラマスは生息せず, 発生した稚魚はすべて本研究での埋設放流に由来するものとみなすことができる。唯一, 石狩川水系の茂漁川にはサクラマスが遡上可能であるので, 茂漁川に埋設放流する卵は, 積算水温 330°C の時点でアリザリン・コンプレクソン (ALC) 溶液 (濃度 200 mg/L) に 24 時間浸漬して耳石に標識を施しておき, 稚魚を採捕した際に放流起源であることを識別できるようにした。

発眼卵を埋設するための人工産卵床は天然魚の産卵床を模倣した構造とした (Gustafson-Marjanen and Moring, 1984; 杉若ら, 1999)。まず, 水深 20–40 cm の箇所を選んで, ショベルと鍬を使って河床に直径 50–60 cm, 深さ 20 cm 程度のくぼみを掘った。次に, その最深部に粒径 10 cm 程度の石を数個並べ, その中央に直径 50 mm, 長さ 1 m の塩化ビニル管を立てた。その後, 周辺の河床から砂利を集め, 目合 1 cm の篩を通して粒径の細かい砂利, 砂などを除いた後, 河床に掘ったくぼみを埋め戻した。くぼみの 3 分の 2 程度を埋め戻した時点で, 塩化ビニル管を通してサクラマスの発眼卵を人工産卵床内に流し入れた。卵を流し入れた後, 河床から 10 cm 程度盛り上がる程度まで砂利をかぶせ, 人工産卵床を完成させた。人工産卵床 1 箇所あたりに埋設したサクラマス発眼卵は 1,000–1,200 粒とした (Table 1)。

各河川の河床の粒度組成を調べるため, 凍結試料採集器 (frozen core sampler) を用いて土砂を採集した (McMahon *et al.*, 1996; Crisp, 2000)。凍結試料採集器は長さ 120 cm, 直径 10 cm の鋼鉄製の筒型の形状をしており, 河床に深くまで打ち込めるよう先端が尖った形状となっている。これを河床に 30 cm 程度打ち込んだ後, 筒内に液体窒素を流し込み, 15–20 分間放置して先端周辺の土砂を凍結させた。凍結した土砂を凍結試料採集器ごと河床から引き抜き, ポリ袋に入れて実験室に持ち帰った。実験室では試料を解凍および乾燥させた後, Wentworth の粒径基準に合わせた篩を使用して河床の粒度ごとに分割し, それぞれの区分の重量を測定した (McMahon *et al.*, 1996)。得られた結果から, 平均粒径 (幾何平均; McMahon *et al.*, 1996) と細砂 (< 1 mm) の割合を算出した。

**稚魚の生息尾数推定** 2000 年および 2001 年の 4–6 月, 人工産卵床から浮上したサクラマス稚魚の個体数を推定するため, 各放流河川において電気漁具を用いて稚魚を採捕した。河川ごとに水温に違いがみられ, 稚魚の浮上時期にも違いがあるものと推測されたため, 4 月から埋設箇所付近において稚魚の採捕を試み, 河川内に稚魚が多く分布するようになった時期に下流側での採捕を行い, 卵から稚魚期までの生き残りを評価することとした。

サクラマスの卵を埋設放流した場合, 稚魚の時点で埋設地点より上流側へ移動する稚魚は少ないので (Nagata, 2002), 稚魚の生息尾数の調査および推定の対象範囲は, 埋設地点より下流側とした。稚魚の採捕場所は長さ 50



mの区間とし、埋設地点から下流に向かって200~300 m間隔で稚魚が採集されなくなる地点まで調査区間を設置した。

各調査区間では電気漁具（Smith-Root社製）を用いてサクラマス稚魚の採捕を行った。調査区間内の稚魚の生息尾数はSeber and Le Cren（1967）の1回あるいは2回採捕の除去法により推定した。埋設地点から離れた調査区間では稚魚の採捕尾数が少なく、2回除去法により採捕率を推定することが困難であったので、埋設地点付近の調査区間で推定された採捕率を用い、1回除去法により稚魚の生息尾数および分散を推定した（Seber and Le Cren, 1967）。前述のとおり、茂漁川では自然産卵由来のサクラマス稚魚が生息するため、採集した稚魚の耳石を摘出して蛍光顕微鏡下でALC標識の有無を確認し、自然産卵起源か放流起源かを識別した。それ以外の調査河川では、稚魚の尾叉長と体重を測定した後、採捕地点に放流した。

各河川での稚魚の生息尾数の推定にあたっては、稚魚の分布した範囲を長さ50 mの単位に分割した上で数単位をランダムに抽出したものとみなし、サクラマス稚魚の生息尾数の推定値と分散を推定した（Hankin, 1984）。埋設放流した卵の生残率は、推定された稚魚の尾数を埋設した発眼卵数で除すことにより推定した。

## 結 果

各調査河川における発眼卵の埋設時点から稚魚期までの生残率は0~49.4%と推定された（Fig.1）。採集した時点での各調査河川での稚魚の平均尾叉長は3.7~5.0 cmであった。いずれの河川でも埋設地点に近い調査区間での稚魚の生息密度が高く、下流側に距離が離れるにつれて

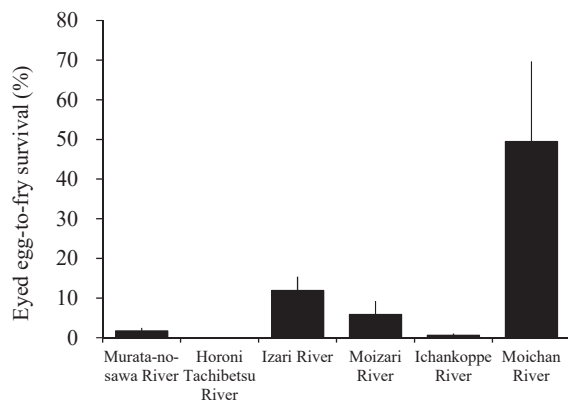


Fig.1 Estimated egg-to-fry survival of masu salmon experimentally planted in artificial spawning redds. Bars indicate standard errors.

生息密度は低下した。稚魚の分散範囲には河川間で大きな違いがみられ、漁川本流では埋設地点から3,000 m下流まで稚魚が確認されたのに対し、イチャンコッペ川では300 m、茂漁川では200 m下流までしか稚魚は確認されなかった（Table 1）。

各調査河川では河床の粒度組成も調べたが、平均粒径あるいは細砂の頻度とサクラマス卵の生残率には明瞭な関係はみられなかった（Spearmanの順位相関  $P > 0.05$ ）。最も生残率が高かったモイチャン川は川幅が狭く、調査河川の中でも河川規模が小さい河川であったが、川幅と生残率の間にも有意な相関はみられなかった（Spearmanの順位相関  $P > 0.05$ ）。

## 考 察

サケ科魚類の卵の生残率と河床の粒度組成には相関がみられることが知られている（Witzel and MacCrimmon, 1983；Olsson and Persson, 1986；Chapman, 1988；Olsson and Persson, 1988；Jensen *et al.*, 2009）。細かな粒径の河床材料が多い場所では卵の生残率が低いことが多く、これは産卵床内の通水が悪く、卵あるいは仔魚の生残に影響するためと考えられている（Crisp, 2000；Kondou *et al.*, 2001）。一方で、河床の粒度組成以外の要因が卵の生残率に影響することも報告されている（Crisp, 2000；Peterson and Quinn, 1996；Malcolm *et al.*, 2004；Quinn, 2005）。本研究の調査河川では、河川規模の小さいモイチャン川で最も高い生残率が得られたが、河川規模は小さくても生残率の低い河川もみられた。稚魚が1尾も採捕されなかった幌似太刀別川では、融雪増水期に河川水位が相当高くなった跡が川岸に観察され、河川の流量変化が大きく産卵床が破壊されるなどの影響も大きかったものと推測された。これらのことから河川の流量の変動の大きさなども卵の生残率に影響することが推測される。

サケ科魚類では産卵から稚魚が浮上するまでの間の死亡率が高いことが知られており、サケ科魚類の生残率についての研究事例をとりまとめた総説では（Bradford, 1994）、卵から稚魚期までの生残率はカラフトマス *O. gorbuscha*、サケ *O. keta*、ベニザケ *O. nerka* では平均で7%、ギンザケ *O. kisutch* は19%と報告されている。サクラマスでは同様の調査結果は得られておらず天然産卵のサクラマスの生残率と比較はできないが、本研究での発眼卵から稚魚期までの生残率は1河川のみ50%近い値であったものの、その他の5河川では0~11.9%であった。この結果から放流方法としての有効性を考えると、他の放流方法と比べて経費はかからないものの、放流効果は高いとは言えないだろう。本研究のフィールド調査は20年前

に実施されたものであるが, 河川的环境条件とサケ科魚類の卵の生残の関係, 卵放流の技術向上に関連する研究は現在も続けられている(水産総合研究センター, 2013; 高橋ら, 2013; Iida *et al.*, 2017)。サクラマスを含むサケ科魚類の増殖と保全に向けた産卵床や産卵場所の条件に関する知見のさらなる蓄積が望まれる。

## 謝 辞

野外での調査では北海道立水産孵化場の小島 博氏, 船岡輝幸氏, 大森 始氏, 北海道立林業試験場の佐藤弘和氏にご協力いただいた。北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場のト部浩一博士には本報告の原稿に助言をいただいた。ここに記して感謝申し上げる。

## 文 献

- Barlaup BT, Moen V. Planting of salmonid eggs for stock enhancement – a review of the most commonly used methods. *Nord. J. Freshwat. Res.* 2001 ; 75 : 1–9.
- Bradford MJ. Comparative review of Pacific salmon survival rates. *Can J Fish Aquat Sci* 1994 ; 52 : 1327–1338.
- Chapman DW. Critical review of variables used to define effects of fines in redds of large salmonids. *Trans. Am. Fish. Soc.* 1988 ; 117 : 1–21.
- Coghlan SM Jr, Ringler NH. A comparison of Atlantic Salmon embryo and fry stocking in the Salmon River, New York. *N. Am. J. Fish. Manag.* 2004 ; 24 : 1385–1397.
- Cowx IG. Stocking strategies. *Fish. Manag. Ecol.* 1994 ; 1 : 15–30.
- Crisp DT. Trout and Salmon, Ecology, Conservation and Rehabilitation. Blackwell Science, Oxford, 2000, 212p.
- Gustafson–Marjanen LI, Moring JR. Construction of artificial redds for evaluating survival of Atlantic salmon eggs and alevins. *N. Am. J. Fish. Manag.* 1984 ; 4 : 455–456.
- Hankin DG. Multistage sampling designs in fisheries research; applications in small streams. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1984 ; 41 : 1575–1591.
- Harshbarger TJ, Porter PE. Embryo survival and fry emergence from two methods of planting brown trout eggs. *N. Am. J. Fish. Manag.* 1982 ; 2 : 84–89.
- Iida M, Imai S, Katayama S. Effect of riverbed conditions on survival of planted eyed eggs in chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Fish. Sci.* 2017 ; 83 : 291–300.
- Jensen DW, Steel EA, Fullerton AH, Pess GP. Impact of fine sediment on egg-to-fry survival of Pacific salmon; a meta-analysis of published studies. *Rev. Fish. Sci.* 2009 ; 17 : 348–359.
- Kennedy GJA. Stock enhancement of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). In Mills D, Piggins D (eds). *Atlantic Salmon: Planning for the Future*. Timber Press, Portland, 1988 ; 345–371.
- 小池利通, 大矢真知子, 塚本勝巳. 加治川におけるサクラマス発育段階と放流場所が回帰に及ぼす影響. 新潟県内水面水産試験場調査研究報告 2000 ; 24 : 1–9.
- Kondou T, Takeshita N, Nakazono A, Kimura S. Egg survival in a fluvial population of masu salmon in relation to intragravel conditions in spawning redds. *Trans. Am. Fish. Soc.* 2001 ; 130 : 969–974.
- Malcolm IA, Soulsby C, Youngson AF, Hannah DM, McLaren IS, Thorne A. Hydrological influences on hyporheic water quality: implications for salmon egg survival. *Hydrological Processes* 2004 ; 18 : 1543–1560.
- McMahon TE, Zale AV, Orth DJ. Aquatic habitat measurements. In: Murphy BR, D. W. Wills DW (eds). *Fisheries Techniques, second edition*. American Fisheries Society, Bethesda. 1996 ; 83–120.
- 永田光博, 坂本博幸. サクラマスの卵放流について. 魚と水 1989 ; 26 : 12–21.
- Nagata M. Ecological studies on the dispersal of newly emerged masu salmon fry, *Oncorhynchus masou*. *Scientific Reports of the Hokkaido Fish Hatchery* 2002 ; 56 : 1–87.
- 中村智幸, 土居隆秀. 溪流におけるイワナ発眼卵放流由来群の生残, 成長, 密度および現存量. 日本水産学会誌 2009 ; 75 : 198–203.
- 中村智幸, 徳田幸憲, 高橋剛一郎. 人工産卵河川におけるイワナの産卵と当歳魚の動態. 応用生態学会誌 2009 ; 12 : 1–12.
- Olsson TI, Persson B-G. Effects of gravel size and peat material concentrations on embryo survival and alevin emergence of brown trout, *Salmo trutta* L. *Hydrobiologia* 1986 ; 135 : 9–14.
- Olsson TI, Persson B-G. Effects of deposited sand on ova survival and alevin emergence in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Archiv für Hydrobiologie* 1988 ; 113 : 621–627.
- Peterson NP, Quinn TP. Spatial and temporal variation in dissolved oxygen in natural egg pockets of chum salmon, in Kennedy Creek, Washington. *J. Fish Biol.* 1996 ; 48 : 131–143.

- Quinn TP. The Behavior and Ecology of Pacific Salmon and Trout. American Fisheries Society, Bethesda. 2005, 378p.
- Seber GAF, Le Cren ED. Estimating population parameters from catches large relative to the population. *J. Anim. Ecol.* 1967 ; 36 : 631-643.
- 杉若圭一, 竹内勝巳, 鈴木研一, 永田光博, 宮本真人, 川村洋司. 厚田川におけるサクラマスの産卵床の分布と構造. 北海道立水産孵化場研究報告 1999 ; 53 : 11-28.
- 水産総合研究センター. マス類の効果的な増殖手法の開発. 地域の状況を踏まえた効果的な増殖手法開発事業報告書. 水産庁, 2013.
- 高橋剛一郎, 徳田幸憲, 中村智幸. 人工産卵場における粒径組成とイワナの産着卵の生残について. 砂防学会誌 2013 ; 66 : 40-44.
- Witzel LD, MacCrimmon HR. Embryo survival and Alvin emergence of brook charr, *Salvelinus fontinalis*, and brown trout, *Salmon trutta*, relative to red gravel composition. *Can. J. Zool.* 1983 ; 61 : 1783-1792.

# 近年の石狩湾におけるスケトウダラ*Gadus chalcogrammus* 卵分布の経年変化

本間隆之, 三宅博哉, 志田 修, 三原行雄, 板谷和彦

北海道日本海に分布するスケトウダラについて, 2月に実施された石狩湾および岩内湾における卵分布調査結果を検討し, 卵の分布密度, 発生Stageの経年変化から卓越年級群検出の可能性を把握した。卵分布密度は卓越年級群の年に顕著に高かったが, 年によって発生Stageの出現状況は異なっていた。一方, 石狩湾の水温分布と卵分布密度との間には明瞭な関係は見られなかった。これらの結果から, 石狩湾の卵の分布密度から卓越発生を予測できる可能性が高いことがわかった。加えて, 2014年以降, Stage 1の卵が石狩湾内に多く出現するようになったことから, 湾内での産卵が増えている可能性が示唆された。本研究から石狩湾の卵分布状況を把握する重要性が確認された。

A578 北水試研報 97, 1-8 (2020)

# キツネメバル仔魚の成長と生残に与える光条件および給餌開始日の影響

金田友紀, 高島信一

効率的なキツネメバル種苗生産技術の確立のため, 仔魚の成長と生残への光条件及び給餌開始日の影響を調べた。仔魚を強 (1,700 lx), 中 (200 lx) 及び低 (0 lx) の各照度で飼育し, 給餌開始日を産出後0, 3, 6, 9及び12日目とした。3日ごとに全長の計測, ワムシ摂餌数の計数及び死亡魚の計数を行った。その結果, 強・中照度群では給餌開始 0日目群で成長と12日後の生残率が良かったが (それぞれ86.7%と61.1%), その他の群では成長が遅く生残率は極端に悪かった (1.3%以下)。また, 低照度群では給餌開始日によらず9日目に全数が死亡した。産出後3日程度で, 仔魚は飢餓から回復出来なくなると考えられる。従って, キツネメバル種苗生産では照度200 lx以上で産出直後に給餌を開始する必要がある。

A579 北水試研報 97, 9-15 (2020)

# Development of quantitative RT-PCR targeting *gyrB* mRNA for *Flavobacterium psychrophilum* infecting chum salmon *Oncorhynchus keta*

サケ冷水病原菌の*gyrB* mRNAを対象とした定量RT-PCR法の開発

三坂尚行, 畑山 誠, 鈴木邦夫

サケの冷水病生菌を迅速かつ定量的に検出するため, *Flavobacterium psychrophilum*の*gyrB*遺伝子mRNA対象のRT-qPCR法を開発した。本方法でmRNAは試料1μL中 $6.0 \times 10^1$  -  $6.0 \times 10^9$ コピーの範囲で高い相関で定量できた。菌のバッチ培養ではDNA量は増加し続けたが, mRNA量が減少すると生菌も減少した。冷水病を発症したサケ稚魚を用い, 発症初期・中期・後期の腎臓を試料に解析したところ, mRNA検出率と腎臓1mg中のコピー数及び培養での生菌検出率が, 初期では各60%,  $4.9 \times 10^3$ , 95%, 中期では100%,  $5.6 \times 10^4$ , 100%だったが, 後期にはmRNAは検出されず, 生菌検出率は40%であった。よって本手法は冷水病生菌の迅速な定量につながると考えられた。

A580 北水試研報 97, 17-27 (2020)

# サケ稚魚の魚体中トリグリセリド含量と肝臓中グリコーゲン含量の栄養状態評価指標としての有効性

虎尾 充

サケ稚魚の絶食と再給餌試験を行い, 魚体中トリグリセリド (TG) 含量とリン脂質 (PL) 含量, 肝臓中グリコーゲン (GC) 含量の変化から栄養状態指標としての有効性を検討した。TG含量およびTG/PL比は, 絶食および再給餌日数に比例して直線的に増減した。一方, GC含量は急激に変動した。PL含量は変化が少なく, 絶食20日目以降に低下した。絶食3日目までは主にGCがエネルギー源として使われ, その後絶食5~20日目にかけてTGも消費される。絶食20日目以降は体組織の分解によってエネルギー源を得ている可能性がある。これらのことから, 放流後のサケ稚魚の栄養状態評価には, 魚体中TG含量が適していると考えられた。

A581 北水試研報 97, 29-36 (2020)

# 人工産卵床に埋設放流したサクラマス卵の稚魚期までの生残率

宮腰靖之, 竹内勝巳, 青山智哉, 永田光博

サクラマス発眼卵放流の増殖効果を調べるため, 1999年および2000年の11月, 石狩川水系の6つの支流に人工産卵床を造成し発眼卵を埋設放流した。放流翌年の春, 人工産卵床の下流側でサクラマス稚魚の生息尾数を調べ, 放流から稚魚期までの生残率を推定した。放流河川のうちの1河川では49.4%と高い生残率となったが, その他の5河川では0~11.9%と低い生残率にとどまった。埋設場所の川幅や河床の粒度組成とサクラマスの卵の生残率の間には明瞭な関係はみられなかった。

A582 北水試研報 97, 37-41 (2020)



水産研究本部図書出版委員会

委員長 木村 稔  
委員 萱場 隆昭 中多 章文 赤池 章一  
星野 昇 三原 行雄 浅見 大樹  
事務局 宮腰 靖之 富樫 佳弘 上田 吉幸

水産研究本部出版物編集委員会

委員長 宮腰 靖之  
委員 山口 幹人 板谷 和彦 馬場 勝寿 清水 洋平  
辻 浩司 武田 忠明 隼野 寛史 畑山 誠  
浅見 大樹 水野 伸也  
事務局 富樫 佳弘 上田 吉幸 (作業補助：石川 さやみ)

---

北海道水産試験場研究報告 第97号

---

2020年3月6日発行 ISSN : 2185-3290

編集兼 北海道立総合研究機構水産研究本部  
発行者 〒046-8555 北海道余市郡余市町浜中町238  
電話 総合案内 0135(23)7451 (総務部総務課)  
図書案内 0135(23)8705 (企画調整部企画課)  
FAX 0135(23)3141  
Hamanaka-cho 238, Yoichi-cho, Hokkaido 046-8555, Japan  
印刷所 株式会社 総北海 札幌支社  
〒065-0021 札幌市東区北21条東1丁目4番6号  
電話 011(731)9500

---