

ポピドンヨードによるヒメマス及びニジマス受精卵の吸水前消毒法

三浦 正之・岡崎 巧

全国のマス類の養殖場において発生がみられている冷水病¹⁾の原因菌 *Flavobacterium psychrophilum* は卵内感染することがわかっており^{2,3)}、一般に行われているポピドンヨードによる発眼卵の消毒では垂直感染を完全に防除できない。このため、冷水病の卵内感染を防止することを目的に従来の消毒方法とは異なる受精卵の吸水前消毒法について、ヒメマス卵及びニジマス卵を用いて安全性を検証した。

なお、本試験は全国養鱒技術協議会魚病対策研究部会（以下、部会）の連絡試験として実施した。

材料および方法

試験1 受精卵の吸水前消毒の安全性および消毒後の残存ヨウ素濃度

供試卵

山梨県水産技術センター忍野支所（以下、当支所）で飼育しているヒメマス3歳魚及びニジマス3歳魚から採卵した卵を使用した。試験はそれぞれの魚種について2回ずつ実施し、ヒメマスでは2014年9月19日及び9月24日、ニジマスでは2014年11月6日及び11月13日にそれぞれ複数の個体から採卵した卵をプールし、1回の試験につき約6万粒を試験に供した。

卵の受精、消毒および管理

常法により採卵した卵を十分量の0.9%NaCl溶液（以下、等張液）でシャワー洗卵⁴⁾し、プラスチック製のたらいの中で卵約1万粒あたり1.25Lの等張液と10mLの精子を混合した。その後、たらいから精子が入った等張液を一度こぼした後に、同量の等張液を投入後さらにそれをこぼす形で受精卵に付着した余分な精子を除去した。

次に、受精卵を約1万粒ずつ6群に分け、うち2群はその直後に吸水処理を行い、これを通常作業区（対照区）とした。残りのうち2群は消毒区とし、それぞれ等調液と水産用イソジン（Meiji Seika ファルマ社製）を用いて調整した有効ヨウ素濃度50ppmの消毒液で15分間消毒した後に吸水処理を行った。卵数と消毒液量の割合は、用法用量どおりの5万粒あたり10Lと同等とし、1群あたり2Lの消毒液を使用した。また、消毒完了直後に消毒液100mLを採取し、チオ硫酸ナトリウム1/100N溶液で滴定した。滴定値をもとに宮城県水産技術センターが作成した検量線（ヨウ素濃度（ppm）=14.183×滴定値）に基づき残存するヨウ素濃度を算出した。さらに残りの2群は未消毒区として2Lの等張液中に15分間浸漬した後に吸水処理を行った。また、洗卵開始時刻（供試用にプールした卵の最初の卵を洗卵した時刻）から吸水開始までの時刻を記録し、洗卵開始から吸水開始までの時間を分単位で算出した。

各群の供試卵数は、吸水前の受精卵の総重量を測定した後にこの値を吸水前の受精卵1粒あたりの重量で割ることにより算出した。

全ての試験区において吸水終了後の卵を縦型孵化槽に収容し、発眼期まで水温12.5℃の地下水をかけ流し、適当量の銅ファイバー⁵⁾を浸漬することで水カビ病を防除しながら卵管理を行った。発眼期には検卵により死卵を除去し発眼卵数を算出した。各群の発眼卵数は発眼卵の総重量を発眼卵1粒あたりの重量で割ることにより算出した。また、以下の式により発眼率を算出した。

$$\text{発眼率 (\%)} = \frac{\text{発眼卵数}}{\text{供試卵数}} \times 100$$

Miura Masayuki, Okazaki Takumi

ニジマスの第2回目の試験においては、一部の発眼卵を水温 12.5°Cの地下水をかけ流しながら孵化まで管理し以下の式により孵化率及び奇形率を算出した。

孵化率 (%) = 孵化尾数 / 発眼卵数 × 100

奇形率 (%) = 奇形尾数 / 孵化尾数 × 100

試験2 消毒液のヨウ素濃度に対する精子混入の影響の検討

当支所で飼育しているニジマス3歳魚から2014年11月13日に採卵した卵を試験に供した。複数個体から常法により採卵した卵をプールし、試験1と同様の方法で洗卵した後に約1万粒ずつを試験区1から試験区4までの4群に分け、各群それぞれ1.25Lの等張液とともにプラスチック製の洗面器に収容し、この中で10mLの精子と混合した。

試験区1では受精完了後に受精卵をステンレス製の金網で受け、精子が入った等張液を除去した後に、さらに十分量の等張液でシャワー洗卵⁴⁾し余分な精子を落とした。その後、試験1と同様の方法で調整した有効ヨウ素濃度50ppmの消毒液2L中で15分間消毒を行った。試験区2では試験区1と同様に等張液を除去後、同量の等張液を投入し、さらにそれをこぼす形で受精卵に付着した余分な精子を落とした後に同様に消毒を行った。試験区3では試験区1及び2と同様に等張液を除去しただけで消毒を行った。試験区4では受精後に精子が混入した等張液をそのまま利用して消毒液2Lを調整し消毒を行った。すなわち、洗面器中の受精卵をステンレス製の金網で受けるとともに、等張液は別の容器で受け、この等張液に不足分の新たな等張液を加えたものを消毒液調整用の等張液として使用した。

結果

試験1 受精卵の吸水前消毒の安全性及び消毒後の残存ヨウ素濃度の検証

ヒメマス卵

受精卵の吸水前消毒が発眼率に及ぼす影響について、結果を表1に示した。第1回試験では通常作業区の発眼率55.9及び61.4%に対して消毒区の発眼率は60.8及び61.4%、未消毒区の発眼率は57.3及び60.4%であった。第2回試験では通常作業区の発眼率62.3及び64.7%に対して消毒区の発眼率は60.7及び62.6%、未消毒区の発眼率は61.6及び63.2%であった。第1回試験及び第2回試験ともに通常作業区、消毒区及び未消毒区の発眼率に有意差は認められなかった ($p > 0.05$, 値を逆正弦変換後に一元配置分散分析を行った, 以下同じ)。

なお、消毒区及び未消毒区の最初の卵の洗卵開始から吸水開始までの所要時間は第1回試験及び第2回試験で、それぞれ47及び51分であった。

また、吸水前の受精卵の卵重及び消毒区の消毒終了直後の残存ヨウ素濃度を表2に示した。ヒメマスの卵重は第1回及び第2回でそれぞれ1粒あたり0.121及び0.122gで、消毒終了直後の残存ヨウ素濃度はそれぞれ34.0及び32.6ppmであった。

表1 ヒメマス卵の発眼率に及ぼす受精卵の吸水前消毒の影響

魚種		供試卵数	発眼卵数	発眼率 (%)
ヒメマス (第1回)	通常作業区1	10,056	6,174	61.4
	通常作業区2	10,061	5,629	55.9
	消毒区1	10,091	6,137	60.8
	消毒区2	10,055	6,173	61.4
	未消毒区1	10,102	5,790	57.3
	未消毒区2	10,054	6,076	60.4
ヒメマス (第2回)	通常作業区1	10,066	6,269	62.3
	通常作業区2	10,082	6,528	64.7
	消毒区1	10,065	6,299	62.6
	消毒区2	10,078	6,117	60.7
	未消毒区1	10,070	6,204	61.6
	未消毒区2	10,050	6,348	63.2

表2 供試卵の受精卵の重量及び消毒 (約1万粒/2L) 後の残存ヨウ素濃度

	卵重量 (g/粒)	試験区	滴定値 (mL)	残存濃度 (ppm)
ヒメマス (第1回)	0.121	1	2.4	34.0
		2	2.3	32.6
ヒメマス (第2回)	0.122	1	2.7	38.3
		2	2.5	35.5

ニジマス卵

受精卵の吸水前消毒が発眼率に及ぼす影響について、結果を表3に示した。第1回試験では通常作業区の発眼率94.4及び94.9%に対して消毒区の発眼率は94.2及び94.7%、未消毒区の発眼率は92.9及び93.5%であった。第2回試験では通常作業区の発眼率60.2及び62.7%に対して消毒区の発眼率は59.5及び62.5%、未消毒区の発眼率は57.6及び62.9%であった。第1回試験及び第2回試験ともに通常作業区、消毒区及び未消毒区の発眼率に有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。

孵化率及び奇形率について、結果を表4に示した。孵化率については、通常作業区の93.2及び94.7%に対して消毒区は91.0及び93.1%、未消毒区は90.3及び95.3%であった。奇形率については、通常作業区の1.2及び3.5%に対して消毒区は2.0及び2.3%、未消毒区は1.2及び1.7%であった。孵化率及び奇形率ともに、通常作業区、消毒区及び未消毒区の間には有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。

なお、消毒区及び未消毒区の最初の卵の洗卵開始から吸水開始までの所要時間は第1回試験及び第2回試験で、それぞれ41及び36分であった。

また、吸水前の受精卵の卵重及び消毒区の消毒終了直後の残存ヨウ素濃度を表5に示した。ニジマスの卵重は第1回及び第2回ともに0.076gで、残存ヨウ素濃度はともに42.5ppmであった。

表3 ニジマス卵の発眼率に及ぼす受精卵の吸水前消毒の影響

魚種		供試卵数	発眼卵数	発眼率 (%)
ニジマス (第1回)	通常作業区1	10,194	9,670	94.9
	通常作業区2	10,238	9,661	94.4
	消毒区1	10,198	9,655	94.7
	消毒区2	10,203	9,610	94.2
	未消毒区1	10,217	9,492	92.9
	未消毒区2	10,181	9,515	93.5
ニジマス (第2回)	通常作業区1	10,390	6,254	60.2
	通常作業区2	10,253	6,424	62.7
	消毒区1	10,196	6,063	59.5
	消毒区2	10,246	6,404	62.5
	未消毒区1	10,235	5,899	57.6
	未消毒区2	10,286	6,468	62.9

表4 ニジマス卵の孵化率及び奇形率に及ぼす受精卵の吸水前消毒の影響

	発眼卵数	孵化尾数	孵化率 (%)	奇形尾数	奇形率 (%)
通常作業区1	176	164	93.2	2	1.2
通常作業区2	150	142	94.7	5	3.5
消毒区1	160	149	93.1	3	2.0
消毒区2	144	131	91.0	3	2.3
未消毒区1	185	167	90.3	2	1.2
未消毒区2	127	121	95.3	2	1.7

表5 供試卵の受精卵の重量及び消毒（約1万粒/2L）後の残存ヨウ素濃度

	卵重量(g/粒)	試験区	滴定値 (mL)	残存濃度 (ppm)
ニジマス (第1回)	0.076	1	3.0	42.5
		2	3.0	42.5
ニジマス (第2回)	0.076	1	3.0	42.5
		2	3.0	42.5

試験2 消毒液のヨウ素濃度に対する精子混入の影響の検討

消毒前の精子の除去方法の違いが消毒液中の残存ヨウ素濃度に与える影響を調べた結果を表6に示した。精子を全く除去しなかった試験区4の消毒後の残存ヨウ素濃度が29.8ppmで最も低い値を示した。それ以外の試験区では残存ヨウ素濃度は39.7～42.5ppmであり、大きな差は認められなかった。

表6 ニジマス受精卵の吸水前消毒後の残存ヨウ素濃度を与える精子の影響

	滴定値 (mL)	残存ヨウ素濃度 (ppm)	消毒前の精子の除去方法
試験区1	3.0	42.5	精子入りの等張液除去+シャワー洗卵
試験区2	2.9	41.1	精子入りの等張液除去+同量の等張液で濯ぎ
試験区3	2.8	39.7	精子入りの等張液除去のみ
試験区4	2.1	29.8	精子入りの等張液を利用して消毒液作成

考察

マス類の発眼卵に対してヨード剤による卵消毒を行うことで、様々な病気の親から子への感染、いわゆる垂直感染を防除することが可能である。このため、我が国のマス類養殖場においては広くこの消毒方法が取り入れられている。特にニジマスにおいて診断件数も多く⁶⁾、被害量が大きい伝染性造血器壊死症（以下、IHN）の垂直

感染は発眼期の卵消毒により防除可能である⁷⁾。作用機序としては消毒剤により発眼卵表面のウイルスが失活することに加え、たとえ卵内に侵入したウイルスが胚に感染していたとしてもその卵は死亡するため検卵の際に確実に死卵を除去すれば垂直感染を防除できる⁷⁾。また、イワナやヤマメで被害が問題となっているせつそう病では⁶⁾、卵内に原因菌が侵入してもそこでの菌の増殖は起こらず時間の経過とともに卵内から原因菌は検出されなくなる⁸⁾。このため、発眼期に卵表面の消毒を行えばせつそう病の垂直感染は起こらないと考えられている。

一方、マス類での診断件数が多く、特にIHNに罹病した場合に、高い頻度で混合感染がみられる冷水病も垂直感染の防除が必要であることは言うまでもない。しかし、冷水病菌は卵内感染することがすでに証明されており、発眼期の卵消毒で垂直感染を確実に防除することは難しい。これは冷水病菌が卵内に侵入した際に菌は不活化されず主に囲卵腔内で増殖することに加え、卵内で菌の増殖が起こっても卵の発生に影響がないためIHNとは異なり死卵の除去による病原体の排除できないためである³⁾。

過去に冷水病の卵内感染を防ぐためにヨード剤で受精卵を吸水させる方法が試みられたが、冷水病の卵内感染は防げなかった⁹⁾。また、米国の孵化場においてもヨード剤での吸水が行われているが高率で冷水病の卵内感染が起きている¹⁰⁾。冷水病菌で汚染された状態で受精卵の吸水を行った過去の実験から、吸水の際の卵門を通じた菌の侵入が卵内感染の原因であることがわかっているため^{3, 11)}、ヨード剤による吸水でも卵内感染を防げるかと思われたが、この方法では吸水直後に卵内の有機物によってヨード剤の殺菌効果が低減してしまうため完全に冷水病菌を殺菌できないものと思われる。

このため部会では冷水病の卵内感染防除には吸水前に卵表面が消毒されている必要があるとの結論に至り、受精卵の吸水前消毒についての連絡試験を行うこととなった。改めて行われた実験において、実際に冷水病菌に汚染された卵をそのまま吸水させた場合は卵内感染が成立したが、卵消毒を行った後に吸水させた場合には卵内感染は成立しなかった(部会私信)。この結果から本消毒方法は冷水病の卵内感染防除に有効であると判断できる。

本県では連絡試験の中でヒメマス卵とニジマス卵においてヨード剤による受精卵の吸水前消毒の安全性を確認したが、ヒメマス卵では2回実施した試験ともに発眼率の低下は確認されなかった。また、ニジマス卵においても2回の試験ともに消毒による発眼率の低下は確認されなかった。さらに、孵化率及び奇形率の低下も確認されなかった。他の都県で実施した連絡試験の結果からシロサケ、ギンザケ、イワナ、ヤマメ及びアマゴにおいても安全性が確認されているため(部会私信)、本消毒方法はマス類卵に対して安全な消毒法であると考えられる。なお、今回の試験では洗卵開始から吸水まで40~50分程度の時間を要したが、NaClのみの組成の等張液中に吸水前の卵を長時間置くと発眼率が低下することが知られているため¹²⁾、洗卵作業がこれよりも長引く場合はNaCl、KCl及びCaCl₂を用いた標準等張液¹³⁾を使用すべきである。

ヒメマス卵とニジマス卵の安全性の確認を行った際に、消毒完了直後の消毒液中の残存ヨウ素濃度を測定した結果、消毒完了後も冷水病菌を殺菌可能な濃度¹⁴⁾が維持されていたことから今回試験1で実施した方法であれば、有機物によるヨウ素濃度低下という点で問題はない。但し、ヒメマスやニジマス卵よりも大きいシロザケ卵では用法用量どおりの5万粒あたり10Lの消毒液を使用した場合に消毒完了後にヨウ素濃度が大きく低下していたことから(部会私信)、卵が大きい魚種の場合は用法・用量よりも少ない卵数で消毒を行う必要がある。

消毒液のヨウ素濃度に対する精子混入の影響の検討した結果、受精に使用した精子を全く除去しなかった試験区では残存ヨウ素濃度が低下していたため、精子はヨウ素濃度を低下させることが明らかになった。このため消毒前には精子をある程度除去しておく必要があると考えられた。それ以外の試験区では高い残存ヨウ素濃度が維持されており値にほとんど差はなかった。このため、採卵現場での作業の省力化という点では、受精後の精子が入った等張液を金網やザルなどを用いて除去した後にそのまま消毒を行えば十分であると考えられる。

受精卵の吸水前消毒法は、作業に要する労力という点でもこれまでの消毒法と大きな差はない。今回の試験で安全性も確認されたことから、速やかにマス類養殖場の現場に普及し、冷水病の被害が軽減されることが望まれる。

る。

謝 辞

本試験における残留ヨウ素濃度の算出は宮城県水産技術総合センター気仙沼水産試験場の熊谷明氏が作成した検量線に基づき行わせていただいた。ここに厚く御礼申し上げる。

要 約

1. 山梨県水産技術センター忍野支所で飼育しているヒメマス 3 歳魚およびニジマス 3 歳魚から得られた卵を用いてポピドノードによる受精卵の吸水前消毒について安全性の検証を行った。
2. 試験区は①受精直後に吸水させた「通常作業区 (対照区)」, ②受精後に等調液 (0.9%食塩水) で調整した 50ppm のヨード剤で 15 分間浸漬した「消毒区」, ③受精後に等張液 (0.9%食塩水) に 15 分間浸漬した「未消毒区」とした。また, 消毒区では消毒終了後の残存ヨード濃度の測定を行った。なお, ②, ③の浸漬に使用した液量は卵約 1 万粒に対して 2L とした。
3. 両魚種において試験区間で発眼率に差は認められず, 吸水前の受精卵消毒は卵の発生に悪影響を及ぼさないと判断された。
4. 消毒終了後の残存ヨード濃度はヒメマスで 32.6~34.0ppm, ニジマスで 42.5ppm であり, 消毒完了まで適正なヨウ素濃度が維持されていた。
5. 受精に用いた精子が消毒液のヨード濃度に与える影響を調べた結果, 精子の混入はヨード剤濃度を低下させることが明らかとなった。このため, 消毒を行う前に受精に用いた精子をある程度除去しておく必要があると考えられた。

文 献

- 1) 山本 淳 (2005) : 細菌性冷水病 (BCWD) Bacterial cold-water disease. 新魚病図鑑. 緑書房, 東京, 58.
- 2) Brown, L. L., W. T. Cox, R. P. Levine (1997) : Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Dis. Aquat. Org.*, 29, 213-218.
- 3) Kumagai, A. and A. Nawata (2010) : Mode of the intra-ovum infection of *Flavobacterium psychrophilum* in salmonid eggs. *Fish Pathol.*, 45, 31-36.
- 4) 小原昌和・小川 滋・笠井久会・吉水 守 (2010) : 養殖サケ科魚類の人工採卵における等調液洗卵法の除菌効果. *水産増殖*, 58, 37-43.
- 5) 三浦正之・大野平祐・土田奈々・畑井喜司雄・桐生透 (2005) : 銅ファイバー浸漬によるニジマス卵のミズカビ病の防除. *魚病研究*, 40, 81-86.
- 6) 青島秀治 (2007) : 水産試験場等の診断記録からみた我が国における養殖サケ科魚類の疾病問題 (1978~2002 年) . *魚病研究*, 42, 119-122.
- 7) 吉水 守・笠井久会 (2007) : 魚類ウイルスとその疾病防除対策. *日本動物用医薬品協会会報*, 27, 1-17.
- 8) Kohara, M., H. Kasai, M. Yoshimizu (2012) : Intra-ovum infection in salmonid eggs artificially contaminated with fish pathogenic bacteria: *Flavobacterium psychrophilum*, *Renibacterium salmoninarum* and *Aeromonas salmonicida*. *Fish Pathol.*, 47, 49-55.
- 9) Kumagai, A. and A. Nawata (2010) : Prevention of *Flavobacterium psychrophilum* vertical transmission by iodophor treatment of unfertilized eggs in salmonids. *Fish Pathol.*, 45, 164-168.
- 10) Cipriano, RC. (2005) : Intraovum infection caused by *Flavobacterium psychrophilum* among eggs from captive atlantic

salmon broodfish. *J. Aquat. Anim. Health*, 17, 275-283.

- 11) Kumagai, A., S. Yamaoka, K. Takahashi, H. Fukuda, H. Wakabayashi (2000) : Waterborne Transmission of *Flavobacterium psychrophilum* in coho salmon eggs. *Fish Pathol.*, 35, 25-28.
- 12) 近藤博文・本西 晃 (2000) : ニジマス受精卵作業の検討ー I (等張液の代用としての1%食塩水の利用) . 平成10年度長野県水産試験場事業報告書, 40.
- 13) 全国湖沼河川養殖研究会養鱒部会 (1976) : 養鱒の研究. 緑書房, 東京, 14.
- 14) Kumagai, A., K. Takahashi, S. Yamaoka, H. Wakabayashi (1998) : Ineffectiveness of iodophore treatment in disinfecting salmonid eggs carrying *Cytophaga psychrophila*. *Fish Pathol.*, 33, 123-128.