

(平成 22 年 北海道大学審査学位論文)

養殖サケ科魚類の卵内感染による垂直伝播の 防除技術に関する研究

小原 昌和

緒 言

- 第 1 章 養殖サケ科魚類に認められる病原細菌の卵内感染機序の検討
 - 第 1 節 養殖サケ科魚類親魚および未受精卵における病原菌の保有
 - 第 2 節 冷水病原菌 *F. psychrophilum* の卵内感染経路および成立条件
 - 第 3 節 *F. psychrophilum* 以外の魚病細菌および一般細菌による卵内感染
 - 第 4 節 走査型電子顕微鏡によるニジマス卵門の形態観察
- 第 2 章 養殖サケ科魚類の人工採卵における等調液洗卵法の卵表面除菌効果
 - 第 1 節 等調液洗卵法の除菌およびウイルス除去効果
 - 第 2 節 養殖事業における等調液洗卵法の除菌効果の検証
 - 第 3 節 長野県内の養魚場における洗卵法の実態調査
- 第 3 章 卵消毒効果に及ぼす体腔液、潰卵成分の影響および卵消毒による卵内感染の防除効果

総合考察

- 1 養殖サケ科魚類における卵内感染機序について
- 2 種苗生産における卵内感染の防除技術

謝 辞

参考文献

緒 言

現在、わが国の内水面でのサケ科魚類養殖において実施されている防疫対策は、1971 年および 1972 年の両年にわたり北海道の孵化場でヒメマスおよびベニサケ稚魚に伝染性造血器壊死症 (infectious hematopoietic necrosis: IHN) が発生し、さらに 1974 年以降、本州のニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) の主産県において本病が感染拡大したことを契機に構築されたものである (Yoshimizu, 1996; 2009)。その骨子は、消毒法と防疫施設による飼育管理であり、消毒法は、ポビドンヨード (povidone iodine: 以下ヨード剤とする) による魚卵消毒と消毒剤による養殖用器材、養魚池などの施設消毒である (原, 1991; 木村・吉

水, 1985; 吉水, 2007)。

卵消毒に関してはヤマメ (*O. masou masou*)、アマゴ (*O. masou ishikawae*) 等の在来マス養殖において問題となったせつそう病の伝播を防止するために、1971 年にアクリノールによる卵消毒が行われたのが始まりであり、その後国内で IHN が発生・拡大したため、全国湖沼河川養殖研究会養鱒部会によりヨード剤を用いた魚卵消毒に関する共同研究が開始された (原, 1991)。ヨード剤性状の違いによる有効性や魚卵に対する安全性に関する試験が行われ、実際の事業形態や魚卵の移動の実情にあった消毒方法が検討された。ニジマス等の発眼卵にはヨード剤 200 倍液 (50 ppm) で 15 分間

消毒する方法が推奨された(原, 1991)。現在、この卵消毒法は、サケ科魚類の種卵移動時において実施され、防疫上不可欠な要素となっている。近年では、発眼卵の消毒に加え、孵化・飼育施設内への病原体の持ち込み防止を目的に、受精・吸水直後の卵消毒も行われている(野村・笠井, 2003; 熊谷・縄田, 2009)。器材や池などの消毒法については、IHNV および伝染性膵臓壊死症ウイルス(infectious pancreatic necrosis: IPNV) に対する逆性石鹼液および塩素剤等の消毒効果が検討され(佐々木ら, 1976; 山崎ら, 1976)、施設消毒の有効性が示された。その後、消毒剤の種類および対象病原体ごとの消毒効果(佐古ら, 1988; 井上ら, 1990, 1991; Yoshimizu, 1996; 羽鳥ら, 2003)、有機物による阻害、効果持続性、反復使用、温度の影響などの使用条件に関する検討(木村・吉水, 1990; 岐阜県水産試験場, 1992)が行われ、消毒剤および消毒法に関する知見の充実が図られてきた。

防疫施設による飼育管理は、地下水や湧水など病原体が含まれない用水を使用し、食用魚生産池

や親魚養成池とは隔離した専用の孵化・飼育施設において受精卵をふ化・飼育し、種苗を生産する方法として開発された(本西, 2004)。近年では、養魚用水の紫外線殺菌技術が実用化され(吉水ら, 1986; 吉水・日向, 1992; 吉水・笠井, 2002)、病原体で汚染された用水であっても、紫外線殺菌処理することで種苗生産が可能になった。これらの技術が種苗生産における防疫対策として養殖事業に組み込まれ、IHNV の防除に大きく貢献している(吉水・笠井, 2005)。

このように、サケ科魚類の種苗生産における防疫対策は着実な成果をあげてきたが、垂直伝播する疾病の防疫対策については課題が残っている。病原体の卵内感染による垂直伝播が問題視されている主な疾病に、IPN と細菌性腎臓病(bacterial kidney disease: BKD) があげられる。長野県において発生したこれら 2 疾病の伝播経路を表 1 および 2 に示した。IPN は、人や器材の交流、汚染水による水平伝播が主要な経路であったが、汚染された種卵による事例も 28.6% 認められている。BKD でも汚染池との器材や魚の交流による水平伝

表 1 伝染性膵臓壊死症(IPN)の伝播経路

養魚場	水平伝播		垂直伝播
	人の交流、器具の貸借	汚染された飼育用水	汚染された種卵
1	●		
2	●		
3	●		
4	●		
5			●
6			●
7	●		
8	●		
9	●	●	
10	●		
11			●
12			●
13	●	●	
14	●	●	
15	●		
16	●	●	
17	●	●	
18	●		
19			●
20			●
21	●	●	
件数	15 (71.4%)	6 (28.6%)	6 (28.6%)

* 原ら(1993)を一部改変

表2 長野県内の在来マス養魚場における細菌性腎臓病(BKD)の伝播経路

調査* 養魚場	BKD 発生養魚場	水平伝播		垂直伝播	不明
		上流汚染池からの 用水伝播	汚染池との交流、 発病魚群の移動	汚染種卵の導入	
36	16	1	6	3	6
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;"> 4: 複数の養魚場から種卵を導入 2: 河川水使用、自家採卵 </div>					

* 調査年：1984年

播以外に、汚染種卵による経路が 19 % 近くあった。経路が不明の件数には、複数の養魚場から種卵を導入している例も含まれ、これを汚染種卵による伝播とすれば、BKD 伝播経路の 43 % 以上を汚染種卵による垂直伝播が占めることになる。IPNV の卵内感染については、Bullock *et al.* (1976) によって問題提起されているが、その経路や発生頻度など、実態は不明である。また、BKD については Evelyn *et al.* (1984a, b) により卵内感染が起こることが報告されているものの、卵内感染が成立する時期、経路などは未だ不明である。卵内感染を防除するために、産卵親魚へのエリスロマイシン投与による化学療法が試みられた結果、BKD の垂直伝播を防止するためには、産卵前の雌親魚にエリスロマイシンを注射する方法が有効であることが報告されている (Elliott *et al.*, 1989)。さらに、近年になって、細菌性冷水病 (bacterial cold water disease: BCWD、以下冷水病と表記する) でも卵内感染による垂直伝播が起こることが明らかになり (Brown *et al.*, 1997; Kumagai *et al.*, 2000)、種苗生産時における本病の発生は、養殖生産を不安定にさせる要因になっている。従って、種苗生産における防疫対策を強化するために、卵内感染機序の解明と防除技術の開発が必須の課題となっている。

江草 (1994) は、垂直伝播に関する総説において、IPN、IHN および BKD に関する既往の研究成果を整理し、成立の機序について考察している。このうち、卵内に病原体が入ることが証明されているものは BKD だけであり、IPN および IHN では証

明されていない、としている。江草は、BKD に関する 7 研究例を取り上げて、原因菌 *Renibacterium salmoninarum* の卵内侵入は、卵巣液または体腔液中で卵門を経由して起こることは疑いないものの、排卵以前に卵巣内で卵膜孔管經由またはそれ以前の卵形成期におきている可能性があるとしている。さらに、搾卵 (産卵) 後の体外で伝播が起こる可能性についても考察している。これら BKD の卵内感染に関する研究では、*R. salmoninarum* 保菌親魚から得た卵 (Evelyn *et al.*, 1984a, 1986a) や人為的に *R. salmoninarum* で汚染した卵が供試され (Evelyn *et al.*, 1986b; Bruno and Munro, 1986; Lee and Evelyn, 1989)、卵内感染が確かめられている。しかし、卵内から細菌分離を行う前に卵を水中で吸水・硬化させていること、ヨード剤液で一定時間消毒していることから、原因菌の卵内侵入時期が排卵された親魚体内か、あるいは体外での操作過程か、その際の経路は卵門經由か卵膜孔管經由かについて具体的に説明することは難しい。

その後、冷水病でも垂直伝播が疑われる事例が報告される (Holt *et al.*, 1993) とともに、Brown *et al.* (1997) および Kumagai *et al.* (2000b) は、卵内に冷水病原因菌 (*Flavobacterium psychrophilum*) が侵入していることを明らかにした。これにより、先の 3 疾病に加え冷水病が追加されることになった。Kumagai and Nawata (2010) は人工感染試験手法により卵内感染の成立条件を検討し、 10^6 CFU/ml 以上の *F. psychrophilum* で汚染した未受精卵を授精・吸水させることにより卵

内感染が成立し、卵表面の汚染度が高いほどその比率も高くなることを報告している。さらに、侵入した *F. psychrophilum* は卵の囲卵腔内で増殖し、発眼期までに 10^7 CFU/卵まで増殖するが、卵の発育には影響しないことも明らかにした。このように卵内感染の成立条件や実態が徐々に明らかになってきた。

採卵した卵を人工汚染させる手法（体外環境）で卵内感染が成立していること、魚類の受精卵は水に接することにより付活され、吸水とともに囲卵腔の形成が進むという卵の初期発生を考えれば、*F. psychrophilum* の卵内感染は、親魚体内では成立せず、汚染卵を人工授精した際に、体外で起きており、その経路は卵門経路である可能性が高い。しかし、Evelyn *et al.* (1984a) は卵の凍結組織切片を観察し、卵黄内に *R. salmoninarum* の存在を確認し、卵形成初期か、形成後期に体腔液中の *R. salmoninarum* が卵門経路で侵入したのではないかと推察している。また、Brown *et al.* (1997) は、人工感染させたニジマス幼魚の卵母細胞内で *R. salmoninarum* が増殖していることを組織切片で観察している。このように、親魚体内で既に卵内感染が成立している可能性を否定することはできない。条件をより精査した試験や組織学的観察によって卵内感染の事実を具体的に証明し、卵内感染機序を明らかにする必要がある。

ところで、サケ科魚類の人工授精において、人工的に採卵した卵に精液を加えて混合した後に、水を加える乾導法 (Dry method) が広く用いられている。長野県水産指導所は、ニジマスの種卵生産事業において、卵の発眼率が低下する原因として、採卵（搾出）操作の際に生じる潰卵由来の卵蛋白が精子を凝集させることを見だし、リンゲル液で卵液（体腔液）を洗い落としてから授精することにより、発眼率が向上することを明らかにした（長野県水産指導所, 1957）。さらに、稲葉ら（1958）によって、潰卵が混入した体腔液中では精子は活動せず、凝固状態になることや、採卵数に対する潰卵混入率が約 3% 以上では発眼卵が全く得られないことなどが明らかにされた。そして、

等調液（等張液と同義であり、水産増養殖学分野では「等調液」の用語が多く使用されることから、本研究ではこれを用いる）の処方についての実用化試験がなされ、1955 年からこの等調液洗卵法 (egg washing method) が普及に移された。その後、等調液の処方は、NaCl 9.04g、KC1 0.24g、CaCl₂ 0.26g/L に改良され、ニジマスなどサケ科魚類養殖の人工採卵時において広く利用されている。Kumagai and Nawata (2010) は、*F. psychrophilum* の人工感染試験において、卵表面が 10^6 CFU/ml 以上の *F. psychrophilum* で汚染された卵を授精・吸水させた場合に卵内感染が起こり、これ以下の菌濃度では感染が成立しなかったと報告している。また、サケ科魚類の発眼卵の感染実態調査において、国内で生産された 4,173 粒の発眼卵では全く見つからない（熊谷・縄田, 2007, 2008, 2009）。熊谷らの研究から、*F. psychrophilum* による卵内感染の成立の可否は卵表面の菌濃度に依存していることが示され、保菌親魚から採卵した汚染卵であっても、卵を洗浄して表面の菌濃度を減じれば、卵内感染の危険性が低くなることが推察される。また、実際に国内で生産された発眼卵の調査では卵内感染が確認できなかった原因として、等調液洗卵法の効果が考えられる。卵の受精成績を向上させる目的で普及している等調液洗卵法であるが、卵内感染の防除技術として再認識し、その効果の実態や除菌効果の高い方法等について検討する必要があると考える。

以上のように、内水面のサケ科魚類養殖の種卵生産事業における防疫対策上の課題および卵内感染に関する既往の研究成果を踏まえ、本研究では、養殖サケ科魚類における卵内感染機序の解明とその防除技術の開発を目的とした。第 1 章では、主として *F. psychrophilum* を対象とした人工感染試験を行い、卵内感染が成立する経路、条件を検討した。第 2 章では、卵内感染の防除対策としての等調液洗卵法に着目し、洗卵による除菌効果の把握と感染防除効果を検証した。第 3 章では、防除対策をさらに強化するために、未受精卵消毒の効果的な実施条件および防除効果を検討した。

第1章 養殖サケ科魚類に認められる病原細菌の卵内感染機序の検討

養殖サケ科魚類の疾病として、細菌性疾患をはじめウイルス性、真菌性、原虫症など多くが報告されている(小川・室賀, 2008)。緒言で述べたように、これらの中で伝染性脾臓壊死症(IPN)、細菌性腎臓病(BKD)および冷水病は、卵内感染による垂直伝播が問題視され、防疫対策上の課題となっている疾病である。しかし、卵内感染機序については未だ不明な点が多い。江草(1994)は、魚類における垂直伝播問題について、BKD、IPNおよびIHNに関するこれまでの研究例を取り上げ、その機序について論じている。特に研究例が多いBKDについては、卵内感染による垂直伝播は既成の事実とし、保菌親魚の体内で起きている伝播と産卵後の体外で起こる伝播に問題があることを指摘している。さらに保菌親魚の体内での伝播においても、時期、経路など多くが不明であることも述べている。その後、*F. psychrophilum*の卵内感染が明らかになり(Brown *et al.*, 1997)、感染試験における垂直伝播の成立条件などが報告されている(Kumagai and Nawata, 2010)。

体内伝播または体外伝播のいずれにあっても、親魚の保菌は両者に関係する重要な点であると考えられる。本章では、サケ科魚類の卵内感染機序を検討するために、先ず第1節では親魚の保菌状態と保菌親魚が保有する未受精卵内における細菌の有無を調べることで、体内伝播の可能性を検討した。第2節では、体外伝播の機序、条件をより具体的に明らかにするために、*F. psychrophilum*による卵の人工感染試験を行い、感染経路について検討した。第3節では、*F. psychrophilum*の感染試験で得られた結果をもとに、*R. salmoninarum*、せつそう病原菌 *Aeromonas salmonicida*および一般細菌による感染試験を行い、菌種が違っても卵内に細菌が侵入するかについて検討した。第4節では、走査型電子顕微鏡による卵門の形態観察を行い、人工感染試験で得られた感染経路に関する知見

について、卵の側からの考察を試みた。

第1節 養殖サケ科魚類親魚および未受精卵における病原菌の保有

目的

産卵期に体腔内へ排卵するサケ科魚類では、病原菌による体腔液の汚染は、卵内感染の危険と孵化飼育環境の汚染をもたらす重要な問題である。BKDの卵内感染においては、体腔液内の *R. salmoninarum* 菌数が重要なファクターであることが指摘されている。また、冷水病では、*F. psychrophilum* で高度に汚染された卵を授精・吸水させることによって感染が成立することが確かめられている。卵内感染機序に関しては、雌親魚の体内において卵形成から排卵までの過程ですでに成立している可能性と、採卵された卵が人工授精される過程において起こる可能性が考えられているが、明らかにはされていない。しかし、雌親魚の体腔液汚染は卵内感染を考える上で重要な要因であると考えられる。

このため、長野県内の養殖サケ科魚類親魚の保菌状態を調べるとともに、保菌親魚から得た未受精卵から細菌分離を試み、排卵までの過程における卵内での感染の有無を検討した。

材料と方法

採卵用親魚からの体腔液、精液の採取

2007年から2009年にかけて、長野県内におけるサケ科魚類の5養魚場(民間3養魚場、県水産試験場2養魚場)のニジマス、アマゴ、ヤマメおよびイワナ(*Salvelinus leucomaenis*)親魚の体腔液または精液における保菌調査を行った。*F. psychrophilum*については4養魚場のニジマス、ヤマメおよびイワナを、*A. salmonicida*については3養魚場のアマゴ、ヤ

マメおよびイワナを対象にし、*R. salmoninarum* については1養魚場のアマゴを対象にした。保菌検査は上記3細菌を対象とし、飼育群における保菌魚の比率（以下、保菌率とする）および各試料中における生菌数を調べた。

試料採取に先立ち、先ず70%イソプロピルアルコールを湿した消毒綿で総排泄口周辺を消毒した後に、滅菌したマイクロピペット用チップを生殖口へ挿入して体腔液または精液を約1ml採取し、滅菌したマイクロチューブに保存した。養魚場で採取した試料を氷冷して実験室へ持ち帰り、生菌数測定に使用した。

***F. psychrophilum*、*A. salmonicida* および *R. salmoninarum* の生菌数測定**

生菌数の測定方法としては、*F. psychrophilum* および *A. salmonicida* については平板塗布法を、*R. salmoninarum* についてはミスラ法(坂崎, 1978)を使用した。すなわち、*F. psychrophilum* および *A. salmonicida* は、試料0.1mlを寒天平板培地へ塗布し、15℃で7日間培養したのちに、平板上の菌集落数から試料1mlあたりの生菌数を算定した。*R. salmoninarum* については、滅菌等調液を用いて試料の10倍階段希釈したものを、平板に50μl滴下し、30日間の培養を行って生菌数を算定した。培地は *A. salmonicida* に対してはCBB培地(野村・吉水, 2006)を、*F. psychrophilum* に対しては牛胎児血清(FBS)を5%添加した改変サイトファーガ培地を用い、*R. salmoninarum* に対してはKDM-2・MSRs(Matsui *et al.*, 2010)を供試した。*A. salmonicida* はCoomassie brilliant blue(CBB)寒天培地(野村・吉水, 2006)上の青紫色の集落から純粋分離を行い、普通寒天培地で褐色色素を産生するグラム陰性・運動性陰性菌を *A. salmonicida* とした。*F. psychrophilum* は改変サイトファーガ培地上の黄色菌集落について、抗 *F. psychrophilum* ウサギ血清(日本水産資源保護協会)による凝集試験および特異遺伝子検出用プライマーを用い

たPCR(吉浦ら, 2006)により判定した。*R. salmoninarum* については、抗 *R. salmoninarum* ウサギ血清による凝集試験または間接蛍光抗体法(IFAT)により判定した。

未受精卵内からの *F. psychrophilum* の分離

雌親魚から体腔液を採取した後に、腹部を軽く押し未受精卵200粒程度を滅菌遠沈管に採取した。卵を冷蔵して実験室に持ち帰り、卵内からの菌分離に供試した。検査対象はニジマスでは *F. psychrophilum*、アマゴでは *R. salmoninarum* とした。*F. psychrophilum* の検査においては、採取した未受精卵を体腔液とともに3日間冷蔵保存し、生菌数測定用に培養している培地平板上の *F. psychrophilum* 集落の出現状況を観察し、体腔液の *F. psychrophilum* 陽性または陰性を確認し、細菌分離を行った。*R. salmoninarum* 検査においては、体腔液試料をスライドグラスに塗抹し、IFATにより *R. salmoninarum* の有無を判定し、未受精卵内からの細菌分離を行った。*F. psychrophilum* 検査に使用した卵は体腔液陽性卵が9区、陰性区が6区であり、*R. salmoninarum* では陽性および陰性区ともに3区であった。

未受精卵の細菌分離は、先ず未受精卵60粒を滅菌等調液で3回洗浄し *F. psychrophilum* の試料については滅菌等調液で200倍に希釈した水産用イソジン消毒液で15分間の卵消毒を行い、*R. salmoninarum* の試料については水産用イソジン100倍液で20分間の卵消毒を行った。消毒終了後に滅菌等調液で2回洗浄して消毒液を取り除いた後に、寒天平板培地上で転がし、卵表面の細菌分離操作を行った。その後、卵を1粒ずつ96穴マイクロプレートのwellに収容した。注射針付滅菌シリンジ(1ml, 23 G×1" :テルモ)を用いて吸引採取した卵内容物を、滅菌綿棒を用いて培地平板へ塗抹した。*F. psychrophilum* の分離には、改変サイトファーガ寒天平板培地を使用し、*R. salmoninarum* の分離にはKDM-2・MSRsを使用した。培養期間は *F.*

表1-1-1 養殖サケ科魚類親魚からの*F. psychrophilum*, *A. salmonicida*および*R. salmoninarum*の検出

病原菌	調査年	養魚場	魚種・群	親魚数 (尾)	親魚群の保菌率 (保菌魚数/検査尾数, %)		体腔液・精液中の生菌数 (log ₁₀ CFU/ml)	
					♀	♂	♀	♂
<i>F. psychrophilum</i>	2007	A	ニジマス	1,300	2/60(3.3%)	NT ^{**}	2.0	NT
			ニジマス(全雌)	1,000	7/60(11.7%)	NT	1.0-3.6	NT
	2008	A	ニジマス	600	1/27(3.7%)	4/49(8.2%)	1.5	1.0-2.0
			ニジマス(全雌)	2,300	9/112(8.0%)	NT	1.0-2.4	
			ヤマメ	1,000	19/44(43.2%)	2/24(8.3%)	1.0-2.4	1.8-2.1
			イワナ	500	1/36(2.8%)	0/24(0%)	2.0	
2009	A	ニジマス	1,700	13/75(17.3%)	NT	1.0-2.7	NT	
		ニジマス(全雌)	2,300	8/92(8.7%)	NT	1.0-4.2	NT	
<i>A. salmonicida</i>	2008	C	ヤマメ	1,000	3/44(6.8%)	5/20(25.0%)	1.0-2.5	3.1-4.7
			イワナ	500	1/36(2.8%)	0/24(0%)	3.0	
			アマゴ	700	1/60(1.7%)	0/5(0%)	1.8	
<i>R. salmoninarum</i>	2008	E	アマゴ	700	1/60(1.7%)	0/10(0%)	NT	NT
			アマゴ	900	3/81(3.7%)	0/18(0%)	8.1-9.9	

^{**} 調査せず

psychrophilum で7日間、*R. salmoninarum* で30日間とした。

結果

養殖サケ科親魚の *F. psychrophilum*, *A. salmonicida* および *R. salmoninarum* 保菌率および生菌数

調査した養魚場の各親魚群における病原菌の保菌率および生菌数を表1-1-1に示すとともに、病原菌別の生菌数を図1-1-1に示した。*F. psychrophilum* は1養魚場のヤマメ(雌)で43.2%の高い保菌率がみられたが、ほか3養魚場のニジマスおよびイワナの保菌率は20%未満であった。*A. salmonicida* は1養魚場のヤマメ(雄)が25.0%で最も高かったが、これ以外は10%未満であった。*R. salmoninarum* はアマゴ親魚の保菌率が1.7および3.7%であった。*F. psychrophilum* 生菌数は体腔液が $10^{1.0-4.2}$ CFU/ml、精液が $10^{1.0-2.1}$ CFU/mlであった。*A. salmonicida* は、体腔液が $10^{1.0-3.0}$ CFU/ml、精液が $10^{3.1-4.7}$ CFU/mlの範囲であった。*R. salmoninarum* は雌親魚のみで保菌が見られ、 $10^{8.1-9.9}$ cells/mlであった。*F. psychrophilum* および *A. salmonicida* の生菌数は高くても 10^4 CFU/ml程度であったが、*R. salmoninarum* は $10^8 \sim 10^{10}$ CFU/mlと著しく高い値であった。

未受精卵内からの *F. psychrophilum* および *R. salmoninarum* の分離

ニジマス、アマゴ保菌親魚および非保菌親魚の未受精卵における *F. psychrophilum*、*R. salmoninarum* の分離結果を、表1-1-2に示した。ニジマス体腔液の *F. psychrophilum* 生菌数は $10^{1.5-4.2}$ CFU/mlであったが、9区全ての未受精卵内から *F. psychrophilum* は分離されず、体腔液が陰性の6区からも分離されなかった。*R. salmoninarum* を対象にしたアマゴ未受精卵についても、体腔液が陽性および陰性ともに、卵内から *R. salmoninarum* は分離されなかった。また、卵内からの細菌分離に先立って行った卵表面の検査では、全ての検査区の卵表面から *F. psychrophilum* または *R. salmoninarum* は分離されなかった。

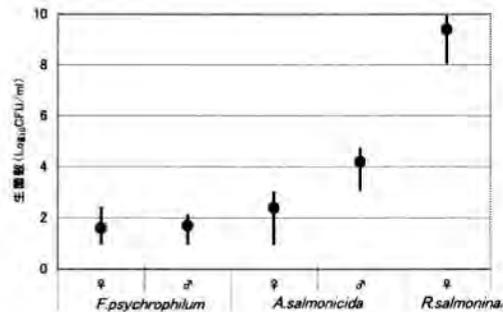


図1-1-1 体腔液(♀)および精液(♂)中における病原細菌の生菌数

— 生菌数の範囲
● 平均値

表1-1-2 *F. psychrophilum* および *R. salmoninarum* 保菌親魚から採卵した未受精卵の卵内感染率

菌種	体腔液中の生菌数 ^{*1} (log ₁₀ CFU/ml)	卵内感染率 (陽性卵数/標本数)
<i>F. psychrophilum</i>	4.2	0/60
	3.4	0/60
	2.7	0/60
	2.2	0/60
	2.2	0/60
	2.0	0/60
	1.8	0/60
	1.8	0/60
	1.5	0/60
	— ^{*2}	0/60
	—	0/60
	—	0/60
	—	0/60
<i>R. salmoninarum</i>	9.9	0/60
	8.1	0/60
	8.1	0/60
	—	0/60
	—	0/60

^{*1}調査した病原細菌(魚種):冷水病菌(ニジマス),BKD菌(アマゴ)

^{*2}検出限界(冷水病菌:1.0(log₁₀)CFU/ml, BKD菌:1.3(log₁₀)CFU/ml)以下を示す

* BKD菌検査では、予めFATでスクリーニングした後に菌分離を行った

* 冷水病菌検査では、未受精卵を3日間体腔液中(5°C)に保存し、体腔液が陽性であった個体の卵を検査した

考 察

産卵期におけるサケ科魚類の親魚では、体腔液から *F. psychrophilum* が $10^1 \sim 10^7$ CFU/ml (熊谷・縄田, 2008)、*A. salmonicida* が $2 \times 10^1 \sim 8.3 \times 10^6$ CFU/ml (野村ら, 1992; 野村, 1993)、*R. salmoninarum* が 4.0×10^9 cells/ml (Evelyn *et al.*, 1984a)、IHNV および OMV が $10^{2.1} \sim 10^{4.3}$ および $10^{1.8} \sim 10^{2.1}$ TCID₅₀/ml (吉水ら, 1988a) 程度分離されることが報告されている。体腔内に排卵されるサケ科魚類では体腔液の汚染は卵汚染と直接的に関係し、卵内感染および管理施設の汚染面から考えて、防疫対策上重要な問題である。

本研究の対象にした3菌種のうち、*F. psychrophilum* および *A. salmonicida* では先の報告にみられる $10^6 \sim 7$ CFU/ml 程度の高い生菌数の事例はなかったが、*R. salmoninarum* では Evelyn *et al.* (1984a) の報告と同等の生菌数が観察され、*R. salmoninarum* の生菌数は他の細菌に比べて著しく高いことが確認された。

次に、体腔液が汚染されている雌親魚から採卵した未受精卵内から細菌分離を試みたが、体腔液から *F. psychrophilum* または *R. salmoninarum* が分離されない親魚の卵はもとより、両菌を保有していた親魚から採取した未受精卵内からも分離されなかった。兵藤ら(1995)は、卵表面がBKD菌に汚染されているヤマメ未受精卵の卵内から *R. salmoninarum* の分離を試みているが、本研究と同様に全く分離されていない。さらに、熊谷・縄田(2007, 2008, 2009)は国内で養殖されているサケ科魚類6魚種の未受精卵1,680粒(28群)の卵内容物における *F. psychrophilum* の有無を検査し、全てが陰性の結果を得ている。以上より、排卵された未受精卵が既に *F. psychrophilum* や *R. salmoninarum* に感染している可能性は低いものと考えられる。ただし、*R. salmoninarum* に関しては、卵黄中に本菌が存在し (Evelyn *et al.*, 1984a)、卵内感染が起こる経路として、病原菌に高度に汚染された体腔液中に排卵された

未受精卵の卵門からの侵入、または卵成熟過程において感染が起こる可能性が指摘されている。本研究では、高度に汚染された検体数が僅か 3 検体であったことから、さらに多くの個体を供試して結論を出す必要があると考える。

第 2 節 冷水病原菌 *F. psychrophilum* の卵内感染経路および成立条件

目 的

前節では、排卵前の親魚体内における卵内感染の有無を検討するため、親魚の保菌状態と排卵された未受精卵内からの細菌分離を行った。その結果、*F. psychrophilum* および *R. salmoninarum* の保菌親魚の体腔内に排卵された未受精卵内から細菌は分離できず、排卵されるまでの時期における卵内感染（体内における感染）の可能性は低いと考えられた。

近年になって、 $10^6 \sim 8$ CFU/ml の *F. psychrophilum* で汚染したギンザケ卵 (Kumagai *et al.*, 2000) およびニジマス卵 (Kumagai and Nawata, 2010) を授精・吸水させ場合に卵内感染が成立し、囲卵腔内で *F. psychrophilum* が増殖していることが報告された (Kumagai and Nawata 2010)。これにより、伝播機序を説明する上で重要な侵入部位と条件が明らかになった。囲卵腔内で *F. psychrophilum* が増殖していることから、菌の侵入経路は卵門である可能性が考えられるが、明確にはされていない。このように、採卵および人工授精の過程において卵内感染が成立する条件に関する知見は集まってきているが、経路に関しては依然不明な点が残されている。本節では、人工感染試験に関する知見が比較的揃っている *F. psychrophilum* を対象にして、各種の人工感染試験を行い、卵内感染機序として指摘されているもうひとつの経路（体外における感染）について検討した。

材料と方法

塩類溶液の検討

養殖サケ科魚類の採卵において等調液洗卵法が普及し、採卵した未受精卵の洗浄（洗卵）と媒精用の溶液として使用されている。このため、卵の人工感染試験において、卵汚染用の菌液の調整に使用する塩類溶液として等調液が適当であることを確認するために、PBS (-) と等調液を使用して

- (1) 培養菌液の階段希釈による生菌数測定。
 - (2) 培養菌体の洗浄と生菌数測定。
 - (3) 培養菌体の洗浄 2 時間後の生菌数の測定。
- の 3 条件下で生菌数を測定し、それぞれの生菌数の測定結果を比較検討した。

培養菌体の洗浄操作は 5℃ において 1,800 × g で 5 分間遠心分離を行った後、培地を除去し、塩類溶液に菌体を懸濁させる方法で 2 回行った。洗浄後、細菌培養液に対して 1/5 相当量の各塩類溶液に供試菌を懸濁させたものを生菌数測定用の試料とした。試験にはニジマス病魚から分離した *F. psychrophilum* (06-003 株) およびブラウントラウト病魚から分離した *A. salmonicida* (08-029 株) を供試した。*F. psychrophilum* には改変サイトファーガ液体培地を使用し、15℃、3 日間の培養を行い、*A. salmonicida* はトリプトソイ液体培地 (TSB; 栄研化学) を使用して 20℃、2 日間の培養を行い、それぞれの培養菌液を作製した。生菌数の測定は *F. psychrophilum* では改変サイトファーガ寒天平板培地、*A. salmonicida* では CBB 寒天平板培地を使用した。両菌種ともに平板培地を 15℃ で 7 日間培養し、得られた集落数から生菌数 (CFU/ml) を算出した。

供試菌の培養と感染用菌液の調整

卵の人工感染には、*F. psychrophilum* (06-003 株)、*A. salmonicida* (08-029 株) および *R. salmoninarum* (09-001 株) を供試した。前節同様 *F. psychrophilum* には改変サイトファー

方液体培地を使用し 15℃、3日間、*A. salmonicida*はTSB培地を使用して20℃2日間、*R. salmoninarum*については前培養上清を添加したKDM-2培地(KDM-SMR. s)を使用して15℃、5日間の培養を行い、細菌培養液を作製した。各培養菌体を滅菌等調液(以下、等調液)で2回洗浄し、供試菌培養液に対して1/5相当量の等調液を加え懸濁させたものを人工感染試験における卵汚染用の菌液とした。

人工感染用供試卵

卵の人工感染試験には、長野県水産試験場または民間養魚場で飼育しているニジマス、アマゴ親魚から採取した未受精卵および精液を使用し、各試験の都度3~5尾分を混合して供試した。

未受精卵については、等調液で洗浄(濯ぎ洗卵2回及びシャワー洗卵)を行ってから試験に使用した。また、各試験で未受精卵が対象とする魚病細菌フリーであることを確認するために、体腔液、洗卵後の卵および精液の一部について細菌分離を行い、対象菌が陰性であることを確認した。

卵の人工感染方法

卵人工感染の基本的な方法は次のとおりである。洗浄した未受精卵を400粒ずつ200ml容量ビーカーに収容し、供試菌液2mlを加えて卵を緩やかに攪拌し、卵表面を汚染した。非感染対照区の卵については、菌液の代わりに等調液2mlを加えたのち5分間放置した。この卵に対してニジマス精液を0.2ml加えて授精した後に、各区の卵に滅菌飼育水200mlを加えてから1時間静置して吸水させた(以下、汚染卵授精とする)。なお、試験内容によっては、卵表面を汚染した未受精卵を、授精せずにそのまま未受精卵として吸水させる方法(以下、未受精卵汚染とする)、未受精卵を授精した後に供試菌で汚染させ、その後吸水させる方法(以下、授精卵汚染とする)を行った。

吸水処理後には、ポピドンヨード剤(水産用

イソジン液:明治製菓、以後ヨード剤と称す)の200倍液で15分間卵消毒(BKDの試験においては、100倍液で20分間)後、飼育用のふ化水槽に収容した。

人工感染後21日が経過した時点で、各区から発眼卵60粒を採取し、ヨード剤の200倍液で15分間消毒した。その後、発眼卵を改変サイトファーガ寒天平板培地上で転がし、卵表面からの細菌分離操作を行い、96穴マイクロプレートの各wellに1粒ずつ収容した。滅菌注射針で卵に傷をつけてから、滅菌綿棒で卵を潰して採取した卵内容物を培地に塗抹し、15℃で7日間培養した。培地上に増殖した黄色の集落を対象に、抗*F. psychrophilum*ウサギ血清によるスライド凝集試験およびPCR検査により分離菌を鑑別した。

人工感染卵の飼育

人工感染卵を網籠に収容し、塩化ビニル製の試験用小型孵化水槽(縦20cm×幅10cm×深さ10cm)に収容した。飼育用水は、活性炭で脱塩素処理した水道水であり、ヒーターまたは冷却機を使用して8~12℃の温度範囲に調節した。

卵内からの供試菌分離

人工感染してから20日前後経過し、積算温度(日間平均水温×日数)が200℃を超え、卵が発眼期に達した時期において、各試験区から基本的には卵60粒を採取し、ヨード剤による卵消毒をしてから細菌分離に供した。卵消毒の条件は*F. psychrophilum*および*A. salmonicida*では水産用イソジン200倍液15分間、*R. salmoninarum*では100倍液20分間とした。消毒した卵を対象菌種に応じた寒天平板培地上で転がして卵表面からの細菌分離操作を行った後に、96穴マイクロプレートの各wellに1粒ずつ収容した。

卵内容物の細菌分離方法は、人工感染させた卵が未受精卵(未受精卵汚染)の場合と受精卵(汚染卵授精、受精卵汚染)の場合で異なる方

法を採用した。不受精卵の場合には、注射付滅菌シリンジ (1ml, 23G×1") で吸引採取した卵内容物を、滅菌綿棒を用いて寒天平板培地に塗抹した。また、発眼卵の場合には、滅菌注射針 (23G×1") で卵に傷をつけてから、滅菌綿棒で卵を十分に潰して卵内容物を採取し、培地に塗抹した。

細菌分離に使用した培地は、*F. psychrophilum* では改変サイトファーガ寒天平板培地、*A. salmonicida* では CBB 培地、*R. salmoninarum* では KDM-SMR_s 寒天平板培地を使用した。培養条件は *F. psychrophilum* および *A. salmonicida* では 15℃、7日、*R. salmoninarum* では 15℃、30日間とした。各平板培地上で対象菌の増殖の有無から陽性・陰性を判定した。分離菌の鑑別は *F. psychrophilum* ではスライド凝集試験および PCR 検査、*A. salmonicida* では濃紺色に染まった集落の判別、*R. salmoninarum* ではスライド凝集試験または IFAT を用いた。

卵内感染の成立過程の検討

F. psychrophilum の卵内感染が、単に卵の吸水過程において起こるものか、または精子の侵入も関与する (精子の誘導) ものかどうかを検討するために、ニジマス未受精卵の汚染時期および授精の有無によりそれぞれに異なる3条件で人工感染を行い、発眼期において不受精卵または発眼卵から *F. psychrophilum* の分離を行い、卵内感染の有無を調べた。試験区は、不受精卵汚染区、汚染卵授精区および受精卵汚染区とした。試験は3回行い、各試験における *F. psychrophilum* による卵汚染濃度は、 $10^{8.3}$ と $10^{4.3}$ 、 $10^{8.8}$ と $10^{4.8}$ および 10^{10} CFU/ml とした。

また、卵内から *F. psychrophilum* の分離を行うとともに、発眼率を調べた。なお、不受精汚染区については、白濁していない卵を正常不受精卵としてみなし、この比率を求めた。さらに第3回試験の発眼卵をヨード剤消毒 (200倍液 15分間) し、新たに清浄な飼育水槽に收容し

てふ化率を調べた。

卵内感染の成立時期の検討

F. psychrophilum の卵内感染が、吸水過程において卵門を介して成立するとすれば、いつの時期までかを見極めるために次の試験を行った。受精卵を吸水させ、その後一定の時間が経過した時点で卵を汚染し、発眼期の卵に感染が成立しているかを検討した。卵汚染は汚染卵授精の方法とし、吸水前 (0分後)、吸水2分後、5分後、10分後、30分後および60分後の6区の設定を設けた。吸水操作は、200ml 容量のピーカーに收容した受精卵に対して滅菌飼育水 200ml を入れて静置する方法で行った。各時間が経過した時点で飼育水を排出し、供試菌液 2ml を添加して緩やかに卵を攪拌した。その後再び飼育水 200ml を入れ、60分間吸水させた。

これと併せて、200ml ピーカーに收容した未受精卵に飼育水 200ml を加えて、一旦吸水を開始させ、以後2分、5分、10分および30分経過した時に、飼育水を排出し、0.2ml の精液を混ぜて授精を行い、再び飼育水を添加して十分に吸水させてから飼育水槽へ收容した。発眼期において発育した発眼卵を計数して発眼率を調べた。

卵内感染が成立する汚染環境および濃度条件の検討

F. psychrophilum の卵内感染が成立するための汚染条件を検討するために、2種類の汚染環境について各濃度条件を設けて人工感染試験を行い、感染率の差を検討した。卵の汚染環境として、卵汚染と吸水時の環境水汚染を設定した。卵汚染の方法はこれまでの試験で採用した汚染卵授精方法とし、環境水汚染では、授精した卵に対して卵汚染と同様の供試菌液 2ml を飼育水 200ml に添加し、この汚染飼育中で卵を吸水させた。2回の試験における *F. psychrophilum* の濃度条件は、 $10^{9.9}$ 、 8.9 、 7.9 、 6.9 および $10^{5.9}$ CFU/ml の5段階 (高濃度域の検討) と、 $10^{9.9}$ 、 7.9 、 5.9 、 4.9

表1-2-1 2種類の塩類溶液を使用した*F. psychrophilum*および*A. salmonicida*培養菌体の洗淨および生菌数測定結果

操 作	菌 種	塩類溶液	
		PBS(-)	等調液*
培養菌液の生菌数測定	<i>A. salmonicida</i>	8.3 ^{*2}	8.6
	<i>F. psychrophilum</i>	8.6	8.8
培養菌体洗淨 +	<i>A. salmonicida</i>	8.3	8.3
培養菌体洗淨後2時間静置 +	<i>A. salmonicida</i>	8.6	8.4

*1 等調液の組成: NaCl 9.04g, CaCl₂ 0.26g, KCl 0.24g/L(DW)

*2 生菌数: (log₁₀) CFU/ml

および10^{8.9} CFU/mlの5段階(低濃度域の検討)であった。

結 果

供試菌液の調整に用いる塩類溶液の適性

PBS(-)と等調液を用いて*F. psychrophilum*および*A. salmonicida*培養液の10倍階段希釈による生菌数測定、各培養菌体の洗淨および生菌数測定、並びに培養菌体の洗淨2時間後の生菌数測定結果を表1-2-1に示した。

培養菌液の生菌数測定において、*A. salmonicida*ではPBS(-)による生菌数が10^{8.3} CFU/ml、等調液による生菌数が10^{8.6} CFU/mlであり、*F. psychrophilum*では10^{8.6}および10^{8.8} CFU/mlであった。各塩類溶液で測定された生菌数は同等であった。培養菌体の洗淨および生菌数測定においては*A. salmonicida*ではPBS(-)および等調液の生菌数がともに10^{8.3} CFU/mlであり、*F. psychrophilum*では10^{8.4}および10^{8.7} CFU/mlであった。この操作においても各塩類溶液による測定結果は同等であった。培養菌体洗淨2時間後に生菌数測定した場合でも、*A. salmonicida*ではPBS(-)による生菌数が10^{8.6} CFU/ml、等調液による生菌数が10^{8.4} CFU/mlであり、*F. psychrophilum*では10^{8.0}および10^{8.6} CFU/mlであった。この場合でも、各塩類溶液の測定結果は同等であった。

*F. psychrophilum*の卵内感染経路

3種類の方法により*F. psychrophilum*汚染したニジマス卵内から細菌分離を行った結果を、表1-2-2に示した。

第1回試験では、卵を10^{8.3} CFU/mlの濃度で汚染した条件において、不授精卵汚染区では18.3%、汚染卵授精区では26.7%および授精卵汚染区では40.0%の比率で、卵内から*F. psychrophilum*が分離された。不授精卵汚染区と授精卵汚染区の比率に統計学的有意差($P\chi^2 < 0.01$)が認められた。卵汚染濃度10^{4.3} CFU/mlおよび非汚染条件では、3試験区ともに分離されなかった。

第2回試験では、10^{8.8} CFU/mlの濃度条件において、不授精卵汚染区では6.7%、汚染卵授精区では3.3%および授精卵汚染区では8.3%の比率で、卵内から*F. psychrophilum*が分離された。3区の比率間には統計学的有意差はなかった。

第3回試験では、10¹⁰ CFU/mlの濃度条件において不授精卵汚染区で50.0%、汚染卵授精区では21.7%の比率で、卵内から*F. psychrophilum*が分離され、両比率の間に統計学的有意差($P\chi^2 < 0.01$)が認められた。

以上3回の試験により、ニジマス卵を10^{8.3}、10^{8.8}および10¹⁰ CFU/mlの汚染条件のもとでは不授精卵汚染区、汚染卵授精区および授精卵汚染区ともに*F. psychrophilum*の卵内感染が認められた。

表1-2-2 異なる過程で*F. psychrophilum*汚染したニジマス卵の卵内感染率

試験	菌汚染濃度 (Log ₁₀ CFU/ml)	卵内感染率*1		
		不受精卵汚染区*2	汚染卵授精区*3	受精卵汚染区*4
1	8.3	11/60(18.3%)*7	16/60(26.7%)	24/60(40.0%)*7
	4.3	0/60	0/60	0/60
	—*8	0/60	0/60	0/60
2	8.8	4/60(6.7%)	2/60(3.3%)	5/60(8.3%)
	4.8	0/60	0/60	0/60
	—	0/60	0/60	0/60
3	10.0	30/60(50.0%)*8	13/60(21.7%)*8	ND*9
	—	0/60	0/60	ND

*1 授精・吸水後、積算温度200°Cを経過した発眼期に、正常不受精卵または発眼卵から菌分離した

*2 菌液で汚染した未受精卵を吸水させた

*3 菌液で汚染した未受精卵を授精した後に吸水させた

*4 等調液中で授精した卵を菌液で汚染させた後に吸水させた

*5 生菌数:(log₁₀)CFU/ml

*6 菌液の代わりに滅菌等調液を使用した

*7, *8 両者の比率に統計学的有意差($P\chi^2 < 0.01$)がある

*9 試験せず

*F. psychrophilum*汚染卵の発眼率およびふ化率

*F. psychrophilum*の人工感染試験におけるニジマス卵の発眼率およびふ化率を表1-2-3に示した。

第1回試験においては、不受精卵汚染区の非汚染卵の正常不受精卵率が71.7%であったのに対して、 $10^{4.3}$ CFU/ml濃度で64.0%、 $10^{8.3}$ CFU/ml濃度では67.0%であった。汚染卵授精区では非汚染卵の発眼率が40.7%であったのに対して、 $10^{4.3}$ CFU/ml濃度で38.2%、 $10^{8.3}$ CFU/ml濃度では27.0%であった。受精卵汚染区では、非汚染卵の発眼率が36.3%であったのに対して、

$10^{4.3}$ CFU/ml濃度で38.3%、 $10^{8.3}$ CFU/ml濃度では29.2%であった。このうち、汚染卵授精区の非汚染卵と $10^{8.3}$ CFU/ml濃度における発眼率の間において統計学的有意差($P\chi^2 < 0.01$)が認められた。

第2回試験においては、不受精卵汚染区の非汚染卵の正常不受精卵率が72.4%であったのに対して、 $10^{4.8}$ CFU/ml濃度で69.6%、 $10^{8.8}$ CFU/ml濃度では72.5%であった。汚染卵授精区では非汚染卵の発眼率が78.5%であったのに対して、 $10^{4.8}$ CFU/ml濃度で74.4%、 $10^{8.8}$ CFU/ml濃度では72.9%であった。受精卵汚染区では、非汚染卵の発眼率が81.5%であったのに対して、

表1-2-3 異なる過程で*F. psychrophilum*汚染したニジマス卵の発眼率およびふ化率

試験	菌汚染濃度 (log ₁₀ CFU/ml)	発眼率(%)*1			ふ化率(%)
		不受精卵汚染区	汚染卵授精区	受精卵汚染区	汚染卵授精区
1	8.3	67.0	27.0*3	29.2	NT*5
	4.3	64.0	38.2	38.3	NT
	—*2	71.7	40.7*3	36.3	NT
2	8.8	72.5	72.9	80.1	NT
	4.8	69.6	74.4	76.2	NT
	—	72.4	78.5	81.5	NT
3	10.0	86.7	89.2	ND*4	100
	—	80.7	83.6	ND	97.0

*1 汚染卵授精区および受精卵汚染区では、処理卵に占める発眼卵の比率を示し、不受精卵区では白濁化していない正常な不受精卵の比率を示す

*2 菌液の代わりに滅菌等調液を使用した

*3 両者の比率に統計学的有意差($P\chi^2 < 0.01$)がある

*4 試験せず

*5 検査せず

表1-2-4 ニジマス卵の吸水に伴う*F. psychrophilum*の卵内感染率と発眼率の変化

吸水時間 (分)	卵内感染率 (陽性卵数/標本数:%)	発眼率 (%)
0 (吸水前)	5/80 (6.3%)	48.6%
2	3/80 (3.8%)	15.0%
5	1/80 (1.3%)	3.9%
10	1/80 (1.3%)	1.4%
30	0/80 (0%)	0.0%
60	0/80 (0%)	ND*

* 試験せず

10^{4.8} CFU/ml 濃度で 76.2%、10^{8.8} CFU/ml 濃度では 80.1%であった。3 汚染区ともに、汚染卵の正常不受精卵率または発眼率は対照の非汚染卵の成績と差は認められなかった。

第 3 回の試験においては、不受精卵汚染区の非汚染卵の正常不受精卵率が 80.7%であったのに対して、10¹⁰ CFU/ml 濃度で 86.7%であった。汚染卵授精区では非汚染卵の発眼率が 83.6%であったのに対して、10¹⁰ CFU/ml 濃度で 89.2%であった。また、汚染卵授精区の発眼卵と非汚染対照区の発眼卵のふ化率は、それぞれ 100 および 97%であり、差は認められなかった。

以上 3 回の試験において、卵内感染がみられた試験区の正常不受精卵率または発眼率は、第 1 回試験の汚染卵授精区においてのみ差が見られた以外は、全て非汚染卵の成績と変わらない結果であり、ふ化率にも差は認められなかった。

吸水時間の経過に伴う *F. psychrophilum* の卵内感染率の変化

未受精卵の吸水時間の経過における卵内感染率および発眼率の変化を表 1-2-4 に示した。

F. psychrophilum で卵表面を汚染した未受精卵を吸水させる前の時点では、卵内感染率は 6.3%であり、吸水開始から 2 分経過した卵では 3.8%、5 分および 10 分で 1.3%の比率で感染卵がみられたものの、30 分および 60 分では検出されなかった。未吸水で授精した卵の発眼率が

48.6%であったが、吸水時間の経過にともない発眼率が急速に低下し、10 分後では 1.4%になり、30 分後では発眼卵が得られなかった。

本試験において、未吸水卵および吸水 10 分後までは感染卵および発眼卵を確認することができたが、その後時間が経過した卵では感染卵および発眼卵は認められなかった。

F. psychrophilum の卵内感染が成立する汚染環境条件

10^{9.9~3.9} CFU/ml の *F. psychrophilum* で卵表面を汚染したニジマス卵と、同じ菌液を添加した汚染環境水で吸水させたニジマス卵における卵内感染率の結果を表 1-2-5 に示した。

第 1 回試験においては、卵表面を供試菌液で汚染した卵汚染区の 10^{9.9} CFU/ml 濃度で 35.0%、10^{8.9} CFU/ml で 5.0%、10^{7.9} CFU/ml で 1.7%の比率で感染卵がみられたが、10^{6.9} CFU/ml 以下の濃度および非汚染卵では感染卵はなかった。一方、環境水汚染区では 10^{9.9} CFU/ml 濃度において感染卵が 1.9%みられた。10^{9.9} CFU/ml 濃度における両区の卵内感染率には統計学的有意差 ($P < 0.01$) が認められた。

第 2 回試験においては、卵汚染区の 10^{9.9} CFU/ml 濃度で 23.3%、10^{7.9} CFU/ml で 1.7%の感染卵がみられたが、10^{5.9} CFU/ml 以下の濃度および非汚染の卵ではみられなかった。環境水汚染区では、10^{9.9} CFU/ml 濃度でのみ 3.3%感染卵が

表1-2-5 *F. psychrophilum*で卵表面または環境水を汚染して吸水させたニジマス卵の卵内感染率

試験	菌汚染濃度 (log ₁₀ CFU/ml)	汚染方法	
		卵汚染 ^{*1}	環境水汚染 ^{*2}
1 (高濃度域)	9.9	21/60 (35.0%) ^{*4}	1/60 (1.7%) ^{*4}
	8.9	3/60 (5.0%)	0/60
	7.9	1/60 (1.7%)	0/60
	6.9	0/60	0/60
	5.9	0/60	0/60
	— ^{*3}	0/60	0/60
2 (低濃度域)	9.9	14/60 (23.3%) ^{*5}	2/60 (3.3%) ^{*5}
	7.9	1/60 (1.7%)	0/60
	5.9	0/60	0/60
	4.9	0/60	0/60
	3.9	0/60	0/60
	— ^{*3}	0/60	0/60

*1 ニジマス卵400粒に対して各濃度の菌液2mlで卵表面を汚染した後、飼育水200mlを添加して吸水させた

*2 各濃度の菌液2mlを添加した200mlの飼育水中で、卵を吸水させた

*3 菌液の代わりに滅菌等調液を使用した

*4,5 両試験区の比率に統計学的有意差(Pχ²<0.01)がある

みられた。

以上2回の試験により、*F. psychrophilum*で卵表面を汚染したニジマス卵では汚染濃度が10^{7.9} CFU/ml以上の場合に卵内感染が成立した。また、吸水時の環境水を汚染した場合よりも、卵表面を汚染した場合に卵内感染率が高かった。

考 察

内水面のサケ科魚類養殖において、親魚から採卵して人工授精を行う場合に等調液(田代, 1976; 稲葉ら, 1958)が使用されることから、人工感染試験用の菌液の作製、卵の授精などに使用する塩類溶液の適性を検討した。その結果、培養菌液の洗浄および生菌数測定において、等調液は微生物試験で一般的に使用されるPBS(-)と変わりなく使用できることが確かめられた。

試験1では、*F. psychrophilum*で汚染する時期が異なる3種類のニジマス卵について、感染の有無を検討した。授精しないままの受精卵、*F. psychrophilum*で汚染してから授精した受精卵、授精後に汚染した受精卵のいずれにおいても、汚染が10^{8~10} CFU/ml程度の場合に卵内感染が確認された。各試験の中には、汚染時期が異なる卵の感染率に有意差が認められた事例も

あったが、比率の違いには一定の傾向が認められなかった。よって、試験の再現性については、今後検討の余地が残るものの、3通りの汚染方法において差がないと判断できる。先ずは、不受精卵でも卵内感染が成立したこと、さらには、*F. psychrophilum*による汚染時期が異なる受精卵の感染率にも明瞭な差が認められなかったことから、*F. psychrophilum*の卵内感染は、授精の際に精子の侵入に誘導されて起こるのではなく、吸水過程において*F. psychrophilum*が侵入することにより起こると考えられる。また、正常に発育した発眼卵から*F. psychrophilum*が分離され、陽性卵が混じる卵群の発眼率、ふ化率も対照と同等であることから、卵内感染は卵の発育に影響しないことが明らかとなった。

試験2では、飼育水中において吸水させた卵を経時的に汚染して、卵内感染の有無を調べた。その結果、受精10分後までの時期に汚染した卵では、卵内感染が確認された。これにより、精子が卵内に侵入できる限界の時期と卵内感染が確認できた時期とが一致したことが示され、*F. psychrophilum*の卵内感染は、卵門経由で起きていることが考えられた。

試験3では、供試菌の濃度を10^{7~9} CFU/mlとして卵表面を汚染した場合と吸水時の環境水を汚染した場合における感染率の違いを検討し

た。予め卵表面を *F. psychrophilum* で汚染した卵のほう明らかに高い感染率を示した。卵表面を汚染した試験区でも、吸水用に飼育水を添加した時点で、環境水汚染区と同じ菌濃度になる条件設定であったが、環境水の汚染よりも、卵表面の汚染状態が強く影響することが考えられる。また、汚染濃度に関しては、Kumagai and Nawata (2010) と同様の結果となり、感染試験条件のもとでは 10^{6-7} CFU/ml 程度が成立条件であると考えられた。

以上の試験結果から、*F. psychrophilum* の卵内感染経路は吸水時の卵門経由であり、卵表面が 10^7 CFU/ml 以上の *F. psychrophilum* に汚染されている場合に卵内感染が起こり得ることが明らかになった。

第3節 *F. psychrophilum* 以外の魚病細菌および一般細菌による卵内感染

目 的

第2節では、*F. psychrophilum* による人工感染試験を行い、卵内感染は卵の吸水時に卵門を介して *F. psychrophilum* が侵入することによって起こることが確かめられた。卵表面が高度に汚染された条件であれば、他の魚病細菌でも卵内への侵入が起きる可能性が考えられる。しかし、これまで卵内感染が問題視された魚病細菌は、専ら *R. salmoninarum* および *F. psychrophilum* である。せつそう病については、種苗生産現場で卵内感染が疑われるような発生事例の情報はない。また、野村 (1993) は生菌数 10^5 CFU/ml の *A. salmonicida* に人為汚染したサケ卵から細菌分離を行っているが、卵内からは分離されていない。菌種の違いによって卵内感染の成立の可否が異なるとすれば、その原因が何であるかは不明である。細菌の大きさや形態の違いによる確率の問題であるのか、侵入後に卵内で菌の増殖を左右する現象が起きているのか、などの疑問が生じる。そこで、これま

で卵内感染の問題が指摘されている *R. salmoninarum* と、卵内感染が問題視されていない *A. salmonicida* を対象に人工感染試験を行い、両菌における卵内感染の成立の違いを検討した。

次に、*F. psychrophilum* と *A. salmonicida* による人工感染試験を行い、汚染卵を吸水させた直後から発眼期までの過程において定期的に卵内から細菌分離を行い、卵内における生菌数を経時的に測定し、卵内における細菌の消長を調べた。

さらには、これまでおこなった人工感染試験において、卵内からの細菌分離を行った際に、明らかに卵内で増殖していると思われる一般細菌の分離事例がみられた。このため、分離菌の鑑別および性状試験を実施するとともに、同様の方法により人工感染試験を試み、魚病細菌以外の細菌による卵内感染の有無を検討した。

材料と方法

R. salmoninarum および *A. salmonicida* による人工感染試験

卵内感染が問題視されている *R. salmoninarum*、卵内感染が問題視されていない *A. salmonicida* を対象にして人工感染試験を行った。

感染試験に使用する卵汚染用の供試菌の培養および菌液の調製方法は、第2節に示した方法のとおりである。*R. salmoninarum* は、2009年に県内のアマゴ養魚場の病魚から分離された野外株 (09-001株) であり、*A. salmonicida* も同様に野外株 (08-029株) である。供試卵の種類については、*R. salmoninarum* の試験においてはニジマス卵とし、*A. salmonicida* の試験ではアマゴ卵とした。卵汚染方法は、*A. salmonicida* の試験では不授精卵汚染とし、*R. salmoninarum* の試験では不授精卵汚染および汚染卵授精の2つの方法を行った。

人工感染させた *F. psychrophilum* および *A. salmonicida* の卵内における消長

人工感染により卵内に侵入した細菌の卵内における増殖実態を明らかにするために、人工感染させたニジマス卵を発眼期まで飼育し、それまでの期間中定期的に卵内からの菌分離を行い、卵内感染率および卵内の生菌数の変化を調べた。

卵汚染に使用した供試菌は *F. psychrophilum* および *A. salmonicida* であり、卵の人工感染は未受精卵汚染の方法で行った。人工感染で処理した卵は各菌種とも 1,200 粒であり、人工感染、吸水および卵消毒の一連の操作が終了した段階で、約 200 粒ずつ 6 区分に分けて試験用水槽に收容した。卵内からの細菌分離は、吸水直後 (1 時間吸水させた後に飼育水槽へ收容し、2 時間経過後)、飼育 3 日、7 日、14 日および 21 日目の 5 回行い、各検査時にそれぞれ 60 粒を検査した。

一般細菌による卵内感染の検討

F. psychrophilum および *A. salmonicida* の人工感染試験において、ニジマスおよびアマゴ卵内から分離された 5 菌株 (ニジマス卵由来細菌: No.27, No.10, No.11 および No.25、アマゴ卵由来細菌: No.9) を供試して人工感染試験を行った。5 菌株の培養には TSB (栄研化学) を使用し、15

℃において 2~3 日間培養した。卵汚染用菌液の調整は、*F. psychrophilum* における方法に準じた。供試卵はニジマス卵を使用し、卵の人工感染方法は前節の汚染卵授精の方法を採用した。発眼期における卵内からの細菌分離には TSA 寒天平板培地を使用し、分離操作は *F. psychrophilum* における操作に準じた。

また、供試菌株の鑑別・同定を次の方法により行った。常法によりグラム染色 (フェイバー・G セット F: 日水製薬) を行ってグラム染色性、菌形およびサイズを調べた。さらに、一般細菌簡易同定キット (API ZONE: シスメックス・ピオメリユー社) を用いて性状試験を行い、数値プロファイルから求めたインデクスにより細菌を同定した。キットによる培養は 15℃で 48 時間行い、反応結果を判定した。

結 果

R. salmoninarum および *A. salmonicida* の卵内感染

ニジマスまたはアマゴの未受精卵を用いて行った *R. salmoninarum* および *A. salmonicida* の人工感染試験における卵内感染率を表 1-3-1 に示した。

R. salmoninarum の試験においては、 $10^{10.2}$ CFU/ml 濃度条件で 18.3% の感染卵がみられたが、

表 1-3-1 *R. salmoninarum* および *A. salmonicida* で汚染したニジマスおよびアマゴ卵の感染率

菌種 (供試卵)	試験	菌汚染濃度 (log ₁₀ CFU/ml)	卵内感染率 (陽性卵数/標本数, %)	
			未受精卵汚染*1	汚染卵受精*2
<i>R. salmoninarum</i> (ニジマス卵)	1	10.2	11/60 (18.3%)	ND*5
		5.2	0/60	ND
		—*3	0/60	ND
	2	10.3	31/60*4 (51.7%)	14/60*4 (23.3%)
		5.3	ND	0/60
		—	ND	0/60
<i>A. salmonicida</i> (アマゴ卵)	—	9.0	0/60	ND
		7.0	0/60	ND
		5.0	0/60	ND
		—	0/60	ND

*1 未受精卵を菌汚染した後に吸水させて飼育し、発眼期に正常未受精卵から菌分離した

*2 菌汚染した未受精卵を受精した後に吸水させて飼育し、発眼卵から菌分離した

*3 汚染用菌液の代わりに滅菌等調液を使用した

*4 両者の比率に統計学的有意差 ($P \chi^2 < 0.01$) がある

*5 試験せず

$10^{5.2}$ CFU/ml 濃度および非汚染卵では検出されなかった。*A. salmonicida* の試験においては、3 汚染濃度条件および非汚染卵ともに感染卵は検出されなかった。

人工感染させた *F. psychrophilum* および *A. salmonicida* の卵内での消長

F. psychrophilum または *A. salmonicida* 汚染したニジマス卵の卵内感染率および卵内生菌数の経時的変化について、第1回試験の結果を図1-3-1に、第2回試験結果を図1-3-2に示した。

第1回試験においては、*F. psychrophilum* 汚染卵では、吸水直後から発眼期(21日)までの間 0~6.7%の比率で感染卵がみられた。卵内の生菌数は、吸水直後では $10^{0.5}$ CFU/粒であり、3日では $10^{1.0} \sim 10^{2.5}$ CFU/粒、14日では $10^{2.4} \sim 10^{4.5}$ CFU/粒、21日では $10^{6.1}$ CFU/粒であり、飼育日数の経過に伴い卵内の生菌数が増加した。一方、*A. salmonicida* 汚染卵では、吸水直後から7日まで1.7%の比率で感染卵がみられ、卵内の生菌数は $10^0 \sim 10^{1.0}$ CFU/粒であったが、14日および21日には感染卵は全く検出されなかった。

第2回試験においては、*F. psychrophilum* 汚染卵では、吸水直後から発眼期(21日)までの期間において 33.3~50.0%の比率で感染卵が認められた。卵内の生菌数は、吸水直後では $10^0 \sim 10^{1.5}$ CFU/粒(平均値 $10^{1.0}$)であり、3日では $10^{1.7} \sim 10^{3.9}$ CFU/粒(平均値 $10^{3.2}$)、7日では $10^{3.1} \sim 10^{6.7}$ CFU/粒(平均値 $10^{6.0}$)、14日では $10^{2.4} \sim 10^{4.5}$ CFU/粒(平均値 $10^{6.4}$)、21日では $10^{5.2} \sim 10^{7.8}$ CFU/粒(平均値 $10^{6.9}$)であり、飼育日数の経過に伴い生菌数が増加した。一方、*A. salmonicida* 汚染卵では、吸水直後で 10.0%、3日では 5.0%の比率で感染卵がみられたが、7日以後感染卵は検出されなかった。卵内の生菌数は、吸水直後では $10^0 \sim 10^{1.8}$ CFU/粒であったが、3日では $10^{0.3}$ CFU/粒に減少した。

以上の試験において、*F. psychrophilum* 汚染卵では吸水直後から21日までの間において感染卵がみられ、しかも卵内生菌数が増加した。一方、*A. salmonicida* 汚染卵では3~7日までには感染卵がみられたが、21日(発眼期)には全く検出されなくなった。卵内生菌数は、*F. psychrophilum* が増加したこととは逆に、減少傾向であった。

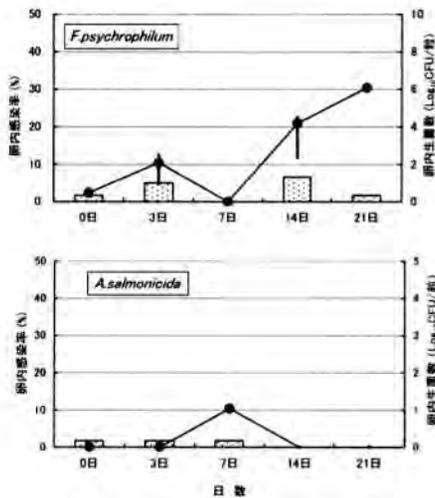


図1-3-1 *F. psychrophilum* および *A. salmonicida* で汚染したニジマス卵内の感染率および生菌数の経時変化 (試験1)

■■■■■ 卵内感染率 (%)
 ■■■■■ 卵内生菌数の範囲 (Log₁₀CFU/粒)
 ● 卵内生菌数の平均値
 ■■■■■ ニジマス卵の汚染濃度
F. psychrophilum 8.4(Log₁₀)CFU/ml
A. salmonicida 9.3(Log₁₀)CFU/ml

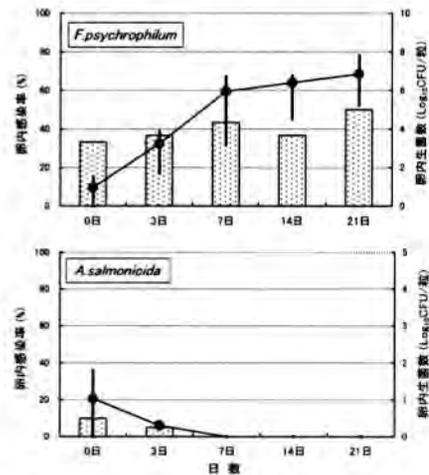


図1-3-2 *F. psychrophilum* および *A. salmonicida* で汚染したニジマス卵内の感染率および生菌数の経時変化 (試験2)

■■■■■ 卵内感染率 (%)
 ■■■■■ 卵内生菌数の範囲 (Log₁₀CFU/粒)
 ● 卵内生菌数の平均値
 ■■■■■ ニジマス卵の汚染濃度
F. psychrophilum 10.0(Log₁₀)CFU/ml
A. salmonicida 9.5(Log₁₀)CFU/ml

一般細菌による卵内感染の成立

卵由来の一般細菌の性状試験および同定結果を、表1-3-2に示した。全ての分離菌は、グラム陰性の桿菌であった。簡易同定キット (API20NE) の性状試験結果から得られた数値プロフィールの検索により同定された細菌の種類は、*Comamonas* 属が2株、*Pseudomonas* 属が1株、*Sphingomonas* 属が2株であった。

5菌株の菌液で汚染した各ニジマス卵の卵内感染率の結果を表1-3-3に示した。卵由来細菌No.9の $10^{9.5}$ CFU/ml濃度で45.0%、No.27の $10^{9.5}$ CFU/ml濃度で26.7%、No.10の $10^{9.9}$ CFU/ml濃度で3.3%、No.11の $10^{9.6}$ CFU/ml濃度で6.7%およびNo.25の $10^{9.4}$ CFU/ml濃度で26.7%の比率で感染卵がみられた。卵由来細菌No.9およびNo.27については、それぞれ $10^{5.5}$ CFU/mlの濃度条件でも卵を汚染したが、感染卵は検出されなかった。また、対照の非汚染卵では卵内感染卵は検出されなかった。

考察

本節では、*F. psychrophilum* の人工感染試験結果の再現性を検討するために、*R. salmoninarum* および *A. salmonicida* による人工感染試験を行った。*R. salmoninarum* では、*F. psychrophilum* と同様に卵内感染が成立することが確認できた。 10^{10} CFU/ml 程度の高濃度では成立したが、低濃度の汚染卵では卵内から菌が分離されないことも *F. psychrophilum* と同様であった。しかし、*A. salmonicida* では発眼期に検査した卵内からは全く菌は分離されなかった。

そこで、この違いの原因を確かめるために、それぞれ *F. psychrophilum* と *A. salmonicida* で汚染した卵を飼育し、卵内における両菌の動態を追跡した。熊谷・縄田 (2008) および Kumagai and Nawata (2010) は、*F. psychrophilum* で汚染したニジマス卵内の生菌

表1-3-2 ニジマス、アマゴ卵内から分離された一般細菌の性状および同定結果

試験項目・方法	供試菌				
	No.9	No.27	No.10	No.11	No.25
グラム鑑別	-				
菌の形態、特徴	形態	長桿菌	短桿菌	長桿菌	長桿菌
	大きさ(幅×長さ μm)	0.3×1.5~2.5	0.5~0.6×1.2~2.5	0.3×1~1.5	0.3×1.2~2.2
菌集落の形状	運動性	+			
	色	黄白色	黄土色	黄色	黄色
培養性	形状	円形、波状	円形、円滑	円形、波状	円形、波状
	TSA	+	+	+	+
AP20NE	BHI	+	+	NT ³⁾	NT
	改変CY ¹⁾	+	+	+	+
菌集落の形状	感受性(MH)	+	+(黄緑蛍光色)	NT	NT
	硝酸カリウム	-	+	+	+
培基	トリプトファン	-	-	-	-
	ブドウ糖	-	-	-	-
糖類	L-アルギニン	+	+	-	-
	尿素	-	-	-	-
酵素	エスクリン	-	-	+	+
	ゼラチン	-	-	-	-
糖類	α-D-ガラクトース	-	-	+	+
	ブドウ糖	-	+	+	+
糖類	L-アラビノース	-	+	+	-
	D-マンノース	-	+	-	+
糖類	D-マンニトール	-	+	+	-
	N-アセチル-D-グルコサミン	-	+	+	-
糖類	マルトース	-	-	-	+
	グルコン酸カリウム	-	+	-	-
糖類	n-カプリン酸	+	+	-	-
	アジピン酸	-	-	-	-
糖類	α-リンド酸	+	+	-	+
	クエン酸ナトリウム	+	+	-	+
糖類	酢酸フェニル	-	+	-	-
	オキシダーゼ試験	+	+	-	+
同定結果	数値プロフィール	0100055	1147557	1463300	1462205
	菌種名 ²⁾	<i>Comamonas testostearum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
同定結果	同定確立(% ID)	86.4	99.8	99.8	99.5
	Tインデックス	0.67	0.81	0.74	0.64
同定結果	同定精度	Acceptable identification	Very good identification	Very good identification	Very good identification
	同定精度	Acceptable identification	Very good identification	Very good identification	Low discrimination

¹⁾ 牛胎児血清 (FBS) 5% 添加

²⁾ インデックスに2~3菌種が記載されている場合には、最初に記載されている菌種名を示した

³⁾ 試験せず

表1-3-3 卵内から分離された一般細菌で汚染したニジマス卵の卵内感染率

菌株	卵汚染濃度 (log ₁₀ CFU/ml)	卵内感染率 (陽性卵数/標本数：%)
卵菌No.9	9.5	27/60 (45.0%)
	5.5	0/60
卵菌No.27	9.5	16/60 (26.7%)
	5.5	0/60
卵菌No.10	9.9	2/60 (3.3%)
卵菌No.11	9.6	4/60 (6.7%)
卵菌No.25	9.4	16/60 (26.7%)
対照	—*	0/60

* 菌液の代わりに滅菌等調液を使用した

数の変化を調べ、発眼期までに1粒の卵内で10⁷ CFU/粒以上に増殖することを報告している。2回の試験から、*F. psychrophilum*汚染した卵内では日数の経過に伴い生菌数が増加し、発眼期には10⁶~⁸ CFU/粒程度まで増殖していることが確認され、熊谷らの報告を裏づけるものとなった。これに対して、*A. salmonicida*汚染卵では、吸水直後の卵内から*A. salmonicida*が分離され、本菌が卵内に侵入していることが確認できた。しかし、日数が経過しても卵内の生菌数が増加する傾向は見られず、試験1では14日以降に、試験2では7日以降には全く分離されず、2回の試験ともに同じ傾向であった。この結果から、*A. salmonicida*は一旦卵内に侵入するものの卵内では増殖せず、次第に死滅することが推察される。

魚卵には、リゾチーム、レクチン、ペルオキシダーゼなどが存在し（工藤, 1983, 2000; Shiina *et al.*, 2002; Tateno *et al.*, 1998）、卵膜にはレクチン（岩松, 2004）が、卵内にはリゾチームおよびペルオキシダーゼ（工藤 1983, 2000）が含まれていることも報告されている。近年、魚類や無脊椎動物におけるこれら物質の生体防御機能に関して多くの研究がなされている（森・神谷, 1995）。リゾチームについては、Yousif *et al.* (1994) が、サケ科魚類の卵から抽出したリゾチームに対して *R. salmoninarum* は耐性であり、*A. salmonicida* は感受性である

ことを報告している。また、Brown *et al.* (1997) も鶏卵白リゾチームに対して *F. psychrophilum* は耐性であり、*A. salmonicida* は感受性であることを報告している。両研究ともに、供試菌の耐性の違いが卵内感染の可否に関連性があることを指摘している。このように、卵膜内に侵入した細菌が卵膜内や卵膜と接する卵膜にある生体防御物質の影響を受けることが考えられ、細菌が増殖または死滅する理由を検討する上で、重要な手がかりになると考えるが、詳細は今後の検討課題として残った。

ところで、一般細菌による人工感染試験で、卵表面の汚染度が高い場合には、一般細菌の中にも *F. psychrophilum* や *R. salmoninarum* と同様に卵内へ侵入し、増殖する細菌が存在することが明らかになった。魚類病原細菌ではないことから、仮に卵内感染が起きても、実際の被害につながることは考えにくい。この結果は、卵表面の汚染がひどい場合には、どのような細菌種であっても卵内への侵入が起こり得ることを示しており、*F. psychrophilum* や *R. salmoninarum* の感染試験結果とともに、卵内感染機序を検討する上で重要な知見であると考えられる。

第4節 走査型電子顕微鏡によるニジマス卵門の形態観察

目的

本章第2節における *F. psychrophilum* の人工感染試験において、卵内感染は、卵表面に存在した細菌が、卵の吸水過程において卵門を經由して物理的に侵入することによって起こることが明らかになった。授精をしない未受精卵でも卵内感染が成立したこと、受精卵（発眼卵）が得られる吸水10分後の時期まで感染が成立したことは、感染経路を説明する上での重要な知見である。サケ科魚類の卵は、体液と等調な生理食塩水中では付活しないが、淡水や低調な塩類溶液中に置かれた場合には活性化し、吸水・硬化が進む（山本, 1958）。しかも、卵門が閉じる時間について、メダカ卵では5分で完全に閉じ（岩松, 1997）、サケ卵では10分後には閉口が進むことが報告されている（Kobayashi and Yamamoto, 1993）。サケの卵門管部分が閉じる時間と、卵内感染が成立する時間とが一致することから、ニジマス卵を供試して、吸水時間の経過に伴う卵門形態の変化および病原菌で汚染した卵門の状態を電子顕微鏡により観察した。

材料と方法

ニジマス未受精卵の吸水処理と卵の固定

長野県水産試験場で飼育しているニジマス雌親魚（2尾）から得た未受精卵を標本作製のために使用した。また、受精卵標本作製するために、2尾の雄から採取した精液を使用した。卵の固定には、電子顕微鏡用70%グルタルアルデヒド液（和光純薬）をPBS（-）で希釈した2%溶液を使用した。

未受精卵の吸水過程における卵門の形態変化を観察するために、未受精卵200粒を200ml容量のビーカーに入れ、飼育水200mlを加えて吸水させた。吸水開始から2分、5分、10分、30

分および60分が経過した各時期に、10粒ずつ取り出して固定液10ml中に収容し、卵を48時間以上固定した。また、少量の等調液とともにビーカーに入れた未受精卵に対して、精液を加えて授精させた卵10粒も固定し、受精卵標本とした。

病原菌汚染卵の作製

病原菌で卵表面が汚染された未受精卵の卵門を観察するために *F. psychrophilum*、*R. salmoninarum* および *A. salmonicida* による汚染未受精卵を作製した。供試菌の培養（培地、条件など）は前節における方法に準じた。各培養菌体を滅菌等調液で1回洗浄した後に、ろ過除菌したニジマス体腔液に懸濁させ、汚染体腔液を作製した。そして、未受精卵10粒を供試菌汚染体腔液中に5分間浸漬した後に固定した。

観察用卵膜標本の作製

実体顕微鏡下で固定卵の卵門の位置を確認してから、注射針（テルモ 25G×1"）を使用して、卵門部を含む2×2mm四方程度の卵膜を固定卵から切り取った。切り取った卵膜片を次の手順により脱水した後、2～3時間の凍結乾燥を行った。銅ベースの導電テープを使用して卵膜標本を試料台へ貼り付け、金蒸着を施し、SEM観察を行った。脱水操作は以下のとおりである。

- ① PBS（-）2時間、2回
- ② 70%エチルアルコール 2時間
- ③ 80%エチルアルコール 2時間
- ④ 90%エチルアルコール 2時間
- ⑤ 100%エチルアルコール 2時間、2回
- ⑥ t-ブチルアルコール・エチルアルコール混液（1:2）2時間
- ⑦ t-ブチルアルコール・エチルアルコール混液（1:1）2時間
- ⑧ t-ブチルアルコール・エチルアルコール混液（2:1）2時間
- ⑨ t-ブチルアルコール 1時間、2回

SEM観察

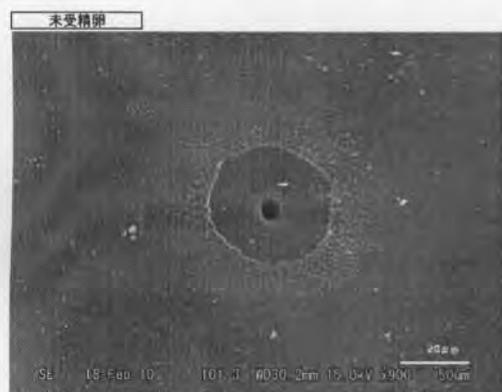
卵門の観察は、(独)水産総合研究センター養殖研究所札幌魚病診断・研修センターにおいて、走査型電子顕微鏡(日立社製 S-3500N)を使用して行った。

結果

走査型電子顕微鏡(SEM)で観察したニジマス未受精卵、受精卵、人為吸水卵および病原菌汚染卵の卵門の形態を図1-4-1~1-4-4に示した。SEMでみられた卵門における観察所見は、以下のとおりである。

未受精卵:

卵門前庭の直径は31.9~43.8 μm で、卵門管のサイズは上部直径が5.7 μm であり、下部は3.3 μm であった。また、卵原形質側(裏側)から



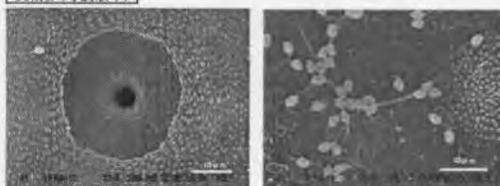
(A: 卵門および周辺の卵膜)



(B: 卵門管内の拡大図)

(C: 卵門管底の内口部)

受精卵(等調液中)



(A: 卵門管内に侵入した精子)

(B: 卵膜表面に付着した精子)

図1-4-1 ニジマス未受精卵および受精卵の卵門

卵膜を観察したところ、卵門管底の内口の直径は2.9 μm であった。卵門周辺の卵膜表面は凹凸状に見えるが、さらにその周辺になると特別な構造は観察されず、平滑な状態であった。また、卵門以外には卵内に通じていると思われる小孔状の形態は観察されなかった。

受精卵:

等調液中で授精したニジマス卵の卵門管から精子の尾部(鞭毛)が出ている状態が観察でき、中には複数の精子が侵入している状態が観察された。また、卵膜表面に付着した精子が観察された。ニジマス精子の頭長は2.6 μm 、頭幅は2.0 μm であった。

吸水5分後:

卵門管上部の直径は5.8 μm であり、未受精卵のサイズと変わらなかったが、下部の直径は2.2 μm であり、やや小さくなっている状態が観察された。また、吸水現象の進行に伴い、卵門管から吹き出された卵腔内物質が卵門前庭に付着している状態が観察された。

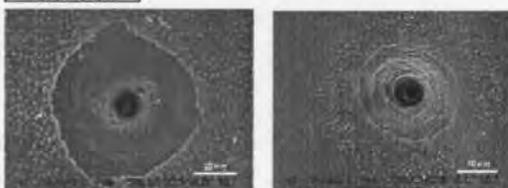
吸水5分後



(A: 卵門管内の拡大図)

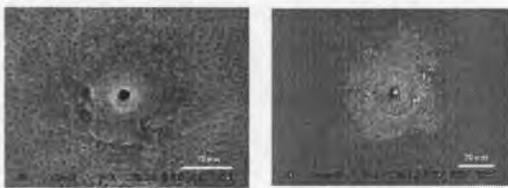
(B: 卵腔内物質が吹き出された卵門)

吸水10分後



(A: 卵門管内部の閉塞が進んだ卵門)

(B: 内部の閉塞があまり進んでいない卵門)



(C: 卵門管底の内口部)

(D: 卵腔内物質が吹き出された卵門および周辺)

図1-4-2 吸水5、10分後における未受精卵の卵門

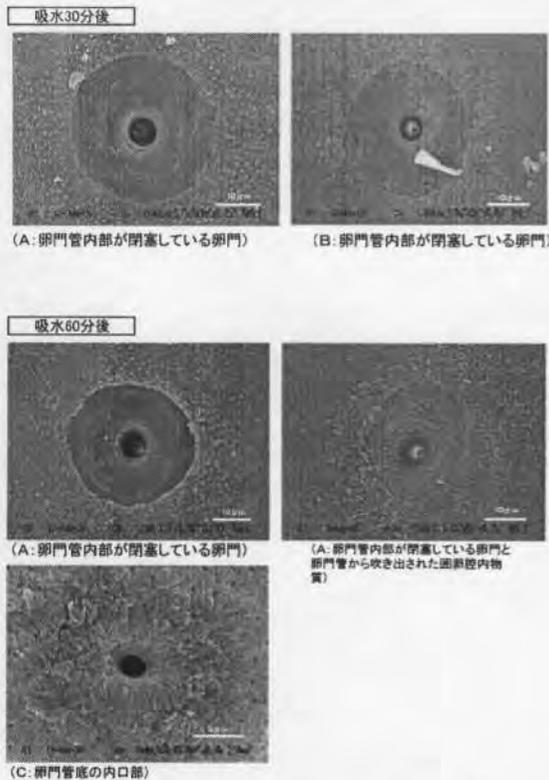


図1-4-3 吸水30、60分後における未受精卵の卵門

吸水 10 分後：

卵門管上部の直径は 6.4~7.1 μm で、変化がなかった。卵門管下部内が何らかの物質で満たされて閉塞し、開口部分（直径 1.4 μm ）が僅かにみられる状態の卵がみられた。しかし、中には下部直径が 3.2 μm と、変化がみられない卵もあった。卵門管底の内口の直径は 2.9 μm であり、変化がなかった。また、吹き出された卵腔内物質が卵門周辺にまで広がっている状態の卵もみられた。

吸水 30 分後：

卵門管上部の直径は 5.4~6.7 μm で変化がなかった。卵門管下部内の閉塞が進み、僅かに開口している部分の直径は 0.7~0.9 μm であった。

吸水 60 分後：

卵門管上部の直径は 4.9 μm でこれまでと変わりがなかった。卵門管下部内の閉塞はさらに著しくなり、極僅かに開口していると思われる不定形の穴が観察された。卵門管底の内口の直径は 2.5 μm であり、これまでと変わりがなかつ

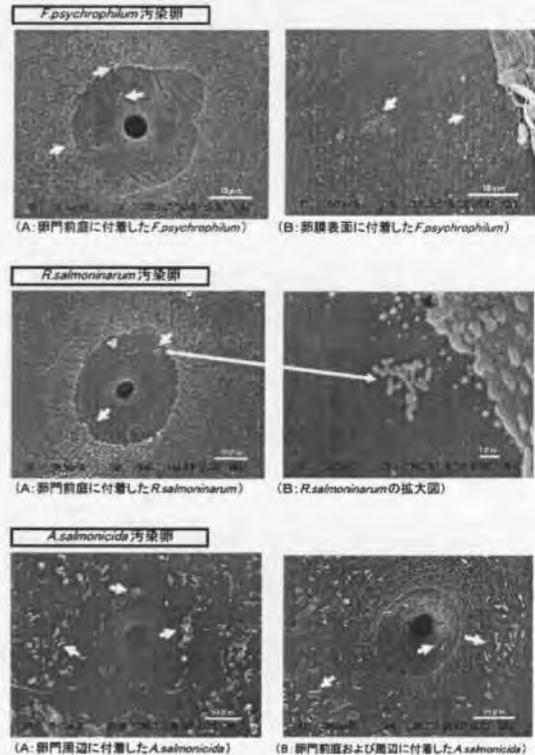


図1-4-4 *F. psychrophilum*、*R. salmoninarum* および *A. salmonicida* で汚染したニジマス卵門の状態 (●: 矢印は、細菌の位置を示す)

た。

供試菌汚染卵：

F. psychrophilum、*R. salmoninarum* または *A. salmonicida* を懸濁させた体腔液で卵表面を汚染した未受精卵では、卵膜表面、卵門前庭内に付着している細菌が観察された。*F. psychrophilum* および *R. salmoninarum* 汚染卵の表面では、多くの細菌は観察されなかったが、*A. salmonicida* 汚染卵の表面には多数の付着菌が観察された。ニジマス卵門管のサイズは、上部の直径が 5~7 μm で、卵門管底の内口の直径が 2~3 μm であり、*F. psychrophilum*、*R. salmoninarum* および *A. salmonicida* のいずれも卵門管内を通過することが可能であることが観察された。

考 察

本研究において観察したニジマス未受精卵では、卵門前庭の大きさ（直径）が 40 μm 程度で

あり、卵門管上部直径が $5\mu\text{m}$ 、下部直径が $3\mu\text{m}$ であった。魚類の卵門形態については、岩松(2004)が多様な魚類の情報を整理して紹介しており、今回観察された結果もこの中で紹介されているニジマスの観察値と同程度であった。

飼育水中に置いて吸水させたニジマス卵では、10分後には卵門管内が閉塞しつつある状態の卵が観察され、30および60分後には卵門管内(下部と思われる)がほとんど閉塞している状態が観察された。卵門管上部や卵門管底の内口が吸水に伴って閉じるような変化ではなく、卵門管内に物質が詰まるような状態であった。10分後の卵では、未受精卵と同程度に開口した卵門管が観察される卵もあること、30分後には卵門管内の閉塞が進行し、60分後にはほとんど閉口に近い状態であることが観察された。Kobayash and Yamamoto (1993)は、低調な塩類溶液中に置いたサケ卵門の変化を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察し、10分後には卵門管下部の広さが $1/3$ 程度に狭まっており、60分後には卵門管の下部域(卵門管の下部 $1/3$ の部分)が閉塞している状態を観察している。よって、ニ

ジマス卵でもサケ卵と同じように卵門の形態変化が起きていることが分かった。このSEM観察では、これまでの感染試験によって得られた卵内感染経路に関する考えを、形態面においてもさらに支持するものであると考える。

また、卵形成期の卵母細胞の卵膜には卵膜孔管 pore canal ($0.2\sim 0.4\mu\text{m}$)が貫通しており、この小孔を介して卵黄前駆物質が卵細胞質内へ取り込まれる。そして、排卵が近づき、卵形成が終了する頃から卵膜孔管が不明瞭になるとされている(高野, 1989)。卵門周辺の卵膜表面を観察したが、卵内に貫通していると思われるような卵膜孔管は観察されなかった。観察したニジマス卵は排卵された卵であり、この時期の卵膜では卵膜孔管は既に消失していた。

さらに、供試菌汚染卵の観察から、ニジマスの卵門は細菌が侵入するには十分な口径サイズであり、吸水が進行して卵門管内が閉塞するまでに30分以上の時間を要すると考えられることから、卵内感染が卵門を介して起きることが容易に推察される。

第2章 養殖サケ科魚類の人工採卵における等調液洗卵法の卵表面除菌効果

第1章では、卵を用いて *F. psychrophilum* による人工感染試験を行い、卵内感染機序について検討した。その結果、卵表面が高度 (10^7 CFU/ml 以上) に汚染された未受精卵は人工授精の吸水過程において卵表面の細菌が卵門を經由して侵入することが明らかになった。ギンザケ卵 (Kumagai *et al.*, 2000) では 10^8 CFU/ml、ニジマス卵 (Kumagai and Nawata 2010) では 10^6 CFU/ml 以上の細菌濃度で卵表面が汚染されている場合に卵内感染が成立する。試験感染の条件下ではあるが、卵表面の高度細菌汚染は卵内感染が成立するための重要な要因であると考えられる。

本研究の第1章において、産卵親魚の体腔液中の生菌数を調べたところ、*R. salmoninarum* 保菌魚の全てが $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml にも達した。*F. psychrophilum*、*A. salmonicida* では最高でも 10^4 CFU/ml レベルであったが、*A. salmonicida* では野村ら (1992) が 10^5 CFU/ml レベルの保菌事例を、*F. psychrophilum* では熊谷・縄田 (2007, 2008) が 10^7 CFU/ml レベルの保菌事例があることを報告している。体腔液が、人工感染試験で卵内感染が成立するレベルと同等もしくはそれ以上の生菌数である親魚から採卵された卵の表面は、これらの病原体に汚染され、卵内感染の危険性が非常に高いと考えられる。

内水面のサケ科魚類養殖においては、採卵の際に生じる潰卵が受精を阻害することから、採卵した卵を人工授精する前に、等調液で洗浄する等調液洗卵法 (田代, 1976; 稲葉ら, 1958) が普及している。親魚から採卵 (搾出) した卵には糞、血液、卵殻および過熟卵などが混じる。このため、ボールなどの容器に収容した未受精卵に等調液を加えて攪拌し、上清とともに固形物を洗い流す洗浄 (以下、濯ぎ洗卵とする) を行ってから、ザルに移し換えた卵に対して等調液をシャワー状に散布する洗浄 (以下、シャワー洗卵とする) が行われる。

等調液洗卵法は、受精率の向上を目的として普及している作業であるが、洗卵によって病原体を多量に含んでいる体腔液が洗い流され、卵表面が清浄な状態になることによって卵内感染のリスクが低下していることが考えられる。第1節では、*F. psychrophilum* を主な対象として、採卵作業で行われている等調液洗卵法の除菌効果を定量的に明らかにするとともに、等調液洗卵法による卵内感染の防除効果について検討した。第2節では、養殖作業現場において応用試験を行い、等調液洗卵法の除菌効果について検証した。第3節では、長野県内でニジマス、在来マス類の採卵を行っている養魚場で実際に行っている等調液洗卵法の実態を調査した。

第1節 等調液洗卵法の除菌およびウイルス除去効果

目 的

産卵期のサケ科魚類親魚は、時に体腔液中に様々な病原体を保有しており、その濃度は 10^6 CFU/ml 以上に及ぶ例がある (野村ら, 1992; 野村, 1993; Evelyn *et al.*, 1984a, 熊谷・縄田, 2007, 2008)。このような親から採卵された卵を授精し、飼育した場合には卵内感染が起きる可能性があり、感染リスクを低下させるための対策が必要である。

そこで、卵の汚染度を下げることとして、内水面のサケ科魚類養殖の人工採卵において普及している等調液洗卵法に着目した。ニジマスなどのサケ科魚類は体腔内に排卵するため、卵は親魚体内で体腔液と混合し、かつ体腔液とともに採卵 (搾出) される。体腔液が汚染されていた場合には、卵表面も汚染されることになる。しかし、養魚場では通常人工授精の前に洗卵作業が行われるので、卵表面の病原体は洗い流されてしまい、卵内感染の機会が減少してい

ることが考えられる。このため、本節では等調液洗卵法の除菌効果が実際にどの程度であるかを把握するとともに、除菌による卵内感染の防除効果について検討した。

材料と方法

供試ニジマス卵および体腔液

長野県内の民間養魚場のニジマス雌親魚4尾から得た未受精卵および体腔液を洗卵および卵感染の試験に供した。未受精卵は、滅菌等調液 (NaCl 9.04g, KCl 0.24g, CaCl₂ 0.26g/蒸留水 1L で3回洗浄後、試験に供した。

体腔液は、採卵の際にステンレス製ザルを用いて採取し、供試菌液およびウイルス液の作製に用いた。*F. psychrophilum* および *A. salmonicida* の洗卵試験にはそのまま供試し、IHNV および OMV の洗卵試験には、体腔液中のウイルスの混入を避けるため、直径15cmのガラスシャーレに体腔液40mlを入れ、紫外線ランプ (15W) の30cm下で10分間紫外線 (以下、UVとする) を照射した後に供試した。また、*F. psychrophilum* の卵感染試験では、体腔液に混じる一般細菌を除くために、孔径0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過除菌した体腔液を用いた。なお、洗卵試験用の無処理体腔液および卵感染試験用のろ過体腔液の一部を、牛胎児血清 (FBS) を5%添加した改変サイトファーガ寒天平板培地とCoomassie brilliant blue (CBB) 培地 (野村・吉水, 2006) に塗抹して *F. psychrophilum* および *A. salmonicida* が存在しないことを確認した。さらに、ウイルス洗卵試験に用いたUV照射処理体腔液をRTG-2細胞に接種してIHNVおよびOMVが分離されないことを確認した。

供試細菌およびウイルス液の作製

供試細菌は、*F. psychrophilum* (06-003株) および *A. salmonicida* (08-029株) を供試した。*F. psychrophilum* については、改変サイトファ

ーガ液体培地 (FBS5%添加) で15 $^{\circ}$ C、3日間培養した培養菌液を1,800 \times g、5分間の遠心分離後、上清を捨て、滅菌等調液で2回洗浄した後に、当初の培養液体培地に対して1/5量の滅菌等調液に懸濁させたものを、*F. psychrophilum* 菌液とした。*A. salmonicida* については、TSB培地で20 $^{\circ}$ C、2日間培養して得られた菌体について、*F. psychrophilum* と同様に洗浄を行い、*A. salmonicida* 液を作製した。

ウイルス材料としては、ニジマス病魚から分離したIHNV (RtNag-9612株) および同じくニジマス病魚から分離したOMV (RtNag-0010株) を使用した。IHNVについては、RTG-2細胞にM.O.I=1で接種し、CPEが発現して細胞が培養器壁から剥離し始めた時に、培養液を孔径0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過したものをIHNウイルス液とし、試験に供するまで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。OMVについては、RTG-2細胞に接種 (M.O.I=0.1) して培養し、ウイルスの回収と保存についてはIHNVと同様に行った。

洗卵工程別の除菌量

洗卵操作は、飼育現場で行われている洗卵作業に基づき、濯ぎ洗卵を2回、シャワー洗卵を1回行う試験と、シャワー洗卵のみを行う試験を行った。洗卵の各工程別の生菌数およびウイルス感染価を測定し、等調液洗卵における除菌および除去効果を調べた。なお、各病原体材料についてそれぞれ個別に洗卵試験を行った。まず、無処理体腔液またはUV照射処理体腔液30mlに対して3mlの供試菌液またはウイルス液を添加して汚染体腔液を作製した。次いで、ピーカー (500ml容量) にニジマス未受精卵を1,000粒入れ、汚染体腔液を15ml加え、汚染卵を作製した。

等調液洗卵は、汚染卵に滅菌等調液100mlを加え、滅菌綿棒で攪拌しながら濯ぎ洗卵をした後に上清を捨てる操作を2回行った。次に、卵を小型ステンレス製ザルに収容して液体を除去し、ザル内の卵に対して100mlの滅菌等調液を

シャワー状に散布して洗卵した。その後、十分に卵の水分をとり、滅菌等調液 30ml とともに卵をピーカーに收容した。シャワー洗卵を単独で行った試験では、汚染体腔液を添加した未受精卵を小型ステンレス製ザルに收容してから、同じ方法でシャワー洗卵を行った。シャワー洗卵に使用した容器は、プラスチック製の試験用洗淨瓶（容量 100ml または 500ml）に水道用シャワー口を取り付けて自作したものである。

洗卵による除菌効果を調べるために、洗卵前では汚染卵付着の体腔液を 1ml、また各洗卵工程では卵付着の等調液を 1ml 採取し、生菌数またはウイルス感染価を測定した。

シャワー洗卵強度の違いによる除菌効果

無処理体腔液 60ml に対し、6ml の *F. psychrophilum* 菌液または 6ml の *A. salmonicida* 菌液を添加して、それぞれの汚染体腔液を作製した。ピーカー（500ml 容量）に入れたニジマス未受精卵 1,000 粒に対して、汚染体腔液を 15ml 加えて汚染卵を作製した。洗卵のために使用する等調液の量を、1,000 粒の卵に対して 50、100、200 および 400ml の 4 段階とし、洗卵方法は試験 1 においてシャワー洗卵を単独で行った場合と同様に行った。洗卵後、各試験区から 1ml の試料を採取し、*F. psychrophilum*、*A. salmonicida* および一般細菌の生菌数を測定した。

生菌数およびウイルス感染価の測定

採取した試料について滅菌等調液を使用して 10 倍段階希釈し、ミスラ法（坂崎，1978）により生菌数を測定した。*F. psychrophilum* については、分離に改変サイトファーガ（FBS5%添加）寒天平板培地を使用して 15℃、7 日間培養し、黄色の集落について抗 *F. psychrophilum* 血清（社：日本水産資源保護協会配布診断液）でスライド凝集試験および PCR（吉浦ら，2006）により分離菌を鑑別した。*A. salmonicida* については、基礎培地に TSA 培地（栄研化学）を使用した

CBB 寒天平板培地を使用して 15℃で 5 日間培養し、濃紺色に染まった集落数を数え生菌数を算出した。また、同培地において増殖がみられた *A. salmonicida* 以外の細菌を一般細菌として計数した。なお、生菌数測定における検出限界は $10^{1.3}$ CFU/ml であった。

IHNV および OMV については、採取した試料を抗生物質法（吉水・野村，1989）により一夜処理した後に、Hanks' BSS を使用して 10 倍段階希釈し、その 50 μ l を 96 穴のマイクロプレートに培養した細胞に接種した。接種後 15℃で 14 日間培養し、CPE の発現状態を観察して TCID₅₀ 法によりウイルス感染価を測定した。使用した培養細胞の種類は、IHNV に EPC 細胞、OMV に RTG-2 細胞を用いた。感染価は 4 穴法の Behrens-Karbar 法で算出した。なお、感染価の測定における検出限界は、 $10^{1.6}$ TCID₅₀/ml であった。

F. psychrophilum の卵感染試験

試験区は、無洗卵区、濯ぎ洗卵区、シャワー洗卵区および非感染対照区の 4 区を設けた。洗淨したニジマス未受精卵を 400 粒ずつ 4 区に分けて、各々を 200ml 容量ピーカーに收容した。この卵に対して *F. psychrophilum* 液を 2ml 加え、卵を緩やかに攪拌して卵を汚染した。非感染対照区の卵は、供試菌液の代わりに滅菌等調液 2ml を加えた。また、濯ぎ洗卵区では、汚染卵に 40ml の滅菌等調液を加えて濯ぎ洗卵を行い、シャワー洗卵区では 40ml の滅菌等調液でシャワー洗卵を行った。これらの卵に対してニジマス精液（3 尾分の混合）を 0.2ml 加えて授精した後に、各区の卵に滅菌飼育水 200ml を加えてから 1 時間静置して吸水させた。その後、卵をヨード剤 200 倍液で消毒してから、ふ化水槽に收容して飼育を行った。飼育用水は、活性炭で脱塩素処理した水道水であり、飼育期間中の水温は 10.5~11.5℃であった。なお、汚染卵の授精操作に先立ち、各試験区から卵付着の体腔液または等調液を 0.5ml 採取して生菌数を測定し

た。

試験感染後 21 日が経過した時点で、各区から発眼卵 60 粒を採取し、ヨード剤の 200 倍液で 15 分間消毒した。その後、発眼卵を改変サイトファーガ寒天平板培地 (FBS 5% 添加) 上で転がし、卵表面からの細菌分離操作を行ってから、96 穴マイクロプレートの各 well に 1 粒ずつ収容した。滅菌注射針で卵に傷をつけてから、滅菌綿棒で卵を潰して採取した卵内容物を培地に塗抹し、15℃で 7 日間培養した。培地上に増殖した黄色の集落を対象に、抗 *F. psychrophilu* 血清によるスライド凝集試験および PCR により分離菌を鑑別した。

結果

洗卵工程別の除菌効果

等調液洗卵を行った場合の、*F. psychrophilum*、*A. salmonicida* および一般細菌の除菌効果を表 2-1-1 に示した。

F. psychrophilum では、洗卵前の汚染卵の生菌数が $10^{6.2}$ CFU/ml であったが、第 1 回および第 2 回の濯ぎ洗卵により $10^{5.7}$ および $10^{5.2}$ CFU/ml に減少し、さらにシャワー洗卵により $10^{2.5}$ CFU/ml までに減少した。濯ぎ洗卵 1 回あたりの除菌量は $10^{0.5}$ CFU/ml、シャワー洗卵による除菌量は $10^{2.4} \sim 10^{2.7}$ CFU/ml であり、2 回の濯ぎ洗卵とシャワー洗卵を併せた一連の洗卵による総除菌量は $10^{3.7}$ CFU/ml であった。

A. salmonicida では、洗卵前には $10^{8.3}$ CFU/ml であったが、第 1 回および第 2 回の濯ぎ洗卵により $10^{7.3}$ および $10^{6.3}$ CFU/ml に減少し、さらにシャワー洗卵により $10^{3.1}$ CFU/ml に減少した。濯ぎ洗卵 1 回あたりの除菌量は $10^{1.0}$ CFU/ml、シャワー洗卵による除菌量は $10^{2.7} \sim 10^{3.2}$ CFU/ml であり、一連の洗卵による総除菌量は $10^{5.2}$ CFU/ml であった。

一般細菌数は、洗卵前には $10^{4.9}$ CFU/ml であったが、第 1 回および第 2 回の濯ぎ洗卵により $10^{3.9}$ および $10^{2.5}$ CFU/ml まで減少し、シャワー洗卵後には検出限界以下までに減少した。濯ぎ洗卵 1 回あたりの除菌量は $10^{1.0} \sim 10^{1.4}$ CFU/ml、シャワー洗卵による除菌量が $10^{2.5} \sim 10^{5.1}$ CFU/ml であり、一連の洗卵による除菌量は $10^{4.9} \leq$ CFU/ml であった。

等調液洗卵による IHNV および OMV の除去効果を表 2-1-2 に示した。IHNV は、洗卵前の感染価が $10^{7.4}$ TCID₅₀/ml であったが、第 1 回および第 2 回の濯ぎ洗卵により $10^{6.1}$ TCID₅₀/ml および $10^{5.4}$ TCID₅₀/ml に減少し、さらにシャワー洗卵により $10^{3.1}$ TCID₅₀/ml までに減少した。濯ぎ洗卵 1 回あたりの除去量は $10^{0.7} \sim 10^{1.3}$ TCID₅₀/ml、シャワー洗卵による除去量は $10^{2.3} \sim 10^{2.5}$ TCID₅₀/ml であり、2 回の濯ぎ洗卵およびシャワー洗卵を併せた一連の洗卵による除去量は $10^{4.3}$ TCID₅₀/ml であった。

OMV は、洗卵前の感染価が $10^{5.4}$ TCID₅₀/ml であったが、第 1 回および第 2 回の濯ぎ洗卵によ

表 2-1-1 *F. psychrophilum* または *A. salmonicida* で汚染したニジマス未受精卵の等調液洗卵における工程別の生菌数の変化

試験区	洗卵工程	<i>F. psychrophilum</i> (log ₁₀ CFU/ml)			<i>A. salmonicida</i> (log ₁₀ CFU/ml)			一般細菌 ^{*1} (log ₁₀ CFU/ml)		
		洗卵前	洗卵後	除菌量	洗卵前	洗卵後	除菌量	洗卵前	洗卵後	除菌量
複合洗卵	第1回濯ぎ洗卵	6.2	5.7	0.5	8.3	7.3	1.0	4.9	3.9	1.0
	第2回濯ぎ洗卵	5.7	5.2	0.5	7.3	6.3	1.0	3.9	2.5	1.4
	シャワー洗卵	5.2	2.5	2.7	6.3	3.1	3.2	2.5	— ^{*3}	2.5 \leq
	合計 ^{*2}			3.7			5.2			4.9 \leq
単独洗卵	シャワー洗卵	6.1	3.7	2.4	8.4	5.7	2.7	5.1	— ^{*3}	5.1 \leq

^{*1} 一般細菌の分離培養には CBB 培地を使用した

^{*2} 等調液洗卵における総除菌量を示す

^{*3} 検出限界 (1.3 log₁₀ CFU/ml) 以下を示す

表2-1-2 IHNV またはOMVで汚染したニジマス未受精卵の等調液洗卵における工程別の感染価の変化

試験区	洗卵工程	IHNV (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)			OMV (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)		
		洗卵前	洗卵後	除去量	洗卵前	洗卵後	除去量
		複合洗卵	第1回濯ぎ洗卵	7.4	6.1	1.3	5.4
	第2回濯ぎ洗卵	6.1	5.4	0.7	4.6	3.9	0.7
	シャワー洗卵	5.4	3.1	2.3	3.9	1.4	2.5
	合計*1			4.3			4.0
単独洗卵	シャワー洗卵	7.1	4.6	2.5	5.1	1.9	3.3

*1 等調液洗卵におけるウイルスの総除去量を示す

* ウイルス分離における検出限界は1.6 (log₁₀) TCID₅₀/mlであった

り 10^{4.6} および 10^{3.9} TCID₅₀/ml に減少し、さらにシャワー洗卵により 10^{1.4} TCID₅₀/ml までに減少した。濯ぎ洗卵 1 回あたりの除去量は 10^{0.7} ~ 10^{0.8} TCID₅₀/ml、シャワー洗卵による除去量は 10^{2.5} ~ 10^{3.3} TCID₅₀/ml であり、一連の洗卵による総除去量は 10^{4.0} TCID₅₀/ml であった。

シャワー洗卵強度の違いによる除菌効果の違い

等調液の量を4段階に変えて洗卵した場合の、*F. psychrophilum* および *A. salmonicida* の除菌効果を表2-1-3に示した。*F. psychrophilum* は、洗卵前における50、100、200および400mlの各試験区の生菌数は10^{7.7}、10^{7.6}、10^{7.9} および10^{7.9} CFU/mlであったが、洗卵後にはそれぞれ10^{6.1}、10^{5.4}、10^{4.2} および10^{4.0} CFU/mlまでに減少した。洗卵による各区の除菌量は、10^{1.6}、10^{2.2}、10^{3.7} および10^{3.9} CFU/mlであり、等調液量が増すほどに除菌効果が向上した。

A. salmonicida は洗卵前における50、100、200および400mlの各洗卵区の生菌数が10^{8.2}、10^{8.1}、10^{8.2} および10^{8.3} CFU/mlであったが、洗卵後にはそれぞれ10^{6.2}、10^{5.5}、10^{4.6} および10^{4.1} CFU/mlまでに減少した。洗卵による各区の除菌量は10^{2.0}、10^{2.6}、10^{3.6} および10^{4.2} CFU/mlであり、等調液量が増すほどに除菌効果が向上した。

一般細菌は、洗卵前における50、100、200および400mlの各洗卵区の生菌数が10^{5.6}、10^{5.3}、10^{5.9} および10^{5.3} CFU/mlであったが、洗卵後にはそれぞれ10^{4.0}、10^{3.1}、10^{4.2} および10^{3.3} CFU/mlまでに減少した。洗卵による各区の除菌量は、10^{1.6}、10^{2.2}、10^{1.7} および10^{2.0} CFU/mlであった。

洗卵除菌による *F. psychrophilum* 卵内感染の防除効果

F. psychrophilum を添加した体腔液で汚染し

表2-1-3 *F. psychrophilum* または *A. salmonicida* で汚染したニジマス未受精卵を異なる等調液量でシャワー洗卵した場合の生菌数の変化

等調液量 (ml/1,000粒)	<i>F. psychrophilum</i> (log ₁₀ CFU/ml)			<i>A. salmonicida</i> (log ₁₀ CFU/ml)			一般細菌*1 (log ₁₀ CFU/ml)		
	洗卵前	洗卵後	除去量	洗卵前	洗卵後	除去量	洗卵前	洗卵後	除去量
	50	7.7	6.1	1.6	8.2	6.2	2.0	5.6	4.0
100	7.6	5.4	2.2	8.1	5.5	2.6	5.3	3.1	2.2
200	7.9	4.2	3.7	8.2	4.6	3.6	5.9	4.2	1.7
400	7.9	4.0	3.9	8.3	4.1	4.2	5.3	3.3	2.0

*1 一般細菌の分離培養にはCBB培地を使用した

* 検出限界は1.3 (log₁₀) CFU/mlであった

表2-1-4 異なる方法で等調液洗卵した*F. psychrophilum*汚染ニジマス卵の卵内感染率

試験区	等調液洗卵	洗卵後の生菌数	卵内感染率 ^{*3}
		(log ₁₀ CFU/ml)	(陽性卵数/標本数;%)
汚染卵	無洗卵	9.1	13/60 (21.7) ^{*4}
	濯ぎ洗卵 ^{*1}	7.8	3/60 (5.0) ^{*4}
	シャワー洗卵 ^{*1}	6.9	0/60 (0)
非汚染卵	無洗卵	— ^{*2}	0/60 (0)

^{*1} ニジマス未受精卵400粒を等調液 40 mlで洗卵した

^{*2} 検出限界(1.3log₁₀ CFU/ml)以下を示す

^{*3} 洗卵・授精後、積算温度200°Cを経過した発眼卵から菌分離を行った

^{*4} 両者の比率に統計学的有意差($P_{\chi^2} < 0.01$)がある

た卵、汚染卵を2種類の方法で洗卵した卵および非汚染卵の4試験区の発眼卵について行った細菌分離の結果を表2-1-4に示した。授精、吸水前の時点における各試験区の卵周囲の体腔液または等調液中の生菌数は、無洗卵区で $10^{9.1}$ CFU/ml、濯ぎ洗卵区で $10^{7.8}$ CFU/ml、シャワー洗卵区で $10^{6.9}$ CFU/mlであり、非汚染対照区では検出限界($10^{1.3}$ CFU/ml)以下であった。発眼卵内からの細菌分離検査においては、無洗卵区および濯ぎ洗卵区の卵から*F. psychrophilum*が分離された。無洗卵区の感染卵の比率は13/60粒(21.7%)、濯ぎ洗卵区は3/60粒(5.0%)であり、両区の比率には統計学的な有意差($P_{\chi^2} < 0.01$)が認められた。これに対して、シャワー洗卵区および非汚染対照区の卵から*F. psychrophilum*は分離されなかった。また、卵内からの細菌分離に先立っておこなった卵表面の細菌分離検査においては、全試験区の卵からも*F. psychrophilum*は分離されなかった。

考 察

本研究では、内水面の養殖サケ科魚類の人工採卵において、受精成績の向上を目的として普及している等調液洗卵法が、卵表面における病原体の汚染程度を下げ、卵内感染の防止に役立っているのではないかと考え、洗卵法の除菌効果を定量的に把握するための試験を行った。養魚場における採卵作業では、糞、凝固した血液、卵殻および過熟卵などの固形物を洗い流すため

に濯ぎ洗卵が2~3回行われ、次いでシャワーによる洗卵が行われる。洗卵に使用する等調液の量は、卵1万粒に対して1~2Lとされている(長野県水産指導所, 1957)。

このような作業内容をモデルにして、濯ぎ洗卵およびシャワー洗卵の工程別に除菌効果を調べたところ、1回の濯ぎ洗卵により*F. psychrophilum*は $10^{0.5}$ 程度、*A. salmonicida*では 10^1 程度、IHNVおよびOMVで 10^1 程度の除菌または除去効果があることが明らかとなった。また洗卵作業の主体であるシャワー洗卵により、*F. psychrophilum*では 10^3 程度、*A. salmonicida*では 10^3 程度、IHNVおよびOMVで 10^2 程度の除菌、除去効果がみられた。そして2回の濯ぎ洗卵とシャワー洗卵を併せた一連の洗卵操作により、*F. psychrophilum*では 10^3 、*A. salmonicida*では 10^5 、IHNVおよびOMVで 10^4 程度の除菌、除去効果が認められた。また、シャワー洗卵に使用する等調液の量を、卵1,000粒に対して50mlから400mlまで増加させることにより、シャワー洗卵の除菌効果が*F. psychrophilum*では 10^4 近く、*A. salmonicida*では 10^4 程度にまで向上することも明らかになった。ただし、一般細菌においては、等調液の増量による除菌効果の向上が認められなかった。この理由は不明であり、今後の検討を要する。

次に、*F. psychrophilum*で高度に汚染したニジマス卵を濯ぎ洗卵またはシャワー洗卵することにより、洗卵が卵内感染の防止に効果があるかどうかについて、人為汚染卵を用いて試験し

た。洗卵を行わなかった試験区の *F. psychrophilum* 濃度は $10^{9.1}$ CFU/ml であり、発眼卵の時点における卵内感染卵の割合は 21.7% であった。これに対して、濯ぎ洗卵された卵の濃度は $10^{7.8}$ CFU/ml までに低下し、卵内感染卵の割合は 5.0% であり、シャワー洗卵した卵では、*F. psychrophilum* 数は $10^{6.9}$ CFU/ml までに低下し、卵内感染卵は検出されなかった。このように、高度に汚染された卵であっても、洗卵することにより汚染濃度が低下し、卵内感染のリスクが小さくなることが確認された。ただし、*F. psychrophilum* の濯ぎ洗卵における除菌量が、*A. salmonicida* や IHNV の結果に比べて低く、そのために、シャワー洗卵による除菌量は同等であるものの、洗卵全体の除菌効果が他の病原体に比べて低い結果であった。この違いが試験操作によるものであるか、また細菌の特性によるものであるかなどについては、今後の検討課題である。*F. psychrophilum* の卵内感染防止対策を充実させるためにも、この点については確認する必要があると考える。

このように、内水面のサケ科魚類養殖に普及している等調液洗卵法は卵内感染の防止に有効であり、防疫対策の上でも重要な作業であると考えられる。養魚場の中には、シャワー洗卵をせずに簡単な濯ぎ洗卵で済ませている事例も見受けられることから、除菌効果を高めるために濯ぎ洗卵とシャワー洗卵とを組み合わせた等調液洗卵法を養殖現場に定着させる必要がある。一方、河川増殖用に飼育されるサケの種苗生産現場においては、切開法で採卵されるために潰卵が少ないことから、等調液洗卵が行われていない(野村, 2005)。一度に多数の親魚から採卵しなければならない作業上の制約もあるだろうが、卵汚染度の低減は卵内感染防止のためのみならず、受精卵のふ化管理に伴う飼育環境の汚染防止のためにも有益であることから、増殖事業の生産現場へも等調液洗卵法が普及することが望ましい。

第2節 養殖事業における等調液洗卵法の除菌効果の検証

目的

第1節において、濯ぎ洗卵とシャワー洗卵の各工程別に等調液洗卵法の除菌効果を明らかにし、*F. psychrophilum* 汚染卵を洗卵することで、卵内感染を防止できることも明らかにすることができた。

第2節では、試験で得られた成果が事業規模の採卵においても同様の効果が期待できることを検証するために、種苗生産を行っている養魚場において、等調液洗卵法による *F. psychrophilum* の除菌効果および生産した発眼卵における卵内感染の有無を調べた。

材料と方法

採卵作業における洗卵と卵消毒

現場検証のための試験は、長野県水産試験場が種苗生産のために行っている通常のニジマス卵作業を利用して実施した。採卵作業における洗卵および卵消毒の手順は、次のとおりである。

- ① ニジマス親魚から搾出法により採卵する(卵は体腔液とともに、容器に貯められる)
- ② 卵 2~3 万粒を 1 回分として、等調液(1%食塩水)で洗卵する(3 回程度の濯ぎ洗卵およびシャワー洗卵)
- ③ 洗卵後の未受精卵を 5 万粒ずつ分けて少量の等調液とともにバケツに収容し、授精する
- ④ 授精後 5 分程度放置してから、卵をザルに移して等調液および精子を除去する
- ⑤ ザル内の受精卵に等調液をかけて、余分な精子を洗い流す
- ⑥ 等調液で 200 倍希釈したヨード剤

消毒液 10 L 中に受精卵を入れ、15 分間卵消毒を行う（途中で数回卵を攪拌する）

- ⑦ 卵消毒が終了したら、卵を受精卵飼育室内のふ化水槽に収容する

試験区の設定と *F. psychrophilum* の生菌数測定

長野県水産試験場のニジマス親魚では、*F. psychrophilum* の保菌がみられることから、*F. psychrophilum* を効果判定の指標とし、通常のまま採卵された卵について、洗卵および卵消毒の工程別に卵表面の体腔液または等調液中の生菌数を測定した。しかし、第 1 章第 1 節の親魚保菌調査に関して述べたように、体腔液中の生菌数があまり高くないことが考えられたため、採卵された卵を *F. psychrophilum* で人工的に汚染してから洗卵を行う試験区も設定した。1 回の試験で処理した卵は 25,000 粒であり、人工汚染卵については、前節における方法に準じて作製した汚染用菌液 100ml ($10^{9.0}$ CFU/ml) を各卵に添加して作製した。

F. psychrophilum の生菌数測定は、通常採卵区では平板塗布法を、人為汚染卵区においてはミスラ法を用いて測定した。なお、卵消毒後の検査においては、1/10N チオ硫酸ナトリウム液で試料中のヨード剤を中和してから検査をした。

卵飼育と発眼卵からの *F. psychrophilum* の分離

洗卵および卵消毒が終了した時点で、処理卵の中から約 200 粒を抜き取り、試験用小型水槽で発眼期まで飼育した。卵の飼育には脱塩素処理した水道水を使用した。水温は 10~12℃であった。

発眼期に達した時期に、各試験区の発眼卵 60 粒を対象にして、卵内の *F. psychrophilum* 分離検査を行った。検査前の卵消毒、卵内容物の採取方法および培養方法などは、これまでの *F. psychrophilum* の検査方法に準じた。

結 果

実際の洗卵作業における *F. psychrophilum* の除菌量

実際の採卵事業において行われた洗卵の除菌効果を表 2-2-1 に示した。通常採卵区では、洗卵前の卵表面の体腔液中から *F. psychrophilum* が分離されたのは 1 回のみであった。洗卵前の生菌数は $10^{1.0}$ CFU/ml であったが、洗卵後には分離されなくなった。他の 3 回の試験では、洗卵前の段階でも *F. psychrophilum* が分離されず、洗卵後および卵消毒後も分離されなかった。

人工汚染卵区では、洗卵前の時点で $10^{7.8-8.2}$ CFU/ml の生菌数がみられたが、洗卵後には $10^{2.3-3.8}$ CFU/ml までに低下し、洗卵による除菌量は $10^{4.2-5.9}$ CFU/ml であった。また、消毒後の消毒液中から細菌は分離されなかった。

洗卵および卵消毒による *F. psychrophilum* 卵内感染の防除効果

実際の採卵作業において、洗卵および消毒された後に飼育された発眼卵内からの *F. psychrophilum* 分離結果を表 2-2-1 に示した。通常採卵区において、洗卵前に *F. psychrophilum* が分離され、洗卵後には分離されなかった試験区の発眼卵内から *F. psychrophilum* は分離されなかった。人工汚染した卵を洗卵、授精して飼育した発眼卵内からも *F. psychrophilum* は分離されなかった。

また、両試験区の洗卵および卵消毒をして飼育した発眼卵からも、*F. psychrophilum* は全く分離されなかった。

考 察

前節において、養殖現場に普及している等調液洗卵法をモデルにして、濯ぎ洗卵およびシャワー洗卵の除菌効果を検討したところ、*F.*

表2-2-1 事業規模の採卵における等調液洗卵および卵消毒の*F. psychrophilum*除菌及び卵内感染防除効果

試験区	試験回数 ^{*2}	<i>F. psychrophilum</i> の生菌数 ^{*1}			卵内感染率	
		採卵後	洗卵後 ^{*3} (除菌量)	卵消毒後 ^{*4}	洗卵区	消毒区
通常採卵	1	1.0	—	ND ^{*6}	0/60	NT ^{*7}
	2	— ^{*5}	—	—	NT	0/60
	3	—	—	—	NT	0/60
	4	—	—	—	NT	0/60
人為汚染卵	1	7.8	2.8 (5.0)	—	0/60	0/60
	2	8.0	3.6 (4.4)	—	0/60	0/60
	3	8.0	3.8 (4.2)	—	0/60	0/60
	4	8.2	2.3 (5.9)	—	0/60	0/60

*1 生菌数 : (Log₁₀)CFU/ml

*2 試験1回あたりニジマス未受精卵2, 500粒を処理した

*3 等調液洗卵 : 濯ぎ洗卵2回およびシャワー洗卵を実施した

*4 ポビドンヨード剤(水産用イソジン)200倍液で15分間卵消毒した

*5 検出限界(1.0Log₁₀/ml)以下を示す

*6 卵消毒をせず

*7 検査せず

*psychrophilum*と*A. salmonicida*では除菌効果にやや差が見られたが、概ね $10^{4\sim5}$ CFU/ml程度の細菌が除去され、病原ウイルスも同様に除去できることが明らかになった。本節では、養魚場で実際に行われている採卵作業においても同様の効果が期待できることを確認するために、現場検証試験を行った。

本試験の採卵作業では、濯ぎ洗卵が3回程度とシャワー洗卵が1回行われた。その結果、洗卵によって卵表面の*F. psychrophilum*は $10^{4\sim5}$ CFU/ml程度除菌されていることが明らかとなり、前節の試験で得られた洗卵法の除菌効果が、事業規模の試験においても期待できることが明らかとなった。さらに、洗卵によって卵表面の生菌数がかかなり減少したものの、 $10^{2\sim3}$ CFU/ml程度の細菌がまだ残っていた卵を授精して飼育したが、卵内感染はみられなかった。以上のことから、養魚場の採卵作業における等調液洗卵法は受精率向上のためだけでなく、卵表面に存在する細菌やウイルスを除去する効果があり、卵内感染防止にとって有効であることが確かめられた。

また、通常どおり事業的に採卵されたニジマス卵に混じる体腔液中の*F. psychrophilum*を検査したが、4回の試験のうちで1回のみ*F. psychrophilum*が分離されたが、残る3回の試験では分離されなかった。長野県水産試験場の飼育池は*F. psychrophilum*に汚染されており、親魚も保菌していることがわかっている。本研究で行った親魚の保菌調査では、ニジマス親魚の体腔液における保菌率はおおよそ10%以下であり、まれに生菌数が 10^4 CFU/ml程度の個体が見られたものの、多くは 10^2 CFU/ml以下の生菌数であった。実際の養魚場においては、卵内感染が成立する程度にまで卵が汚染されている恐れは低いものと考えられる。しかし、熊谷・縄田(2007, 2008)が全国から収集した材料を検査した結果では、一部に $10^{6\sim7}$ CFU/ml程度保菌する例があった。採卵された卵の中には卵表面が高濃度に汚染された卵が混じることになり、条件によっては卵内感染が起こる可能性があることを十分認識する必要がある。そして、*F. psychrophilum*の卵内感染を防止するためにも、等調液洗卵法は重要な防除対策であると考えられる。

第3節 長野県内の養魚場における等調液洗卵の実態調査

目 的

内水面のサケ科魚類養殖において普及している等調液洗卵法は、元来人工授精における受精率の向上を目的に開発され、昭和30年から実用化された(田代, 1976)。その後、雌体腔液の浸透圧に基づいて改変された処方、標準的な処方として現在まで使用されてきた。この間に、等調液に含まれるK(カリウム)とCa(カルシウム)の必要性について検討され、通常の飼育水で等調液を作製するならば、塩化カリウムおよび塩化カルシウムを取って添加することは不要であり、0.9%程度の食塩水でも十分であるとされた(鈴木, 1981)。これにより、養魚場の中には0.9%ないしは1%食塩水が簡便的に利用される例もある(桐生, 2005; 近藤・本西, 2000)。また、当時、人工授精のために使用する等調液量の目安は、卵1万粒あたり1~2Lあれば十分とされた(長野水指, 1957)が、その後洗卵方法や使用量について検討された例がなく、養殖技術書においても、洗卵のための使用量等について具体的に記述されたものがない。

このような経緯から、実際に行われている洗卵は、養魚場によって使用される等調液の処方や方法が異なっている。受精率の点では、多少の違いがあってもあまり差が現れないかもしれないが、等調液洗卵法を防除技術として考える場合には、方法や使用量は結果を左右する重要な要因である。

前節までの研究成果から、等調液洗卵法を防除技術のひとつとして考え、より効果的な方法を養魚場へ普及する上での基礎資料を得るために、養魚場で行われている洗卵方法について聞き取り調査を行った。

材料と方法

洗卵作業に関する養魚場への聞き取り調査

長野県内でニジマスおよび在来マス類(アマゴ・ヤマメ・イwana)を養殖し、年間に10万粒以上の発眼卵を生産している養魚場を対象にして、採卵作業における洗卵の実施状況の聞き取り調査を行った。対象の養魚場数は、公的機関2、民間養魚場が19の合計21養魚場であった。調査した内容は、次の3項目とした。

- ① 洗卵に使用している等調液の処方
- ② 洗卵方法の具体的な方法
なお、洗卵方法の区分において、シャワー状に散布する方法でなく、卵の上からボール等の容器に入れた等調液をかけ流して洗浄する方法もシャワー洗卵に含めた。
- ③ 洗卵に使用する等調液の量

結 果

洗卵に関する3項目について、21養魚場に聞き取り調査した結果を図2-3-1に示した。

等調液の処方

標準的な等調液を使用しているものが4件(19.0%)で、0.9~1%の食塩水による簡易処方の等調液を使用しているものが最も多く16件(76.2%)であった。また、1%炭酸水素ナトリウム液を洗卵、授精に使用しているものが1件(4.8%)あった。

洗卵の方法

養魚場で行われている洗卵方法は、濯ぎ洗卵、シャワー洗卵、若しくは両方法を組み合わせた複合洗卵の3種類に区分された。濯ぎ洗卵だけを行っているものは8件(38.1%)であり、このうち1回濯ぐ程度のものが3件(14.3%)、2回以上行うものが5件(23.8%)であった。シャワー洗卵単独のものは6件(28.6%)、濯ぎ洗卵およびシャワー洗卵を複合して行っているものが7件(33.3%)であった。

洗卵における等調液の使用量

1回の洗卵作業で処理する卵数は、1尾採卵すごとに洗卵をするような小単位のものから

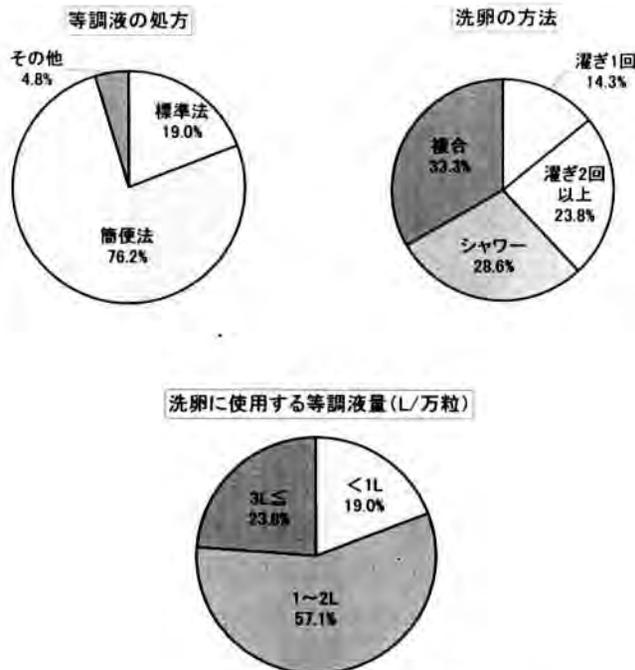


図2-3-1 長野県内の養魚場における等調液洗卵の実態。

10万粒以上まとめて行うものまで、処理の規模に違いがみられた。洗卵方法や処理の規模は養魚場により異なるが、卵1万粒を洗卵するために使用する等調液の量を整理した。1万粒あたりの使用量が1L以下のものが4件(19.0%)であり、このうち濯ぎ洗卵が3件(14.3%)、シャワー洗卵が1件(4.8%)であった。1~2Lの範囲が12件(57.1%)で最も多く、3L以上使用するものが5件(23.8%)であった。

考察

調査をした全ての養魚場で、洗卵が行われていた。洗卵に使用される等調液の処方では、簡便処方が最も多く使用されていた。方法では、濯ぎ洗卵、シャワー洗卵並びに両者を併用した洗卵のいずれかの方法に区分された。等調液の使用量では、卵1万粒あたり1~2L程度が最も多かったが、1L以下のものが4件あった。

使用量が少ない4件は、全てが在来マス(イワナまたはヤマメ)を飼育する養魚場であり、洗卵方法は、濯ぎ洗卵が3件であり、シャワー洗卵が1件であった。在来マス養殖では、冷水病(熊谷, 2009)およびBKD(本西, 1991)の発生がみられ、特にBKDでは有効な対策が開発されていない(木村ら, 1987)。よって、洗卵程度が低い事例のうちで、まず改善が必要と考えられるものは、濯ぎ洗卵を行っている3事例である。本研究においても、*R. salmoninarum*保菌親魚の体腔液中の生菌数が非常に高いことが明らかになっており、洗卵による除菌の必要性が高い。第1節の試験結果から、同量の等調液を使用するならば、シャワー洗卵の方が濯ぎ洗卵より除菌効果が高いことが明らかになっているので、シャワー洗卵の採用と使用量を増加する改善が必要であると考えられる。

第3章 卵消毒効果に及ぼす体腔液、潰卵成分の影響 および卵消毒による卵内感染の防除効果

第1章において、サケ科魚類の卵内感染は、表面が病原菌に汚染された未受精卵が吸水過程に卵門を介して細菌が侵入することにより成立することを明らかにした。また、感染が成立する条件としては、人工感染条件であるが、卵が 10^7 CFU/ml以上の*F. psychrophilum*で汚染された場合であることも確認できた。感染の成立は卵表面の汚染度に依存していることが考えられ、卵の汚染度を低減することが卵内感染を防止するために重要であると考えられる。

第2章では、サケ科魚類養殖の人工採卵において行われている等調液洗卵法の未受精卵表面における除菌効果を検討した。その結果、病原体の種類によって効果に多少の違いがあるものの、標準的な方法では、 10^{4-5} 程度の除菌またはウイルス除去効果があることが明らかになった。しかし、卵表面の汚染度が高い場合には、等調液洗卵した後も細菌が残っていることも示された。*F. psychrophilum*では 10^7 CFU/ml程度に保菌する親魚があるとされ(熊谷・縄田, 2008)、本研究においても*R. salmoninarum*を 10^{10} CFU/ml程度に保菌する親魚も見ついている。等調液洗卵を行った後も、卵表面には未だ多くの*F. psychrophilum*が存在し、卵内感染の危険性が残っている。

現在、養殖サケ科魚類の卵消毒には、ヨード剤が使用されている。1969年に、ヨード剤によるサケ科魚類の卵消毒の有効性が報告(McFadden, 1969)されて以後、サケ科魚類ウイルスに対する消毒効果(Amend and Pietsh, 1972)をはじめ、主に米国において消毒効果と卵に対する毒性が検討された。1971年に日本で初めてIHNが発生し、その後各地へ広がったことを契機として、全国湖沼河川養殖研究会養鱒部会によって実用化研究が組織的に行われた。1973年以降、魚卵移動時の卵消毒が普及に移され、現在ではサケ科魚類養殖における重要な防疫対策

として定着している。具体的には、発眼卵の出荷時と荷受時においてヨード剤 200 倍液で 15 分間の消毒を行うこととされ、死卵を完全に切り除いてから消毒すること、消毒液は再利用しないこと、などが消毒時の基本になっている(山崎・原, 1976)。

ヨード剤は、皮膚刺激が少なく、水溶性で、浸透性、洗浄性があり、殺菌作用もかなり強い(古橋・宮前, 1976)。一方、共存する蛋白などの有機物にヨウ素が吸着されて殺菌力が減弱する(朝長ら, 1987)とされ、手術用イソジン液に血清を添加(5%)した場合には、希釈倍数が高い液で細菌の発育が認められる。IPNV(井上ら, 1990)、IHNV(井上ら, 1991)、OMV(羽鳥ら, 2003)、*R. salmoninarum*(Yoshimizu, 1996)、*A. salmonicida*およびピブリオ病原菌*Vibrio anguillarum*(佐古ら, 1988)などの魚類病原体を対象にした消毒試験においても、消毒剤の反応時に血清、ペプトンまたは培地成分などの有機物が共存することにより、消毒効果が低下することが報告されている。

サケ科魚類の親魚から採卵した場合には、未受精卵に体腔液が混じることになる。また、親魚から採卵(搾出)する際に、0.2%程度の卵が潰れていることも知られている(長野県水産指導所, 1957; 稲葉ら, 1958)。ニジマスの体腔液は、やや粘性を帯びた漿液性の物質であり、炭水化物・蛋白質が含まれている(高野, 1974)。また、魚卵の一般分析値ではニジマス完熟卵に蛋白質が20.2~29.4%含まれ(隆島, 1974)、卵の主要な部分を占める卵黄は蛋白質と脂質が主素材であり、その成分は脂蛋白(lipovitellin)、リン蛋白(phosvitin)などであるとされている(隆島, 1982)。未受精卵のヨード剤消毒を行う場合には、体腔液および潰卵成分に含まれる蛋白質によって、ヨード剤の消毒効果が低下することを考慮しなければならない。このため、本章で

は、体腔液および潰卵成分の混入がヨード剤の消毒効果に及ぼす影響を調べるとともに、等調液洗卵法によってこれらの有機物を除去した場合の消毒効果について検討した。さらに、*F. psychrophilum* で汚染した未受精卵を授精・吸水前の段階で消毒する場合と、汚染卵を授精した後に消毒液中で吸水させる場合の2通りの方法で消毒を行い、各方法における卵内感染の防除効果の違いを検討した。

材料と方法

供試消毒剤

消毒試験には、ポビドンヨード剤（水産用イソジン液：明治製菓）を使用した。

阻害用の体腔液、潰卵液の作製

ヨード剤消毒の阻害物質として、ニジマス体腔液および未受精卵を人為的に潰して得た潰卵成分の2種類を使用した。30尾のニジマス雌親魚の生殖口からマイクロピペットを使用して採取した体腔液を混合し、0.45 μ m孔径のメンブレンフィルターでろ過除菌してから使用した。潰卵液の作製については、滅菌等調液で3回濯ぎ洗卵をしてから、ヨード剤200倍液で15分間消毒した後に、滅菌等調液で2回洗浄してヨード剤を除去した。滅菌等調液先の体腔液10ml中で、注射針を用いて卵2粒を潰してから十分に攪拌混合した。その後、卵殻を取り除いた等調液を潰卵液として使用した。体腔液および潰卵の混合液については、先の体腔液10ml中において消毒した卵2粒を潰し、以下の操作は潰卵液の方法に準じた。

供試菌液の作製

阻害物質が混入した場合のヨード剤による卵消毒の有効性を評価するために、*A. salmonicida*、*F. psychrophilum* および *R. salmoninarum* を用いた。前章までと同様の方法で3菌種を培養した後に、滅菌等調液を用い

て培養菌体を洗浄し、反応菌液を作製した。

体腔液、潰卵の混入率

1回の卵消毒において使用する消毒液量と処理卵数は、現在のサケ科魚類養殖において普及している「10L当り5万粒」の基準を採用した。体腔液は液体であることから、消毒液量に対する体腔液量の比率を混入率とした。潰卵については、処理卵数に対する潰卵数の比率を混入率とした。

採卵時に、1尾のニジマス親魚から採取される体腔液量は、6~100mlの範囲であり、平均値が42.1ml、1尾あたりの採卵数は2,651粒である（長野県水産指導所, 1957）。この値から、卵50,000粒あたりの体腔液量を求め、消毒液量10Lに対する比率を計算すると約8%になる。この値を参考にして、採卵作業における体腔液の混入率を10%とした。これをもとに、20、10、1および0.1の4段階の混入率を設定した。

また、1尾の採卵（平均値2,651粒）において0~14粒（平均値5.3粒）の潰卵がみられるので、採卵数に対する潰卵の比率（潰卵率）は平均で0.2%になり、最大値の場合では0.5%余りとなる。実際の採卵作業では、潰卵を全く含まないことはかなり困難であり、この程度よりも多くなることが指摘されている（長野県水産指導所, 1957）。このため、本試験においては採卵作業の混入率を1%に仮定し、2、1、0.1および0.01%の混入率条件を設定した。

さらに、実際には体腔液中に潰卵成分が含まれている状態であることから、両者が混入した場合の条件として、20+2（体腔液+潰卵）、10+1、1+0.1および0.1+0.01の4条件を設けた。

生菌数の測定

反応終了後0.1mlの試料を分取し、10倍階段希釈を行い、反応液中の生菌数を測定した。測定方法にはミスラ法を用い、本法の検出限界は $10^{1.3}$ CFU/mlであった。各細菌の培養条件は、こ

れまでの試験方法に準じた。

ヨード剤の消毒効果に及ぼす体腔液、潰卵混入の影響

10ml 容量のプラスチック製遠沈管内において、体腔液、潰卵の混入率が各条件になるように滅菌等調液、体腔液または潰卵液を所定量加えて 9ml にしたものに、各供試菌液 1ml を加えて全体が 10ml とした。これに対して、ヨード剤 50 μ L を加えて素早く攪拌し、反応を開始させた。反応時間は 15 分間とし、この間 5 分経過ごとに反応液を攪拌した。反応時の温度は 10℃ とした。反応時間が終了した時に、ろ過除菌済みの 1/10N チオ硫酸ナトリウムを 40 μ l 添加してヨード剤を中和し、反応を停止させた。また、ヨウ素を中和するために添加するチオ硫酸ナトリウムの生菌数に与える影響を確認するために、それぞれの菌液を滅菌等調液に加えて 15 分間静置し、チオ硫酸ナトリウムを添加した場合としなかった場合の生菌数を測定した。

卵消毒における等調液洗卵による阻害物質除去の効果

供試卵には、ニジマス 3 尾から採卵した未受精卵を用いた。滅菌等調液で洗卵（濯ぎ洗卵 2 回+シャワー洗卵）した卵 500 粒を 200ml 容量のビーカーに入れた。潰卵 5 粒を混入・溶解させたニジマス体腔液（ろ過除菌処理）10ml をビーカー内の卵に混ぜて攪拌し、人工採卵した未受精卵の状態に似せた模擬未受精卵を 3 区作った。潰卵を混合した体腔液を加えない清浄卵試験区の卵には、滅菌等調液を加えた。

模擬未受精卵の 1 区に滅菌等調液 50ml を注ぎ緩やかに攪拌してから、上清 50ml を捨てる洗卵操作をした（濯ぎ洗卵）。もう 1 区の卵については、同じく滅菌等調液 50ml でシャワー洗卵をしてから、別のビーカーに卵を入れ、滅菌等調液 10ml を加えた。各試験区の卵に供試菌液 1ml を加えた後に、ヨード剤 0.5ml を溶解させた消毒液 90ml を加えて卵消毒を開始した。15 分間

の反応において、5 分経過するごとに、綿棒を使用してビーカー内の卵および消毒液を攪拌した。反応終了時に、チオ硫酸ナトリウムで中和した。反応液からの試料の分取、生菌数の測定方法は試験 1 に準じた。

供試卵および *F. psychrophilum* による卵汚染の方法

ニジマス雌親魚 3 尾から採卵した未受精卵と同じく 3 尾の雄から得た精液を供試した。ニジマス卵および精液を使用するに当り、卵表面の体腔液と精液の一部を滅菌綿棒で採取して培地に塗抹し、*F. psychrophilum* のないことを確認した。

第 1 章第 2 節で行った *F. psychrophilum* 人工感染試験に準じて、卵汚染用の *F. psychrophilum* 菌液を作製し、卵を汚染した。すなわち、洗卵（濯ぎ洗卵 2 回、シャワー洗卵）をした未受精卵を 400 粒ずつビーカーに入れ、汚染用 *F. psychrophilum* 菌液 2ml を加えてから攪拌して、卵を汚染した。試験 1 および試験 2 に使用した汚染用菌液の濃度は、 $10^{9.4}$ および $10^{7.0}$ CFU/ml であった。

F. psychrophilum 汚染卵のヨード剤消毒

卵消毒剤には、ヨード剤を使用した。未受精卵消毒区については、汚染卵を入れたビーカーに滅菌等調液で 200 倍に希釈した消毒液 80ml を入れ、15 分間卵を消毒した。この間 5 分経過するごとに卵および消毒液を攪拌した。消毒が終了した時点で卵および消毒液を小型の網籠に入れて消毒液を除去し、別のビーカーに卵を再収容した。この卵に滅菌等調液 10ml を加えてから、精液 0.2ml を混合して授精した。その後、卵に滅菌飼育水 200ml を加え、60 分間吸水させた。吸水処理後、ヨード剤 200 倍で 15 分間消毒した後に飼育水槽に収容した。吸水消毒区については、0.2ml の精液を混ぜて汚染卵を授精した後に、滅菌飼育水で希釈したヨード剤消毒液 200ml を入れて 60 分間の吸水消毒を行った。消

毒が終了した後に、卵を飼育水槽へ収容した。無消毒対照区については、汚染卵を同様に授精してから滅菌飼育水中で60分間吸水させた後に、卵消毒を行ってから飼育水槽に収容した。

卵内からの *F. psychrophilum* の分離

飼育水槽へ収容してから積算温度が200℃以上を経過した発眼期において、各試験区から発眼卵60粒を採取し、卵内から *F. psychrophilum* の分離培養を行った。分離操作における卵消毒、卵内容物の採取方法などは、これまでの試験方法に準じた。

結果

体腔液、潰卵の混入がヨード剤の消毒効果に及ぼす影響

体腔液および潰卵を混入した消毒液で反応させた場合の供試菌の残存を表3-1に示した。

体腔液を単独混入した場合、*A. salmonicida* では混入率10%まで菌の発育 ($10^{8.0-3.7}$ CFU/ml) がみられた。*F. psychrophilum* では、混入率20%

で発育 ($10^{2.8}$ CFU/ml) がみられ、*R. salmoninarum* では、10%まで発育 ($10^{8.5-2.7}$ CFU/ml) みられた。潰卵単独混入の場合では、混入率20%において *A. salmonicida* および *R. salmoninarum* の発育 ($10^{3.5}$ および $10^{2.6}$ CFU/ml) がみられたが、*F. psychrophilum* では全てにおいて発育はみられなかった。体腔液と潰卵を併せて混入した場合、*A. salmonicida* では混入率10+1%まで発育 ($10^{7.1-2.1}$ CFU/ml) がみられた。*F. psychrophilum* では混入率20+2%で発育 ($10^{3.2}$ CFU/ml) がみられ、*R. salmoninarum* では10+1%まで発育 ($10^{8.6-4.1}$ CFU/ml) がみられた。また、中和用チオ硫酸ナトリウムの添加が生菌数に与える影響を調べたが、添加の有無に関係なく生菌数は同等であった。

等調液洗卵法による消毒効果の向上

体腔液と潰卵を混入(10+1%)させたニジマス未受精卵を等調液洗卵してから、ヨード剤による卵消毒を行った場合の卵表面における供試菌の残存結果を表3-2に示した。*A. salmonicida* では、等調液洗卵をせずに消毒した場合では

表3-1 ヨード剤消毒に及ぼす体腔液および潰卵混入の影響

阻害物質	阻害物質の混入率* ¹ (%)	<i>A. salmonicida</i> (Log ₁₀ CFU/ml)	<i>F. psychrophilum</i> (Log ₁₀ CFU/ml)	<i>R. salmoninarum</i> (Log ₁₀ CFU/ml)
体腔液	20	8.0	2.8	3.5
	10	3.7	—* ²	2.7
	1	—	—	—
	0.1	—	—	—
	0	—	—	—
潰卵	2	3.5	—	2.6
	1	—	—	—
	0.1	—	—	—
	0.01	—	—	—
	0	—	—	—
体腔液+潰卵	20+2	7.1	3.2	8.6
	10+1	2.1	—	4.1
	1+0.1	—	—	—
	0.1+0.01	—	—	—
	0+0	—	—	—
対照 (チオ硫酸ナトリウム)	添加	7.7	7.5	8.5
	無添加	7.8	7.3	8.6

*¹ 体腔液の混入率は反応液中の比率を示し、潰卵混入率は処理卵数に対する比率を示す

*² 検出限界(1.3Log₁₀CFU/ml)以下を示す

* ヨード剤消毒液の反応は、200倍液、15分間とした

表3-2 体腔液および潰卵成分を洗卵除去した場合のヨード剤の卵消毒効果

消毒前の洗卵方法	<i>A. salmonicida</i> (log ₁₀ CFU/ml)	<i>F. psychrophilum</i> (log ₁₀ CFU/ml)	<i>R. salmoninarum</i> (log ₁₀ CFU/ml)
無洗卵(10+1%) ^{*1}	2.2	—	2.8
濯ぎ洗卵(1回)	— ^{*2}	—	1.6
シャワー洗卵	—	—	—
対照(阻害物質なし)	—	—	—

ニジマス未受精卵500粒を、水産用イソジン200倍液100ml中で15分間消毒した

* 消毒開始時の生菌数

A. salmonicida : 7.6(log₁₀)CFU/ml

F. psychrophilum : 7.4(log₁₀)CFU/ml

R. salmoninarum : 9.8(log₁₀)CFU/ml

*¹ 卵消毒における体腔液、潰卵の混入率を示す

*² 検出限界(1.3log₁₀CFU/ml)以下を示す

10^{2.2} CFU/ml の菌発育がみられたが、濯ぎまたはシャワー洗卵を行った卵では発育はみられなかった。*R. salmoninarum*では、無洗卵で消毒した場合には10^{2.8}CFU/ml、濯ぎ洗卵をしてから消毒した場合には10^{1.6}CFU/mlの発育がみられたが、シャワー洗卵を行った卵では発育はみられなかった。*F. psychrophilum*では、無洗卵および2洗卵区ともに発育はみられなかった。また、阻害物質が混入していない対照区では、3菌種ともに発育はみられなかった。

未受精卵消毒および吸水消毒の卵内感染防除効果

*F. psychrophilum*で汚染したニジマス卵を、ヨード剤で未受精卵消毒または吸水消毒した場合の卵内感染率を表3-3に示した。

試験1では、卵消毒を行わなかった汚染卵の卵内感染率が21.7%であった。これに対して、未受精卵消毒区の卵からは*F. psychrophilum*

が分離されず、吸水消毒区では1.7%の卵内感染がみられた。試験2では、無消毒区の卵内感染率が6.7%であり、吸水消毒区は3.3%であった。また、供試用のニジマス卵および精液から*F. psychrophilum*は分離されず、ともに陰性であった。

考 察

サケ科魚類親魚から採卵(搾出)した場合には、未受精卵以外に体腔液や潰卵成分が含まれる。体腔液、未受精卵には蛋白質や脂質などの有機物が含まれており、ヨード剤の消毒効果を低下させることが考えられる。このため、体腔液および潰卵成分を混入させた状態で*A. salmonicida*、*F. psychrophilum*および*R. salmoninarum*をヨード剤と反応させ、混入率の違いによる消毒効果の違いを調べた。ニジマス親魚から出される体腔液量および採卵時に生

表3-3 ヨード剤によるニジマス未受精卵消毒および吸水消毒の*F. psychrophilum*卵内感染の防除効果

試験	卵汚染濃度 (Log ₁₀ CFU/ml)	卵消毒 ^{*1}		対照
		未受精卵消毒 (陽性卵数/標本数;%)	吸水消毒 (陽性卵数/標本数;%)	無消毒 (陽性卵数/標本数;%)
1	9.4	0/60 (0%)	1/60 (1.7%)	13/60 (21.7%)
2	7.0	ND ^{*2}	2/60 (3.3%)	4/60 (6.7%)

*¹ ポビドンヨード剤(水産用イソジン)200倍液を使用し、未受精卵消毒は15分間、吸水消毒は60分間行った

*² 試験せず

じる潰卵率(長野県水産指導所, 1957)を参考にして、養魚場の採卵作業における体腔液の混入率を10%に、潰卵の混入率を1%に設定して、これよりも2倍の高い場合と、1/10 および 1/100 の低い条件について消毒試験を行った。実際の採卵では、体腔液と潰卵が混じった状態で出されることから、体腔液および潰卵の混入率 10+1% の場合が現実的に想定される条件である。

採卵時を想定した混入率 (10+1%) では、*A. salmonicida* および *R. salmoninarum* の残存がみられたことから、採卵したままの状態でも消毒した場合には、卵表面の *A. salmonicida* および *R. salmoninarum* に対して十分な消毒効果が期待できないと考えられる。一方、これ以下の混入率では供試菌の残存はみられなかったことから、卵表面を洗浄し、卵に付着した体腔液や潰卵成分を除去すれば、消毒効果の向上が期待される。そこで、体腔液と潰卵を混入 (10+1%) させた卵を、濯ぎ洗卵またはシャワー洗卵してから消毒を行い、消毒効果に及ぼす洗卵の効果を調べた。*F. psychrophilum* では無洗卵状態でも消毒効果が認められたが、*A. salmonicida* では濯ぎ洗卵またはシャワー洗卵することにより、*R. salmoninarum* ではシャワー洗卵することにより、それぞれ消毒効果が認められた。

また、体腔液または潰卵を単独で混入した試験区では、体腔液混入率 10% において *A. salmonicida* および *R. salmoninarum* の残存がみられた。潰卵混入率 1% では 3 供試菌ともに残存は認められなかった。この結果からみれば、消毒効果に対しては潰卵よりも体腔液混入のほうが影響していることが考えられる。

以上のことから、等調液洗卵をすることにより、ヨード剤消毒の効果が向上することが明らかになった。等調液洗卵法は、卵表面を除菌する効果だけでなく、卵消毒を有効にするためにも重要な作業であると考えられる。しかし、消毒効果に影響を及ぼす障害物の混入程度は菌種によって異なる結果が得られた。特に、垂直伝播が問題視されている *R. salmoninarum* では、確実な

消毒効果を得るためには1回の濯ぎ洗卵では不十分であり、シャワー洗卵の必要性が示された。

次に、*F. psychrophilum* で汚染した未受精卵を、授精・吸水させる前にヨード剤消毒 (200倍, 15分間) した場合には、*F. psychrophilum* の卵内感染は見られなかった。しかし、ヨード剤消毒液中で吸水 (吸水消毒) させた卵では卵内感染がみられた。Kumagai *et al.* (1998) は、サケ科魚類 3 種の受精卵を 10^{7-8} CFU/ml の *F. psychrophilum* に 30 分浸漬して汚染し、一旦流水中に收容した後に、ヨード剤 200 倍液 (50ppm) で 15 分間消毒を行ってから *F. psychrophilum* の分離を行ったところ、60~80% の卵内から本菌が分離され、発眼卵においても全ての卵内から分離されたことを報告している。さらに、熊谷・縄田 (2008) は、ヤマメ、イワナ、ギンザケおよびニジマスの未受精卵を *F. psychrophilum* で汚染し、100 倍 (100ppm) と 200 倍 (50ppm) のヨード剤消毒液中で吸水させたが、卵内感染を防除できなかったことも報告している。これらのことから、卵内感染を防除するためには、授精卵を消毒液中で吸水させる方法 (吸水消毒) は不十分であり、未受精卵消毒が有効であると考えられる。

また、Kumagai *et al.* (1998) は、*F. psychrophilum* に対する有効なヨード剤消毒時間を検討し、250 倍 (40ppm) の濃度では 0.5~15 分間の処理が有効であるとしている。吸水消毒の場合でも、卵表面に長く残っている *F. psychrophilum* に対してはヨード剤が有効であると考えられるが、速やか (0.5 分以内) に卵内へ侵入した *F. psychrophilum* に対しては消毒剤が効いておらず、しかも卵内腔内へ入ったヨード剤が卵内腔内の成分により阻害されることにより、十分な防除効果がみられない可能性が考えられる。

総合考察

内水面の養殖サケ科魚類の種苗生産においては、特に IHN の防除を目的とした防疫対策が普及している。防疫対策の骨格は、消毒法と防疫施設による飼育管理である。ニジマス等の発眼卵をヨード剤で消毒してから、隔離飼育施設へ収容してふ化飼育を行い、種苗の規格サイズ(5g程度)に成育するまで飼育する。このような防疫対策をとることによって種苗生産過程における IHN の発生が防止できるようになり、養殖生産の安定に大きく貢献してきている。

このような防疫対策が実行されている種苗生産においても、垂直伝播に対する防疫上の課題が残っている。これまで、病原体の卵内感染による垂直伝播が問題視されている疾病に、IPN、IHN、BKD および冷水病がある。この中で、BKD と冷水病については、卵内感染が証明 (Evelyn *et al.*, 1984a; Evelyn, 1986a, b; Brown *et al.*, 1997; Kumagai and Nawata, 2010) されているが、経路や条件などの感染機序について不明な点が残っている。本研究では、養殖サケ科魚類における卵内感染機序の解明と防除技術の開発を目的とした。第 1 章では、主に *F. psychrophilum* を対象にした人工感染試験を行い、感染経路、条件等について検討した。第 2 章および第 3 章では、卵内感染を防除するための技術開発を目的として、人工採卵における等調液洗卵法およびヨード剤による未受精卵消毒を取り上げて、これらの感染防除効果を検討した。本研究の成果と今後の課題について、卵内感染機序に関する部分と防除技術に関する部分に分けて整理する。

1 養殖サケ科魚類の卵内感染機序について

第 1 章第 1 節では、親魚の保菌と親魚体内における卵の感染の可能性を検討した。*F. psychrophilum*、*A. salmonicida* 保菌親魚の体腔液中における生菌数は高くなく、人工感染試験で成立する濃度条件 (10^7 CFU/ml) を考えれ

ば、卵内感染が起こる確率は低いと考えられる。しかし、熊谷・縄田 (2008, 2009) の報告のように、 10^7 CFU/ml 程度に保菌している親魚も一部にはみられるので、養殖事業において卵内感染が起こる可能性を全く否定することはできない。BKD は、卵内感染するためにヨード剤による発眼卵消毒が効かず、種苗生産における難病の一つとして考えられてきた。BKD 伝播経路の中で、汚染卵導入による垂直伝播の比率が高い結果はそのことを反映している。本研究の人工感染試験においては、*R. salmoninarum* の卵内感染率は *F. psychrophilum* と比べても著しく高くはないこと、 10^5 CFU/ml 程度の汚染では同じく感染が起こらなかったことから、*R. salmoninarum* だけが特異的に侵入しやすいとは考えにくい。これに対して、*R. salmoninarum* 保菌親魚の体腔液中の生菌数が著しく高い結果が注目される。等調液洗卵を行ったとしても、*A. salmonicida* や *F. psychrophilum* に比べて *R. salmoninarum* の方が残存する菌の量はかなり多いことが推定される。*R. salmoninarum* の卵内感染頻度が高いとすれば、体腔液中の生菌数が高いことが関係しているのではないかと推察される。調査事例数が少ないので、全ての保菌親魚がこの程度に保菌しているかについては不明であり、今後の検討が必要である。

次に、保菌親魚体内での感染の問題である。保菌親魚から得た未受精卵(排卵した状態)では、*F. psychrophilum* および *R. salmoninarum* は卵内から分離されなかった。*R. salmoninarum* が卵黄などの卵細胞質内で観察されている (Evelyn *et al.*, 1984a; Bunro and Munro, 1986) ことは事実であるが、試験操作の問題も含めて、感染経路や時期などに不明な点が残されている。本研究では、細菌分離に際して、未受精卵を付活させないように等調液で洗卵し、等調液で希釈したヨード剤液で消毒を行ったことから、卵が吸水している恐れはないと考えられる。その

結果、*R. salmoninarum* を高濃度に保菌した親魚が排卵した未受精卵でさえも陰性であった。体腔内に排卵された未受精卵においては、*F. psychrophilum* および *R. salmoninarum* の感染が成立している可能性は低いと考えられるが、さらに調査事例を重ねた上で判断することが適当であると考えられる。

第1章第2節以降では、卵内感染の経路および条件を検討した。受精卵と同様に、授精しない卵（不受精卵）でも卵内感染が成立したことから、精子の侵入が細菌侵入に対して直接的に関与する可能性は低く、吸水の過程で物理的に侵入している可能性が考えられる。さらに、吸水途中の卵を経時的に授精したところ、正常に発生した発眼卵が得られるのは吸水10分後までであり、*F. psychrophilum* の卵内感染がみられた時期も同じであった。つまり、卵門を精子が通過できた時期と卵内感染が成立した時期とが一致することになり、経路は卵門であることが間接的に証明されたと考える。SEMによる卵門の観察においても、吸水10分後までは卵門管が開口している状態が観察されるが、30分以後では卵門管が閉塞した状態が観察されたことでも裏付けられた。

次に、卵内への細菌進入部位であるが、卵表面の細菌が吸水に伴って卵門から侵入するのであるから、卵の表層変化に伴って囲卵腔が形成される魚卵の初期発生様式からしても、侵入部位は囲卵腔であることが考えられる。人工受精卵ではしばしば囲卵腔に余剰の精子が入っているとされ（岩松, 2004）、卵門管内にある余剰の精子が囲卵腔の形成に伴って中に入ったと考えられる。侵入部位が囲卵腔であるとする考えは、Kumagai and Nawata (2010) が感染卵の囲卵腔部に *F. psychrophilum* を観察していることから支持される。

さらに、成立するための環境条件としては、吸水時の環境水汚染よりも卵表面の汚染が強く影響し、その汚染程度は 10^7 CFU/ml 以上であることが明らかになった。感染試験では 10^7

CFU/ml 程度の汚染が必要であったが、細菌の侵入が物理的に起きているとなれば、確率は非常に低いにしても、これ以下の汚染濃度条件でも感染が起こり得ることが考えられる。よって、後述する防除技術により十分な処置に努めることが必要である。

また、第3節の試験では、*R. salmoninarum* の卵内感染が再現され、*A. salmonicida* でも一旦は卵内に侵入していることが確認された。さらには、一般細菌でも同じく感染が成立した。卵門からの物理的な侵入であるならば、このような結果は自然である。となれば、細菌ばかりではなく、IPNV や IHNV などのウイルスも同様に侵入することが考えられる。吉水ら (1988b)、Yoshimizu *et al.* (1989) は IHNV を受精直後のサクラマス (*Onchorhynchus masou*) およびサケ (*Onchorhynchus keta*) の卵内へ注射して消長を観察したところ、1~5 週間には卵内からウイルスが検出されなくなった。また、卵黄内に含まれる成分のウイルス不活化効果も確認している。この実験でウイルスを注射したのは卵黄内であり、囲卵腔ではない。侵入部位が異なるので、本研究の結果と比較検討することはできない。卵黄内にはウイルス不活化成分があるため、卵内ウイルスの分離培養方法を工夫する必要があるが、*F. psychrophilum* と同じように IHNV および IPNV でも人工感染試験を行い、囲卵腔へのウイルスの侵入と消長について調べる必要がある。

以上のとおり、卵内への細菌の侵入経路および条件を具体的に明らかにすることができた。しかし、卵内に細菌が侵入したことが感染成立につながらないケースも示された。*R. salmoninarum* では発眼卵内から細菌が分離され感染が確認されたが、*A. salmonicida* では感染が成立していなかった。この原因を検討するために、*F. psychrophilum* または *A. salmonicida* 汚染卵を吸水させて発眼期まで収容し、卵内における細菌の消長を経時的に調べた。その結果、*F. psychrophilum* および *A.*

salmonicida ともに一旦卵内へ侵入し、*F. psychrophilum* は卵内で増殖して発眼期の卵内生菌数が 10^7 CFU/粒程度に達するが、*A. salmonicida* では、7~14日までの間に消滅して行き、発眼卵では全く分離されないことが分かった。魚卵には、生体防御物質として知られるリゾチーム、レクチン、およびペルオキシダーゼが存在する (Shiina *et al.*, 2002; Tateno *et al.*, 1998; 工藤, 1983; 工藤, 2000; 岩松, 2004)。リゾチームに対しては、*R. salmoninarum* および *F. psychrophilum* は耐性であるが、*A. salmonicida* は耐性が低いとされ、耐性の違いと卵内感染との関連性が指摘されている (Yousif *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1997)。このように、感染成立の可否は、卵内腔内にある生体防御物質の作用に影響を受けることが考えられるが、詳細は今後の検討課題として残った。

また、*F. psychrophilum* 感染卵は正常卵と変わりなく発眼卵まで発育することが確認され、Kumagai and Nawata (2010) の報告と同様であった。養殖事業では、飼育した受精卵が発眼期に達した段階で、正常に発育した発眼卵と、死亡卵、不受精卵および発育不良卵を選別する作業 (検卵) が行われる。検卵が済んだ発眼卵はヨード剤で消毒され、防疫対策を行っているふ化場内の水槽に收容され、ふ化飼育される。感染卵は正常卵と外見上も変わらないので、検卵で淘汰されることなくふ化場内へ持ち込まれ、感染環が防疫施設内へと繋がることになる。また、卵内感染した卵群のふ化率は正常卵と同等であり、ふ化も正常に進むことも確認された。サケ科魚類卵のふ化に際しては、蛋白分解性のふ化酵素が卵内腔液中に出され、卵膜内層が溶けて薄くなることが知られている (山本, 1943; 川本, 1966)。卵内腔内で増殖した細菌もふ化酵素の影響を受けていることが十分に考えられる。また、仔魚がふ化の際または環境水中に拡散した細菌に感染し、発病に至るかどうかも分からない。ふ化酵素の作用および感染・発病の経過に関しては、今後の検討課題である。

本研究では、主に雌親魚および卵の汚染を対象にして卵内感染の機序について検討した。雄精液の関与については、十分考察するには試験例が乏しい。第1章第2節における人工感染試験では、*F. psychrophilum* で汚染し授精せずに吸水させた卵、細菌汚染して授精した卵および受精後に細菌汚染した卵のいずれからも細菌が分離され、感染率は同程度であった。この結果は、Evelyn *et al.* (1986b) が行った *R. salmoninarum* の試験結果と同じである。これらから、授精による精子侵入が細菌の侵入を誘導していることは考えにくい。また、人工授精時の精液の所要量は、卵1万粒に対して5~10mlとされ (立川, 1974)、卵に混じる体腔液量に対して $1/16 \sim 1/32$ 程度であり、卵内感染に関与する可能性は体腔液に比べて低いと考えられる。熊谷・縄田 (2008) も、精液中の *F. psychrophilum* 菌数は少なく、関与する可能性は低いと述べている。しかし、高濃度に汚染された精液で授精した場合には、精液に含まれている細菌で卵表面汚染されることになり、卵内感染の可能性を全く否定することはできない。人工感染試験などにより具体的に検討する必要がある。

2 種苗生産における卵内感染の防除技術

第1章において、卵表面の汚染濃度が、卵内感染が成立するための重要な条件であることが明らかになった。このため、内水面のサケ科魚類養殖の人工採卵において行われている等調液洗卵法に着目し、洗卵による除菌効果を調べた。その結果、試験規模では 10^4 CFU/ml 程度、事業規模でも $10^{4 \sim 5}$ CFU/ml 程度の細菌またはウイルスが除菌・除去されていること、汚染卵を洗卵すれば卵内感染を防除できることが明らかになった。体腔液中の *F. psychrophilum* や *A. salmonicida* の生菌数は、高い例でも $10^{3 \sim 4}$ CFU/ml であるから、洗卵によって卵表面の菌の大部分が洗い流されて、卵内感染のリスクが大きく低下していることが考えられる。従来、等調液洗卵法は受精率向上のために普及した技術

であるため、民間養魚場で実行されている洗卵方法と程度には差があることも明らかになった。防除対策として再認識し、効果の啓発と技術の普及に努める必要がある。とりわけ、BKD 防除対策として在来マス類の養魚場や、河川増殖用に飼育されるサケ種苗生産事業への普及効果が期待される。

このように、等調液洗卵による除菌効果が明らかとなる一方で、卵表面の汚染度が高い場合には洗卵しても菌が残ることが示された。洗卵後に残存する菌を卵消毒によって殺菌することで、卵内感染リスクをさらに低下させる必要がある。このため、サケ科魚類の発眼卵消毒で実行されている薬液消毒法(ヨード剤 200 倍液, 15 分間)による未受精卵消毒の有効性を検討した。その結果、この方法が *F. psychrophilum* や *R. salmoninarum* に対して有効であり、卵内感染の防除効果も確認することができた。ただし、確実な消毒効果を得るためには、人工採卵したままの状態の卵を消毒するのではなく、未受精卵に混じる体腔液や潰卵成分を等調液洗卵により洗浄除去する必要がある。このように、等調液洗卵は、除菌とともに未受精卵消毒における阻害物質を除去するために有効であり、等調液洗卵法と未受精卵消毒は一体的に実行されることが必要である。洗卵および卵消毒により、孵化場内への病原体の持ち込み(伝播)が阻止され、卵内感染の防除のみならず飼育環境の汚染防止においても防疫効果は格段に向上すると考えられる。

以上の成果を踏まえて、サケ科魚類の種苗生産における卵内感染の防除対策を図 1 に整理し、工程内容および技術的課題について以下に述べる。

親魚の保菌対策

卵内感染の問題は、排卵時の親魚体内における卵の汚染が原因となる。採卵用親魚群における保菌魚の比率および体腔液、精液中の生菌数の低減を図ることが先ず重要な対策である。親魚群に疾病が発生した場合には、水産用医薬品

で早期に治療し、産卵期まで流行した状態で持ち越さないことは当然行うべきである。さらに、BKD 対策で試みられている親魚への医薬品投与(木村ら, 1987; 小原, 2001)、親魚へのワクチン接種(降幡, 2006)などの手法によって親魚の保菌度を低減させるための技術開発が今後必要である。

人工採卵時の等調液洗卵

親魚から採卵した未受精卵を等調液で洗卵し、体腔液および卵表面に付着した病原体を除去する。等調液の使用量は、卵 1 万粒当たり 1~2 L とし、除菌効果が優れているシャワー方式を採用する。電気設備のない場所、洗卵器具の施設や作業用の空間が十分に確保できない場合には、園芸用ジョーロを利用した簡便な方法でも対応できる。等調液を作製する時には、必ず病原体汚染のない用水を使用する。また、洗卵廃水中には病原菌が多く含まれているので、養魚池や環境水中へそのまま排出せず、一旦貯留して消毒した後に排出することが適当である。

未受精卵のヨード剤消毒

等調液で希釈したヨード剤 200 液 10 L 中に、洗卵が済んだ未受精卵 5 万粒を入れて、15 分間の卵消毒を行う。卵表面にヨード剤が残っていると受精率が低下する恐れがあるため(東京都水産試験場, 1975)、清浄な等調液で洗浄してから授精する。その後、等調液で卵周囲の余分な精液を洗い流してから、再度ヨード剤で卵消毒を行ってからふ化水槽へ収容する。卵内感染は卵の吸水過程で起きることから、飼育水で希釈した消毒液を使用すれば、卵の吸水が進み、卵内へ進入した細菌までは完全に消毒できない。等調液で作製した消毒液を使用して卵の吸水を防ぎながら卵表面を完全に消毒することが重要である。

実際の養殖事業では、授精した卵を吸水させる前にヨード剤消毒している事例もみられる。1 回の卵消毒で十分であれば、作業が省力化できる。本研究においては、卵表面の細菌が卵内へ侵入することに対して、授精(精子の侵入)の

関与が疑われる結果はみられなかった。受精卵を吸水前に消毒する方法でも十分な効果が期待できると考えられるが、今後防除効果を検証した上で実用化することが必要である。

本研究により、養殖サケ科魚類の種苗生産において課題となっている卵内感染による垂直伝播の防除に関して、卵内感染機序を明らかにし、等調液洗卵法および未受精卵消毒の対策によって防除が可能であることを具体的に提示するこ

とができた。しかし、垂直伝播の機序を含めて問題が全て解決したわけではない。親魚の保菌対策において水産用医薬品やワクチン利用の点では、技術的にまた制度面でも解決されなければならない課題が残っている(吉水, 2007; 吉水・吉田, 2008)。また、今回得られた成果を養殖事業へ定着させるために、技術の改良と平準化に努めることが必要である。

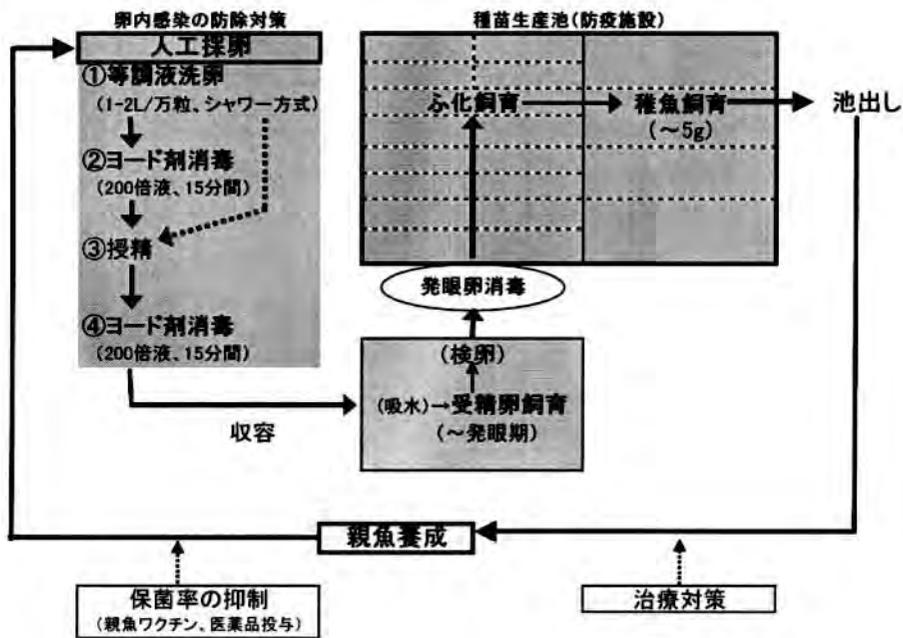


図1 種苗生産池における防疫対策モデル

謝 辞

本研究および論文の作成には、多くの方々のお力添えをいただいた。ここに記して感謝の意を表します。本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導、ご助言を頂き、本論文のご校閲を賜りました北海道大学大学院水産科学研究院教授 吉水 守博士に深甚なる謝意を表します。また、本論文の作成に当たりご校閲の労を賜った北海道大学大学院水産科学研究院教授 澤辺智雄博士、同研究院助教 笠井久会博士に謹んで感謝の意を表します。また、魚卵の人工感染試験手法について丁寧にご指導と情報提供をいただきました宮城県水産総合センター上席主任研究員 熊谷 明博士、卵門の電子顕微鏡観察において材料の処理から実際の観察に至るまで丁寧に指導をいただきました独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所札幌魚病診断・研修センター長 野村 哲一博士に厚く感謝いたします。

本研究を実施するためには、親魚の保菌調査などに対して県内養魚場の方々のご協力が不可

欠でした。また、供試用の卵を快くご提供いただいたことも本研究の成果に繋がりました。このような環境に恵まれたことに対して感謝し、心よりお礼申し上げます。

本研究の機会を与えられ、多くの便宜を図っていただきました長野県水産試験場の歴代場長 本西 晃博士、古川 賢男氏、細江 昭氏に心より感謝いたします。さらに、等調液洗卵実験において快く協力していただいた長野県水産試験場 小川 滋主任研究員をはじめ、研究を暖かく見守っていただいた職員の方々に感謝いたします。

終わりに、これまでの様々な研究活動において、養殖サケ科魚類の防疫対策に関する多くの知識とご指導をいただくとともに、本研究の遂行においてご鞭撻をいただいた長野県水産試験場元場長 山崎 隆義博士、社団法人全国水産技術者協会理事長 原 武史博士に心よりお礼申し上げます。

参考文献

- Amend, D. and J. P. Pietsch (1972) Virucidal activity of two iodophors to salmonid viruses. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **29**, 61-65.
- Brown, L. L., W. T. Cox and R. P. Levine (1997) Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Fravobacterium psychrophilum* within salmonid eggs. *Dis. Aquat. Org.*, **29**, 213-218.
- Bruno, D. W. and A. L. S. Munro (1986) Observations on *Renibacterium salmoninarum* and the salmonid egg. *Dis. Aquat. Org.*, **1**, 83-87.
- Bullock, G. L., R. R. Rucker, D. Amend, K. Wolf and H. M. Stuckey (1976) Infectious pancreatic necrosis: transmission with iodine-treated and non-treated eggs of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Fish. Res. Bd. Canada*, **3**, 1197-1198.
- 江草周三 (1994) 魚類における垂直伝播の機序. 魚病研究 **29**, 43-52.
- Elliott, D. G., R. J. Pascho and G. L. Bullock (1989) Developments in the control of bacterial kidney disease of salmonid fishes. *Dis. Aquat. Org.*, **6**, 201-215.
- Evelyn, T. P. T., E. Ketcheson and L. Prospero-Porta (1984a) Further evidence for the presence of *Renibacterium salmoninarum* in salmonid eggs and for the failure of povidone-iodine to reduce the intra-ovum infection rate in water-hardened eggs. *Fish. Dis.*, **7**, 173-182.
- Evelyn, T. P. T., J. E. Ketcheson and L. Prospero-Porta (1984b) The salmonid egg as a vector of the kidney disease bacterium, *Renibacterium salmoninarum*. pp. 111-117. In "Fish diseases, Fourth COPRAD Session" (ed.) Acuirup, Madrid, Spain.
- Evelyn, T. P. T., J. E. Ketcheson and L. Prospero-Porta (1986a) Persistence of the kidney disease bacterium, *Renibacterium salmoninarum*, in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) eggs treated during and after water hardening with povidone iodine. *J. Fish. Dis.*, **9**, 461-464.
- Evelyn, T. P. T., J. E. Ketcheson and L. Prospero-Porta (1986b) Experimental intra-ovum infection of salmonid eggs with *Renibacterium salmoninarum* and vertical transmission of the pathogen with such eggs despite their treatment with erythromycin. *Dis. Aquat. Org.*, **1**, 197-202.
- 降幡 充 (2006) ニジマスのヘルペスウイルス病に関する研究. 学位論文 (北海道大学), 75p.
- 古橋正吉・宮前卓之 (1976) 消毒薬の殺菌作用とその利用法, pp. 103-146. 滅菌法・消毒法第3集, 綿貫 詰・實川佐太郎・榊原欣作編, 文光堂, 東京
- 岐阜県水産試験場 (1992) 養殖対象サケ科魚類の防疫技術に関する研究, pp. 3-8, 平成3年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 第2分冊, 日本水産資源保護協会, 東京
- 原 武史 (1991) 水産養殖における消毒剤による環境浄化技術の展開, pp. 58-64, さけ・ます養殖における防疫事例集, 日本水産資源保護協会, 東京
- 原 武史・山崎隆義・田代文男・野本具視・小坂光昭・木村喬久 (1993) 種卵の移動による伝染性膀胱壊死症 (IPN) の伝播事例, pp. 78-80, 魚類防疫への挑戦, サケ・マス編, 緑書房, 東京
- 羽鳥秀一・本西 晃・西澤豊彦・吉水 守 (2003) 各種消毒剤の *Oncorhynchus masou virus* (OMV) に対する不活化効果. 魚病研究 **38**, 185-187.
- Holt, R. A., J. S. Rohovec and J. L. Fryer (1993) Bacterial coldwater disease, pp. 3-23. In "Bacterial diseases of fish" (ed) V. Inglis, R. J. Roberts and N. R. Bromage, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 兵藤則行・山田和雄・野上泰宏・鈴木惇悦・吉水 守 (1995) 垂直感染防除を目的としたエリスロマイシン注射時期の検討. 細菌性腎臓病 (BKD) の防疫に関する研究-1. 新潟県内水面水産試験場調査研究報告 **21**, 33-38.
- 稲葉伝三郎・野村 稔・富永 健 (1958) 養殖マス類の人工採卵改善に関する研究-1, 人工受精に及ぼす潰卵の影響と洗卵法について. 日本水産学会誌, **23**, 758-761.
- 井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史 (1990) IPN ウイルスに対する市販消毒剤の殺ウイルス効果. 魚

- 病研究 25, 81-86.
- 井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史 (1991) HIN ウイルスに対する市販消毒剤の殺ウイルス効果. 魚病研究 26, 189-194.
- 岩松鷹司 (1997) 発生, pp. 200-224, メダカ学全書, 大学教育出版, 岡山.
- 岩松鷹司 (2004) 精子侵入に伴う卵の反応, pp. 103-134, 魚類の受精, 培風館, 東京.
- 小川和夫・室賀清邦 (2008) 改訂・魚病学概論, 恒星社厚生閣, 東京, 214p.
- 川本信之 (1966) 生殖, pp. 146-164, 新版魚類生理生態学, 恒星社恒星閣, 東京.
- 木村喬久・吉水 守・原 武史 (1987) サケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD) の診断技法, 水産増養殖叢書, 日本水産資源保護協会, 東京.
- 木村喬久・吉水 守 (1990) 魚類病原ウイルスに対する各種消毒剤の効果的使用法に関する研究, pp. 29-48, 平成元年度魚類防疫対策技術開発研究成果報告書, 第二分冊, 日本水産資源保護協会, 東京.
- 桐生 透 (2005) ニジマス, pp. 29-56, 水産増殖システム 2: 淡水魚, 隆島史夫・村井 衛編, 恒星社恒星閣, 東京.
- Kobayashi, W. and T. S. Yamamoto (1993) Factors inducing closure of micropylar canal in the chum salmon egg. *Jour. Fis. Biol.* 42, 385-394.
- 小原昌和 (2001) 在来マスの BKD 垂直伝播防止に関する研究-II, エリスロマイシン注射による養殖アマゴシン魚群の BKD 保菌率の抑制. 長野県水産試験場研究報告 5, 42-45.
- 近藤博文・本西 晃 (2000) ニジマス受精作業の検討-I, 等調液の代用としての 1% 食塩水の利用, pp. 40, 平成 10 年度長野県水産試験場事業報告.
- 工藤重治 (1983) 魚類の受精, 遺伝 37, 23-29.
- 工藤重治 (2000) 魚卵の受精膜における微生物に対する防御機構, 生体の科学 51, 221-227.
- Kumagai, A., K. takahashi, S. Yamaoka and H. Wakabayashi (1998) In effectiveness of iodophore treatment in disinfecting salmonid eggs carrying *Cytophaga psychrophila*. *Fish Pathol.*, 33, 123-128.
- Kumagai, A., S. Yamaoka, K. Takahashi, H. Fukuda and H. Wakabayashi (2000) Waterborne transmission of *Fravobacterium psychrophilum* in coho salmon eggs. *Fish Pathol.*, 35, 25-28.
- 熊谷 明・縄田 暁 (2007) サケ科魚類冷水病の垂直感染防除に関する研究, pp. 3-15, 平成 18 年度養殖衛生管理技術開発研究成果報告書, 日本水産資源保護協会, 東京.
- 熊谷 明・縄田 暁 (2008) サケ科魚類冷水病の垂直感染防除に関する研究, pp. 204-215, 平成 19 年度養殖衛生管理技術開発研究成果報告書, 日本水産資源保護協会, 東京.
- 熊谷 明・縄田 暁 (2009) サケ科魚類冷水病の垂直感染防除に関する研究, pp. 8-16, 平成 20 年度養殖衛生管理技術開発研究成果報告書, 日本水産資源保護協会, 東京.
- 熊谷 明 (2009) 冷水病菌の卵内感染メカニズムとその防除法および養魚場における本菌の蔓延状況, pp. 8-16, 季報, 日本水産資源保護協会, 東京.
- Kumagai, A. and A. Nawata (2010) Mode of the intra-ovum infection of *Fravobacterium psychrophilum* in salmonid eggs. *Fish Pathol.*, 45, 31-36.
- Lee, E. G. H. and T. P. T. Evelyn (1989) Effect of *Renibacterium salmoninarum* levels in the ovarian fluid of spawning chinook salmon on the prevalence of the pathogen in their eggs and progeny. *Dis. Aquat. Org.*, 7, 179-184.
- MacFadden, T. W. (1996) Effective disinfection of trout eggs to prevent egg transmission of *Aeromonas liquefaciens*. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 26, 2311-2318.
- Matsui, T., T. Nishizawa and M. Yoshimizu (2010) Modification of KDM-2 with culture-spent medium for isolation of *Renibacterium salmoninarum*. *Fish Pathol.*, 44, 139-144.
- 森 勝義・神谷久雄 (1995) 水産動物の生体防御 (日本水産学会監修), 水産学シリーズ 104, 恒星社恒星閣, 東京, 129p.
- 本西 晃 (1991) BKD 対策の経過, pp. 49-57, さけ・ます養殖における防疫事例集, 日本水産資源保護協会, 東京.
- 本西 晃 (2004) 養殖サケ科魚類の伝染性造血器壊死症 (HIN) 防除技術開発に関する研究, 学位論文 (北海道大学), 202p.
- 長野県水産指導所 (1957) 鱒採卵効率を向上させる為に

- (等調液洗浄受精法について), にじます, 3, 1-23.
- 野村哲一・吉水 守・木村喬久 (1992) サケ, カラフトマスおよびサクラマス成熟親魚体腔液からの *Aeromonas salmonicida* の検出. 魚病研究, 27, 69-72.
- 野村哲一 (1993): サケマス増殖事業におけるせつそう病の疫学的研究 (北海道大学学位論). さけ・ますふ化場研究報告, 47, 1-99.
- 野村哲一・笠井久会 (2003): さけ・ます養殖における防疫対策. 魚と卵, 169, 1-12.
- 野村哲一 (2005): サケ (シロザケ), 水産増養殖システム 2: 淡水魚 (隆島史夫・村井 衛編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 15-21.
- 野村哲一・吉水 守 (2006): サケ・マス親魚からのせつそう病菌 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* の検出. さけ・ます資源管理センター技術情報 魚と卵, 172, 25-29.
- 坂崎利一 (1978) 培地の試験法, pp. 200-220, 新細菌培地学講座一上, 近代出版, 東京.
- 佐古 浩・石田典子・前野幸男・反町 稔 (1988) *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* ならびに *V. ordalii* に対する各種消毒剤の殺菌作用. 魚病研究, 23, 219-229.
- 佐々木治男・本西 晃・三城 勇・山崎正幸・山崎隆義 (1976) ニジマスの IHN について. 長野県水産指導所研究報告, 魚病 1976, 45-58.
- Shiina, N., H. Tateno, T. Ogawa, K. Muramoto, M. Saneyoshi and H. Kamiya (2002) Isolation and characterization of L-rhamnose-binding lectins from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) eggs. *Fis. Sci.*, 68, 1352-1366.
- 鈴木敬二 (1981) ニジマス洗卵液の再検討. 養殖, 18, 59-62.
- 立川 互 (1974) 種苗生産, pp. 46-70, 養魚講座 10 ニジマス, 緑書房, 東京.
- 高野和則 (1974) 生殖腺の成熟過程, pp. 18-30, 魚類の成熟と産卵-その基礎と応用, 日本水産学会編, 恒星社恒星閣, 東京.
- 高野和則 (1989) 卵巣の構造と配偶子形成, pp. 3-34, 水族繁殖学, 隆島史夫・羽生 功編, 緑書房, 東京.
- 隆島史夫 (1974) 成熟と脂質代謝, pp. 76-87, 魚類の成熟と産卵-その基礎と応用, 日本水産学会編, 恒星社恒星閣, 東京.
- 隆島史夫 (1982) 繁殖の生理, pp. 11-45, 淡水養殖技術, 野村稔編, 恒星社恒星閣, 東京.
- 田代文男 (1976) 等調液による洗卵法, pp. 14, 養鱒の研究, 全国湖沼河川養殖研究会養鱒部会編, 緑書房, 東京.
- Tateno, H., T. Ogawa, K. Muramoto, H. Kamiya and A. Saneyoshi (1998) Isolation and characterization of rhamnose-binding lectins from eggs of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) homologous to low density lipoprotein receptor superfamily. *J. Biol. Chem.*, 273, 19190-19197.
- 朝長文弥・右川和夫・尾家重治・尾崎照美・古泉秀雄・幸保文治・近藤由利子・佐治栄三・島田慈彦 (1987) 消毒剤の効果に影響を与える因子, pp. 45-51, 院内における消毒剤の使用指針, 日本病院薬剤師会編, 薬事日報社, 東京.
- 東京都水産試験場 (1975) 消毒剤としてのヨード剤について, pp. 54-64, 全国湖沼河川養殖研究会第 31 回養鱒部会要録.
- 山本時男 (1943) 魚類の孵化の機構, pp. 187-193, 魚類の発生理, 養賢堂, 東京.
- 山本時男 (1958) 魚卵の受精生理, pp. 73-135, 発生理の研究, 団勝磨・山田常雄編, 培風館, 東京.
- 山崎隆義・原 武史 (1976) 伝染性造血器壊死症 (IHN), pp. 83-88, 養鱒の研究, 全国湖沼河川養殖研究会養鱒部会編, 緑書房, 東京.
- 山崎隆義・佐々木治男・田代文男 (1976) ニジマスの IPN について. 長野県水産指導所研究報告, 魚病 1976, 28-44.
- 吉水 守・瀧澤宏子・木村喬久 (1986) 魚類病原ウイルスの紫外線感受性. 魚病研究, 21, 47-52.
- 吉水 守・野村哲一・栗倉輝彦・木村喬久 (1988a) 北日本におけるサケ科魚類採卵親魚の魚類病原ウイルス保有状況について-昭和 51 年~昭和 61 年. さけ・ますふ化場研究報告, 42, 1-20.
- 吉水 守・佐見 学・木村喬久 (1988b) サクラマスおよびシロザケ受精卵中における IHNV の消長に関する研究. 日水誌, 54, 2089-2097.
- 吉水 守・野村哲一 (1989) サケマス採卵親魚の病原微生物検査法. 魚と卵, 158, 49-59.
- Yoshimizu, M., T. Nomura, Y. Ezura and T. Kimura

- (1989) Survivability of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in fertilized eggs of masu (*Oncorhynchus masou*) and chum salmon (*O. keta*). *J. Aquat. Anim Health*, 1, 13-20.
- 吉水 守・日向進一 (1992) 養殖用水の殺菌法—紫外線およびオゾンの利用. 工業用水, 404, 2-8.
- Yoshimizu, M. (1996) Disease problems of salmonid fish in Japan caused by international trade. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, 15, 533-549.
- 吉水 守・笠井久会 (2002) 種苗生産施設における用水及び排水の殺菌. 工業用水, 523, 13-26.
- 吉水 守・笠井久会 (2005) 魚類ウイルス病の最前線—その現状と防除対策. 化学と生物, 43, 48-58.
- 吉水 守 (2007) 稚魚期におけるウイルス性疾病対策の経緯と今後の課題-I. サケ科魚類の疾病対策, 魚病研究, 42, 231.
- 吉水 守・吉田夏子 (2008) 水産業で使用されている医薬品. 環境技術, 37, 860-864.
- Yoshimizu, M. (2009) Control strategy for viral diseases of salmonid fish, flounder and shrimp at hatchery and seed production facility in Japan. *Fish Pathol.* 44, 9-13.
- 吉浦康寿・釜石 隆・中易千早・乙竹 充 (2006) Peptidyl-prolycyl transisomerase C 遺伝子を標的としたPCRによる *Flabobacterium psychrophilum* の判別と遺伝子型. 魚病研究, 41, 67-71.
- Yousif, A. N., L. J. Albright and T. P. T. Evelyn (1994) In vitro evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs. *Dis. Aquat. Org.*, 19, 15-19.