

長野県内の養鱒場における等調液洗卵の実態と除菌効果

小原 昌和

Actual use of egg-washing with isotonic solution and its effect on the elimination of bacteria at trout farms in Nagano Prefecture

Masakazu Kohara

養殖サケ科魚類の種苗生産にとって、細菌性腎臓病(BKD)や細菌性冷水病(BCWD)の防除は重要な課題である。卵内感染による垂直伝播が発生の原因として考えられているが、感染機序に関しては不明な点が多く、¹⁾ 防除が難しいと考えられてきた。近年になって、 10^{6-7} CFU/mL以上の濃度で汚染された卵を人工授精すれば、卵の吸水過程において菌が卵膜から卵内腔内に侵入し、卵内感染が起ることが明らかにされた。²⁾ サケ科魚類の成熟卵は体腔内に排卵され、体腔液とともに採卵される。体腔液中には、せつそう病菌(*Aeromonas salmonicida*)、BKD菌(*Renibacterium salmoninarum*)、冷水病菌(*Flavobacterium psychrophilum*; 以下 *F.p.* と記す)および IHNV などの病原体が多く含まれているので、⁴⁾ 体腔液が付着することにより卵の表面は病原体で汚染される。

一方、内水面の養鱒場では、採卵期の人工授精作業において未受精卵を等調液⁵⁾で洗浄する作業が行われる。この等調液洗卵法は、受精率を向上させる目的で開発された技術であるが、^{6,7)} 洗卵の際に卵に付着した病原細菌が洗い流されるため、卵内感染の防除に効果のあることが分かってきた。¹⁾ 通常、洗卵は濯ぎまたはシャワーによる方法で行なわれるが、これらを組み合わせて行なえば 10^4 程度の除菌効果のあることが実験的に分っている。そこで、ニジマスの事業採卵において等調液洗卵法の除菌効果を検証するとともに、県内養鱒場で行なわれている洗卵の実態を調べ、等調液洗卵法による卵内感染の防除技術を体系化するための課題を検討した。

材料と方法

ニジマス事業採卵における等調液洗卵の除菌効果

洗卵時の等調液使用量 当場の種苗生産業務として行なわれたニジマスの事業採卵において、洗卵時の等調液使用量を調査した。採卵から受精卵収容までの作業工程は、次のとおりである。

- ① ニジマス親魚から採卵法により採卵する (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) で洗卵をする (2~3 回の濯ぎ洗卵をした後にシャワー洗卵をする)
- 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 分間程静置してから、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 倍に希釈したヨード剤消毒液 10 L 中に受精卵を入れ、15 分間消毒を行う (途中で数回、卵および消毒液を攪拌する)
- ⑦ 卵消毒が終了したら、受精卵を飼育室内のふ化槽に収容する

調査は、事業採卵において担当職員 1 名が行った 3 回の洗卵作業を対象にした。作業内容は、2 回の濯ぎ洗卵とシャワー洗卵であった。処理卵数は、第 1、2 回では各 24,000 粒であり、第 3 回が 9,700 粒であった。濯ぎ洗卵では洗卵用容器に注いだ等調液量を、シャワー洗卵では洗卵用ザルの下側に設けた容器に回収した液量を計量し、卵 1 万粒当たりの使用量を計算した。洗卵による *F.p.* 汚染卵の除菌量 人為的に *F.p.* 汚染したニジマス卵を用いて事業採卵時と同様に作業を行い、洗卵の前後に卵周囲の体腔液または等調液を採取して生菌数を調べた。また、作業の最終工程で受精卵のヨード剤消毒が行なわれていることから、卵消毒終了時においても同様に検査を行なった。

1 回の試験で処理する未受精卵は 25,000 粒とし、小原ら¹⁾に従って作製した *F.p.* 菌液 100 mL (10^{10} CFU/mL) を添加して卵表面を汚染した。生菌数測定はミスラ法¹²⁾で行い、菌培養には AOAE 寒天平板培地 (トリプトン 0.5 %、酵母エキス 0.05 %、牛肉エキス 0.02 %、酢酸ナトリウム 0.02 %、FBS 5%、寒天 1 %、pH 7.2) を使用し、15 °C で 7 日間の培養条件とした。なお、卵消毒後の検査では、採取した試料中のヨード剤を 0.1 M/L チオ硫酸ナトリウム液で中和してから供試した。

卵内感染防除効果の検証 授精、卵消毒が終了した時点で、処

表1 ニジマス洗卵作業における等調液の使用量

試験	処理卵 (粒)	濯ぎ洗卵 (L)		シャワー洗卵 ^{*2} (L)
		第1回	第2回	
1	24,000	2.00 (0.83) ^{*1}	2.20 (0.91)	3.25 (1.34)
2	24,000	2.30 (0.95)	2.15 (0.88)	3.40 (1.40)
3	9,700	1.55 (1.60)	1.70 (1.75)	2.10 (2.16)

^{*1}()内の数値は、卵1万粒あたりの等調液使用量を示している

^{*2}シャワー時間は、試験1,2ではそれぞれ28.8,30.0秒であり、試験3では18.9秒であった

理卵の中からそれぞれに約200粒を抜き取り、実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、期間中の水温は10~12℃であった。なお、授精用の精液から*F.p.*は分離されなかった。

発眼期に、各試験区から60粒の発眼卵を採取し、卵内容物から*F.p.*の分離検査を行った。検査における卵消毒、卵内容物の採取および分離培養の操作は小原ら¹¹⁾に従った。

養鱒場の洗卵実態調査

長野県内で、ニジマスおよび在来マス(アマゴ・ヤマメ・イワナ)を養殖し、年間に10万粒以上の発眼卵を生産している養鱒場を対象にして、採卵作業における洗卵の実施状況について聞き取り調査を行った。平成20年に行なった養殖実態調査の結果をもとに、民間養鱒場19、公的機関2の合計21養鱒場を選定し、平成21年に調査を行った。聞き取り内容は、次の3項目とした。

① 等調液の処方

ニジマス体腔液の浸透圧を参考にして開発された等調液を標準法とし、近年、養鱒場で多く使用されている1%前後の食塩水^{13,14)}を簡便法として区別した。

② 洗卵方法

卵を收容した容器内に等調液を加えてから卵を撪拌洗浄した後に、上澄みを排出する方法を濯ぎ洗卵とし、ザルに收容した卵に等調液をシャワー状にかける方法をシャワー洗卵とした。なお、シャワー状にかけるのではなく、等調液を容器から卵にかけ流す方法もシャワー洗卵に含めた。

③ 等調液の使用量

1回の洗卵において、処理する卵数量と等調液の使用量を聞き取り、卵1万粒に対する等調液使用量(L/万粒)を求めた。

結果

ニジマス事業採卵における等調液洗卵の除菌効果

洗卵時の等調液使用量 ニジマス事業採卵で洗卵に使用された等調液の量を表1に示した。処理卵数が事業と同規模であった試験1,2では、濯ぎ洗卵は0.83~0.95L/万粒が、シャワー洗卵には1.34~1.40L/万粒の等調液が使用されていた。通常より少ない規模であった試験3における使用量は、試験1,2に比べて、濯ぎ洗卵では1.9倍、シャワー洗卵では1.5倍であった。

洗卵による*F.p.*の除菌および卵内感染防除の効果 洗卵およびヨード剤消毒による除菌量と発眼期における卵内感染率の結果を表2に示した。洗卵前の時点では卵周囲の体腔液中の*F.p.*生菌数は $10^{7.8-8.2}$ CFU/mLであったが、洗卵後には $10^{2.3-3.8}$ CFU/mLになり、洗卵によって $10^{4.2-5.9}$ 低下した。また、消毒終了時では*F.p.*は分離されなかった。

洗卵後に授精し、ヨード剤消毒を行わずに飼育した試験区(洗卵区)と最終工程において消毒を行った区(卵消毒区)のいずれの発眼卵内からも*F.p.*は分離されなかった。

県内養鱒場の洗卵実態

21養鱒場に対する聞き取り調査の結果を図1に示した。洗卵用等調液の処方は、0.9~1%食塩水の簡便法が最も多く16件

表2 *F. psychrophilum*汚染卵における等調液洗卵、卵消毒の除菌及び卵内感染防除の効果

試験	処理卵 (粒)	<i>F. psychrophilum</i> 生菌数 (Log ₁₀ CFU/mL)			卵内感染率 (感染卵数/検査卵数)	
		洗卵前	洗卵後(除菌量) ^{*1}	卵消毒後 ^{*2}	洗卵区	卵消毒区
1	25,000	7.8	2.8 (5.0)	— ^{*3}	0/60	0/60
2	25,000	8.0	3.6 (4.4)	—	0/60	0/60
3	25,000	8.0	3.8 (4.2)	—	0/60	0/60
4	25,000	8.2	2.3 (5.9)	—	0/60	0/60

^{*1} 洗卵では2~3回の濯ぎ洗卵およびシャワー洗卵を行った

^{*2} 等調液で希釈したポビドンヨード剤(水産用イソジン)200倍液で15分間卵消毒した

^{*3} 検出限界(1.3Log₁₀/mL)未満を示す

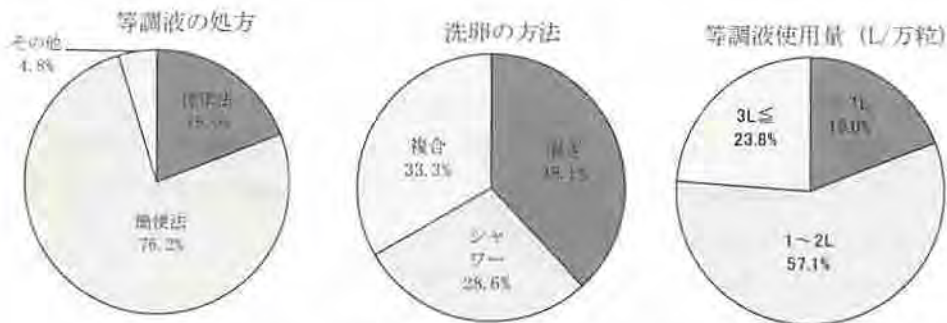


図1 長野県内の養鱒場における等調液洗卵の実態

県内で、サケ科魚類の採卵を行い、年間に10万粒以上の発眼卵を生産している21の養魚場を対象に聞き取り調査を行なった。

(76.2%)であり、ついで標榜法が4件(19.0%)であった。また、1%炭酸水素ナトリウム液¹⁾の使用例が1件(4.8%)であった。洗卵方法は、濯ぎ洗卵単独が8件(38.1%)、シャワー洗卵単独が6件(28.6%)であり、両者を組み合わせた複合洗卵が7件(33.3%)であった。1回の洗卵作業の規模は、1尾の親から採卵する度に洗卵を行う小単位のものから10万粒以上をまとめて行う事例もあり、養鱒場により違いがみられた。卵1万粒あたりの等調液使用量を求めたところ、1~2L程度が12件(57.1%)で最も多く、次いで3L以上のものが5件(23.8%)、1L未満のものが4件(19.0%)であった。使用量が1L未満の事例の洗卵方法は、濯ぎ洗卵が3件(14.3%)とシャワー洗卵が1件(4.8%)であり、全てが在来マス(イwanaまたはヤマメ)養殖の事例であった。

考察

ニジマス事業採卵で行った試験では、2~3回の濯ぎ洗卵と1回のシャワー洗卵がなされた。その結果、卵周囲の*E. p.*汚染濃度が 10^{2-5} 下がり、事業規模の洗卵においても小原ら¹¹⁾の実験と同等の除菌効果のあることが分かった。洗卵前の濃度は、卵内感染が成立するとされる濃度(10^{6-7} CFU/mL)以上であり、²⁾卵内感染が起きるリスクが高い状態であった。洗卵により汚染度が下がった卵を授精して飼育したが、発眼卵には卵内感染がみられず、事業においても等調液洗卵による卵内感染の防除効果を検証することができた。

一方、調査した県内の全養鱒場で洗卵が行われており、等調液の処方は簡便法が最も多く(76.2%)利用されていた。方法では、単独または複合型を含めてシャワー洗卵を採用している事例が61.9%を占めた。等調液使用量では、卵1万粒あたり1~2L程度が最も多かった(57.1%)が、1L未満の非常に少ない事例が4件みられた。この事例における洗卵方法は、濯ぎ洗卵が3件であり、シャワー洗卵が1件であった。使用量が少

ない上に濯ぎによる洗卵では、除菌効果は非常に低いと考えられる。

等調液洗卵は、人工授精を改善するために開発され、養鱒場において普及してきたが、洗浄方法や等調液の使用量などの具体的な内容は体系化されていない。防除技術として体系化するためには、次の三点が重要であると考えられる。1点目は、卵内感染が成立する濃度以下の状態まで汚染を低減するために必要な除菌目標量である。これまでに報告された体腔液中の生菌数の上限は、せつそう病菌が $10^{6.9}$ CFU/mL、⁴⁾冷水病菌が $10^{7.7}$ CFU/mLであり、⁶⁾BKD菌が $10^{10.4}$ CFU/mLである。⁵⁾在来マス養殖の場合には、BKD菌による体腔液の汚染濃度が非常に高い点に留意する必要がある。2点目は、洗卵方法である。卵1万粒当たり等調液1Lを使用した場合、1回の濯ぎ洗卵で 10^1 程度除菌でき、シャワーでは 10^2 程度が除菌されるので、シャワー洗卵の方が効率が良い。¹¹⁾従って、シャワー洗卵を基本に作業を組み立てることが重要である。3点目は、等調液の使用量である。各養鱒場によって1回の作業で処理する卵の量は様々であるが、前述の比率をもとにして各自の規模に応じた適正使用量を求めればよい。

なお、本試験の結果でも明らかのように、洗卵だけで卵表面を完全に除菌することはできない。まして、BKD菌のように汚染が非常に高濃度である場合、除菌目標量を達成するためには洗卵を十分に行なう必要があるが、作業性の点からも実際の洗卵による除菌程度には限界がある。そこで、残存菌を効率的に除去する対策としてヨード剤による卵消毒¹⁰⁾を取り入れる必要がある。採卵した未受精卵には体腔液や産卵由来の蛋白などの有機物が付着しており、これらによってヨード剤の消毒効果が低下することが予想される。産卵由来の蛋白などを洗い流すための等調液洗卵法は、ヨード剤消毒の前処理としても有効であると考えられる。従って、等調液洗卵とヨード剤消毒を組み合わせた防除技術を体系化するとともに、養鱒場における魚病発生状況や設備、作業実態に応じた具体的な技術指針を示しなが

ら普及を図ることが重要である。

要 約

- 1) ニジマス事業採卵を対象にして等調液洗卵法の除菌効果を検証するとともに、養鱈場の洗卵実態を調査し、等調液洗卵法による卵内感染防除技術の体系化を検討した。
- 2) 当場のニジマス事業採卵では、1回の濯ぎまたはシャワー洗卵で1L前後の等調液が使用されていた。
- 3) 人為的に *F. psi* 汚染 (10^5 CFU/ml) したニジマス卵を2~3回の濯ぎとシャワーにより洗卵した結果、卵の汚染濃度は 10^4 以下に低下した。
- 4) 等調液洗卵により除菌したニジマス未受精卵を授精して飼育し、発眼期における卵内感染の有無を検査したが、感染卵はみられなかった。
- 5) 県内の21養鱈場では、洗卵用として簡便法の等調液が最も多く使用され、濯ぎまたはシャワー洗卵の単独、若しくは両者を複合した方法で作業が行われていた。等調液使用量が卵1万粒当たり1L未満と少ない事例が19%みられたが、これらは在来マス養殖における事例であった。
- 6) 等調液洗卵法による卵内感染防除技術の体系化において、親魚の病原菌汚染の実態を踏まえた除菌目標量の設定、シャワー洗卵の実施、および処理卵数に応じた適正量の使用が重要であると考えられる。

文 献

- 1) 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.
- 2) Kumagai A, Nawata A. (2010) : Mode of the intra-ovum infection of *Flavobacterium psychrophilum* in salmonid eggs. *Fish Pathol.* 45, 31-36.
- 3) Kohara M, Kasai H, Yoshimizu M. (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.
- 4) 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.
- 5) Evelyn T P T, Prosreri-Porta L, Ketcheson J E. (1986) : Persistence of the kidney-disease bacterium, *Renibacterium salmoninarum*, in coho-salmon, *Oncorhynchus kitch* (Walbaum), eggs treated during and after water-hardening with povidone-iodine. *J. Fish Dis.* 7, 173-182.

- 6) Kumagai A, Nawata A. (2011) : Concentration of *Flavobacterium psychrophilum* in the ovarian fluid and milt of cultured salmonids. *Fish Pathol.* 46, 116-119.
- 7) 吉水 守・野村哲一・栗倉輝彦・木村喬久 (1988) : 北日本におけるサケ科魚類採卵親魚の魚卵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.
- 8) 田代文男 (1976) : 等調液による洗卵法. 養鱈の研究 (付刊 湖沼河川養殖研究会養鱈部会編), 録書房, 東京, 14.
- 9) 長野県水産指導所 (1957) : 鱈採卵効率を向上させる為に(等調液洗卵受精法について). にじます 3, 1-23.
- 10) 稲葉伝三郎・野村 隆・富永 健 (1958) : 養鱈マス類の人工採卵改善に関する研究—1. 人工受精に及ぼす灌卵の影響と洗卵法について. 日本誌 23, 758-761.
- 11) 小原昌和・小川 聡・笠井久会・吉水 守 (2010) : 養鱈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.
- 12) 坂崎利一 (1978) : 培地の試験法. 新細菌培地学講座—上. 近代出版, 東京, 200-220.
- 13) 立川 互 (1974) : 種苗生産. 養魚講座 10 ニジマス, 録書房, 東京, 47-70.
- 14) 鈴木敬二 (1981) : ニジマス洗卵液の再検討. 養殖 18, 59-62.
- 15) 木西 晃・横山隆雄・山崎正幸・近藤博文・熊川真二・内田博道 (2001) : ニジマス卵の媒精法 (1.1% NaHCO_3 溶液浸漬法) の検討. 平成11年度長野県水産試験場事業報告, 38.
- 16) Kumagai A, Nawata A. (2010) : Prevention of *Flavobacterium psychrophilum* vertical transmission by iodophore treatment of unfertilized eggs in salmonids. *Fish Pathol.* 45, 164-168.