

等調液洗卵はニジマス未受精卵のヨード剤消毒効果を向上させる

小原昌和・笠井久会*・吉水 守*

Egg-washing with isotonic solution improves effect on the disinfection of rainbow trout pre-fertilized eggs with povidone iodine

Masakazu Kohara, Hisae Kasai* and Mamoru Yoshimizu*

サケ科魚類の細菌性腎臓病（以下、BKD とする）や細菌性冷水病（以下、冷水病とする）は卵内感染によって垂直伝播することが知られている^{1,2)}。人工受精過程の吸水時に卵表面の原因菌が卵内に侵入することにより感染が起きるが、感染成立の可否は、卵表面の汚染程度の影響を受ける^{3,4)}。採卵作業の中で行われる等調液洗卵は、未受精卵表面を除菌し、卵内感染防除効果のあることが報告されている⁵⁾。しかし、等調液洗卵では卵表面の病原菌は完全には除菌されないことから、確実に感染を防除するために未受精卵をヨード剤消毒することが提案されている^{6,7)}。

ヨード剤消毒の際に蛋白質などの有機物が混在すると、消毒効果が低下する^{8,9)}。サケ科魚類の採卵では、未受精卵に体腔液が混じるほか、人為的な搾出操作によって潰卵が生じる^{10,11)}。ニジマスの体腔液、完熟卵には蛋白質などが含まれるため^{12,13)}、採卵した未受精卵をそのままの状態消毒した場合、十分な消毒効果が得られない恐れがある。一方、等調液洗卵は、受精率を向上させるために潰卵由来の蛋白質を等調液で溶解・除去するので、ヨード剤の消毒効果を高める働きが期待される。そこで、体腔液および潰卵がヨード剤の消毒効果に及ぼす影響を調べるとともに、等調液洗卵によってこれらを除去した場合の消毒効果について検討した。

材料と方法

消毒液の作製

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。本試験では未受精卵の消毒が目的であるから、消毒液の希釈調整のために滅菌等調液を使用した。

試験菌液

消毒効果を判定するために、*Aeromonas salmonicida*、*Fraxobacterium psychrophilum* および *Renibacterium salmoninarum* の3菌種を用いた。*A. salmonicida* にはTS液体培地を使用して20℃で2日間、*F. psychrophilum* にはAOAE液体培地を使用して15℃で3日間、*R. salmoninarum* にはKDM-SMRs液体培地¹⁷⁾を使用して15℃で5日間の培養を行った。遠心分離によって培養菌液から培地を除去してから滅菌等調液に菌体を懸濁させる菌体洗浄操作を2回行い、最後

に滅菌等調液に懸濁させたものを試験菌液とした。試験1における*A. salmonicida*、*F. psychrophilum* および *R. salmoninarum* 試験菌液の濃度は、それぞれ $10^{8.6}$ 、 $10^{8.1}$ および $10^{9.8}$ CFU/mL であり、試験2における各濃度は、それぞれ $10^{8.6}$ 、 $10^{8.4}$ および $10^{9.8}$ CFU/mL であった。

消毒液中の生菌数測定

消毒反応終了時に0.1 mL の試料を分取し、滅菌等調液で10倍階段希釈した。ミスラ法¹⁵⁾により各希釈試料を寒天平板上で培養し、残存した生菌数を求めた。本法の検出限界は $10^{1.3}$ CFU/mL であった。*A. salmonicida* にはTSA培地を使用して15℃で5日間、*F. psychrophilum* にはAOAE寒天培地を使用して15℃で3日間、*R. salmoninarum* にはKDM-SMRs寒天培地を使用して15℃で5日間の培養を行った。

体腔液、潰卵液および潰卵体腔液の作製

ヨード剤消毒に対する影響を調べるための阻害物質として、ニジマス体腔液および潰卵の2種類を対象にし、消毒液に添加する阻害物質液を以下の方法で作製した。

マイクロピペットを使用してニジマス雌親魚の生殖孔から採取した30尾分の体腔液を混合し、0.45 μ m孔径のメンブレンフィルターでろ過除菌したものを供試用の体腔液とした。

潰卵液を作製する前に、ニジマス未受精卵を滅菌等調液で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、その後滅菌等調液で2回洗浄することによりヨード剤を除去した。滅菌等調液10 mL 中において、滅菌注射針で卵2粒の殻を切裂いて卵内内容物を取り出した。卵内内容物が十分溶解するように攪拌した後に、卵殻を取り除いた等調液を潰卵液とした。

潰卵内内容物が混合した体腔液（潰卵体腔液）については、上記の除菌体腔液10 mL 中において卵2粒を潰し、以下の操作は潰卵液の方法に準じて作製した。

ヨード剤消毒における体腔液、潰卵の混入率

卵消毒における消毒液量と処理卵数は、養鱒業に普及している「消毒液10 L 当り卵5万粒」の用量¹⁶⁾を基準にした。体腔液は液体であることから、消毒液に混入した場合の体腔液容量の比率を混入率とし、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。

*北海道大学大学院水産科学研究院

採卵時に、1尾のニジマス親魚から採取される体腔液量の平均値は42.1 mLであり、採卵数の平均値は2,668.1粒である¹⁾。この値から、卵50,000粒に相当する体腔液量を求め、消毒液10 Lに対する比率を計算すると約8%になる。この調査資料において、個体別の高い事例は33.1%である。これらの点を考慮して、試験では、事業的な採卵で想定される混入率（以下、標準混入率とする）を10%とした。

また、採卵1尾につき0~14粒（平均値5.3粒）の潰卵がみられる¹⁾。採卵数に対する潰卵の比率は、平均値が0.2%であり、個体別の最高値は0.9%である。事業的な採卵では、潰卵を全く含まないことはかなり困難であり、潰卵の数量もさらに多くなることが予想される¹⁾。よって、試験では潰卵の標準混入率を1%とした。

実際の採卵では体腔液と潰卵の両方が混入しているため、この場合の標準混入率を10（体腔液）+1（潰卵）%とした。

試験1：ヨード剤の消毒効果に及ぼす体腔液、潰卵の影響

3種の阻害物質液をそれぞれヨード剤消毒液に添加して、消毒効果に対する影響を調べた。阻害物質の混入率は、標準混入率、標準混入率の2倍、1/10、1/100および0（非混入）の5段階を設けた。

プラスチック製遠沈管内（15 mL容量）において、各混入率になるよう滅菌等調液、体腔液、潰卵液または潰卵体腔液を所定量加えて9 mLにしたものに、各試験菌液1 mLを加え、全体を10 mLに調整した。これにヨード剤50 μ Lを加えてから攪拌し、反応を開始させた。反応時間は15分間とし、この間5分経過ごとに消毒液を攪拌した。反応中の温度は10°Cとした。反応終了時に、ろ過除菌済みの1/10Nチオ硫酸ナトリウム液40 μ Lを添加し、ヨウ素を中和した。また、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、滅菌等調液に試験菌液を加えてから15分間同様に操作した。最後にチオ硫酸ナトリウムを添加した場合と添加しなかった場合の各液の生菌数を測定した。なお、後者の場合にはチオ硫酸ナトリウムの代わりに滅菌等調液を添加した。

試験2：等調液洗卵による卵消毒効果の改善

ニジマス雌3尾から採卵した未受精卵を混合し、滅菌等調液で洗卵（濯ぎ洗卵2回、シャワー洗卵）した。200 mL容量のビーカーに卵500粒を入れものを4区用意した。この内の3区の卵に対して、5粒の潰卵内容を溶解させた10 mLの潰卵体腔液をそれぞれに添加してから攪拌し、事業的に採卵された場合に近い未受精卵の状態を作った。潰卵体腔液を加えない1区の卵には滅菌等調液を加え、阻害物質のない清浄卵対照にした。

1区の未受精卵には滅菌等調液50 mLを注ぎ、緩やかに攪

拌してから上清50 mLを捨てる方法で、濯ぎ洗卵をした。もう1区の卵については、滅菌等調液50 mL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10 mLを加えた。残る1区の卵は、洗卵操作を行わなかった。

全試験区の卵に試験菌液1 mLを加えて攪拌した後に、消毒液90 mL（ヨード剤0.5 mL）を加え、卵消毒を行なった。15分間の消毒中、5分ごとに滅菌綿棒を用い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液でヨウ素を中和してから試料を分取し、生菌数を測定した。

結果

体腔液、潰卵がヨード剤の消毒効果に与える影響

消毒反応終了時に、体腔液および潰卵が混入したヨード剤消毒液内に残存した供試菌の生菌数を表1に示した。体腔液が混入した消毒液では、混入率20%において *A. salmonicida* ($10^{4.0}$ CFU/mL)、*F. psychrophilum* ($10^{2.8}$ CFU/mL) および *R. salmoninarum* ($10^{3.5}$ CFU/mL) の残存がみられ、10%では *A. salmonicida* ($10^{3.7}$ CFU/mL) および *R. salmoninarum* ($10^{2.7}$ CFU/mL) の残存がみられた。1%以下の段階では、3菌種の残存はみられなかった。潰卵混入の消毒液では、混入率2%において *A. salmonicida* ($10^{3.5}$ CFU/mL) および *R. salmoninarum* ($10^{2.6}$ CFU/mL) の残存がみられたが、1%以下の段階では3菌種の残存はみられなかった。潰卵体腔液が混入した消毒液では、混入率20+2%において *A. salmonicida* ($10^{7.1}$ CFU/mL)、*F. psychrophilum* ($10^{3.2}$ CFU/mL) および *R. salmoninarum* ($10^{8.6}$ CFU/mL) の残存がみられ、10+1%では *A. salmonicida* ($10^{2.1}$ CFU/mL) および *R. salmoninarum* ($10^{4.1}$ CFU/mL) の残存がみられた。1+0.1%以下の段階では、3菌種の残存はみられなかった。

また、チオ硫酸ナトリウム液の添加区と無添加区における各試験菌の生菌数は同等であった。

等調液洗卵した未受精卵のヨード剤消毒効果

標準混入率（10+1%）で潰卵体腔液を添加した未受精卵を等調液洗卵してから、卵消毒をした場合のヨード剤消毒液中の残存菌数を表2に示した。洗卵をせずに卵消毒した場合は、*A. salmonicida* ($10^{2.2}$ CFU/mL) と *R. salmoninarum* ($10^{2.8}$ CFU/mL) の残存がみられた。濯ぎ洗卵をしてから卵消毒した場合には *R. salmoninarum* ($10^{1.6}$ CFU/mL) の残存がみられた。シャワー洗卵を行ってから卵消毒した場合には、菌は残存しなかった。*F. psychrophilum* は、洗卵の有無に拘わらず残存がみられなかった。また、阻害物質が混入していない清浄卵では、3菌種ともに残存しなかった。

表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	混入率 (%)	<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	4.0	2.8	3.5
	10 ^{*1}	3.7	—	2.7
	1	— ^{*2}	—	—
	0.1	—	—	—
	0	—	—	—
潰卵	2	3.5	—	2.6
	1 ^{*1}	—	—	—
	0.1	—	—	—
	0.01	—	—	—
	0	—	—	—
体腔液 + 潰卵	20+2	7.1	3.2	8.6
	10+1 ^{*1}	2.1	—	4.1
	1+0.1	—	—	—
	0.1+0.01	—	—	—
	0+0	—	—	—
対照 (非消毒)	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

* ヨード剤消毒は、200倍液で15分間とした

* 試験菌液の生菌数

A. salmonicida : 8.6 (Log₁₀) CFU/ml*F. psychrophilum* : 9.1 (Log₁₀) CFU/ml*R. salmoninarum* : 9.8 (Log₁₀) CFU/ml*¹ 体腔液または潰卵の標準混入率を示す*² 検出限界(1.3Log₁₀CFU/ml)未満を示す

表2 等調液洗卵により体腔液および潰卵を除去したニジマス未受精卵のヨード剤消毒効果

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	2.2	—	2.8
濯ぎ洗卵 (1回)	— ^{*1}	—	1.6
シャワー洗卵	—	—	—
対照 (清浄卵)	—	—	—

* ニジマス未受精卵に標準混入率(10+1%)で潰卵体腔液を添加した

* 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

* 試験菌液の生菌数

A. salmonicida : 8.6 (Log₁₀) CFU/ml*F. psychrophilum* : 8.4 (Log₁₀) CFU/ml*R. salmoninarum* : 9.8 (Log₁₀) CFU/ml*¹ 検出限界(1.3Log₁₀CFU/ml)未満を示す

考 察

卵内感染防除対策としての未受精卵消毒技術を確立するために、体腔液および潰卵がヨード剤の消毒効果に与える影響を調べるとともに、これら阻害物質を等調液洗卵で除去した場合の消毒効果を調べた。

試験1では、卵を使用しない方法で、体腔液および潰卵が消毒効果に与える影響を調べた。体腔液が10%以上、または潰卵が2%混入した段階では、反応後の消毒液に菌が残存し、体腔液や潰卵はヨード剤の消毒作用を阻害することが分かっ

た。標準混入率における消毒効果を比較すると、体腔液の場合には *A. salmonicida* および *R. salmoninarum* の残存がみられたが、潰卵では菌の残存はみられなかった。このことからすれば、現実的には潰卵よりも体腔液混入の方が影響すると考えられる。さらに、潰卵体腔液の標準混入率10+1%において、*A. salmonicida* と *R. salmoninarum* の残存がみられた。このため、親魚から採卵したままの、体腔液と潰卵が混入している未受精卵をヨード剤消毒しても菌が残存する危険があるので、混入率を下げる必要のあることがわかった。

試験2では、体腔液および潰卵を添加した未受精卵を等調

液洗卵してからヨード剤消毒を行った。この結果、濯ぎ洗卵を1回した程度では、*R. salmoninarum* の残存がみられたように、確実な消毒効果は得られないことが分かった。これに対して、シャワー洗卵した場合には全く菌の残存はみられなかった。本研究では、濯ぎ洗卵の回数を重ねた場合の試験は行っていないので、本結果から濯ぎ洗卵そのものを否定するのは早計である。しかし、シャワー洗卵の方が卵表面の除菌効果も高いので⁴⁶⁾、シャワー洗卵を採用することが適当である。また、両試験において細菌別の消毒効果に差がみられた。卵内感染の防除が最優先の目的であるが、孵化場内の用具、用水等の汚染と飼育魚への伝播を防止するためにも、少なくとも本試験で対象にした3菌種全てに対して効果のある方法や条件を選択すべきである。

本研究の成果から、未受精卵消毒の前にシャワーによる等調液洗卵をすることにより、確実な消毒効果が得られることが分かった。今後は、等調液洗卵と未受精卵消毒を一連の卵内感染防除技術として位置付け、業界への普及に努めることが重要である。

なお、産卵期の親魚は、体腔液ばかりでなく精液にも病原菌を保有している²⁰⁾。授精時に使用する精液量は非常に少量なので、体腔液に比べて精液由来の菌による感染の危険性は低いと考えられる。しかし、感染防除に万全を期すのであれば、授精後に再消毒(受精卵消毒)する必要がある。ところで、冷水細菌の卵内感染実験では、細菌の卵内侵入は卵の吸水時に起き、授精と卵表面汚染が各々前後して異なる卵の感染率は同等であった⁹⁾。これにより、卵内感染の危険性は受精(精子進入)の有無に影響されないと考えられるので、吸水前に受精卵消毒を1回行う方法でも感染防除は可能であり、消毒作業の省力化もできると考える。既往の研究情報の収集、卵への安全性試験や事業における実証試験などを行い、卵内感染防除技術の標準化のために検討する必要がある。

要 約

- 1 卵内感染防除技術として未受精卵のヨード剤消毒方法を確立するために、体腔液および潰卵のヨード剤消毒に及ぼす影響を調べるとともに、等調液洗卵によって体腔液および潰卵を除去した場合の未受精卵消毒の効果を検討した。
- 2 消毒液中における体腔液や潰卵の混入率が高まると、ヨード剤の消毒効果が低下することが分かった。
- 3 潰卵体腔液の標準混入率(10+1%)で消毒した場合、*A. salmonicida* と *R. salmoninarum* の残存がみられ、親魚から採卵したままの、体腔液や潰卵が混在している未受精卵をヨード剤消毒すれば菌が残存する危険がある。
- 4 潰卵体腔液を添加した未受精卵を等調液洗卵してからヨ

ード剤消毒を行ったところ、事前に等調液洗卵(シャワー洗卵)をすることにより確実な消毒効果が得られることが分かった。

- 5 等調液洗卵(シャワー洗卵)と未受精卵消毒を一連の卵内感染防除技術として普及に努めることが重要である。
- 6 卵内感染防除技術の標準化のために、受精卵消毒の利用について検討する必要がある。

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) 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.
- 3) Kumagai, A., A. Nawata (2010a): Mode of the intra-ovum infection of *Fravobacterium psychrophilum* in salmonid eggs. *Fish. Pathol.*, **45**, 31-36.
- 4) Kohara, M., H. Kasai and M. Yoshimizu (2012): Intra-ovum infection in salmonid eggs artificially contaminated with fish pathogenic bacteria: *Fravobacterium psychrophilum*, *Renibacterium salmoninarum* and *Aeromonas salmonicida*. *Fish. Pathol.*, **47**, 49-55.
- 5) 小原 昌和・小川 滋・笠井久会・吉水 守(2010): 養殖サケ科魚類の人工採卵における等調液洗卵法の除菌効果. 水産増殖, **58**, 37-43.
- 6) Kumagai, A. and A. Nawata (2010b): Prevention of *Fravobacterium psychrophilum* vertical transmission by iodofore treatment of unfertilized eggs in salmonids. *Fish. Pathol.*, **45**, 164-168.
- 7) 小原昌和(2013): 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. 長野水試研報, **14**, 7-10.
- 8) 井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史(1990): I P N 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.
- 9) 井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史(1990): I H N 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.
- 10) 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** (4) 185-187.
- 11) 木村喬久・吉水 守(1985): 細菌性腎臓病原因菌 *Renibacterium salmoninarum* に対するイソジンの *in vitro* における殺菌効果について. 昭和 59 年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 第 3 分冊, 日本水産資源保護協会,

- 東京, 14-16.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 高野和則 (1974): 生殖腺の成熟過程. 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, pp. 18-30.
- 16) 隆島史夫 (1974): 成熟と脂質代謝. 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, pp. 76-87.
- 17) Matsui, T., Nishizawa, and M. Yoshimizu (2010): Modification of KDM-2 with culture-spent medium for isolation of *Renibacterium salmoninarum*. *Fish Pathol.*, **44**(3), 139-144.
- 18) 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, pp. 200-220.
- 19) 山崎隆義・原武史: IV 疾病. 養鱒の研究, 録書房, 東京, pp. 48-94.
- 20) 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. 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, 204-21