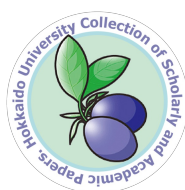




Title	養殖サケ科魚類の人工採卵における等調液洗卵法の除菌効果
Author(s)	小原, 昌和; 小川, 滋; 笠井, 久会 他
Citation	水産増殖, 58(1), 37-43 https://doi.org/10.11233/aquaculturesci.58.37
Issue Date	2010-03-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53097
Rights	© 2010 日本水産増殖学会
Type	journal article
File Information	article161.pdf



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

小原昌和^{1,2,*}・小川 滋¹・笠井久会²・吉水 守²

Effect of Egg-washing with Isotonic Solution on Elimination of Bacteria and Viruses before Fertilization in Salmon Aquaculture

Masakazu KOHARA^{1,2,*}, Shigeru OGAWA¹, Hisae KASAI²
and Mamoru YOSHIMIZU²

Abstract: Egg-washing with isotonic solution has been used to improve the artificial fertilization in fresh-water salmon aquaculture. Usually, unfertilized eggs are rinsed twice or three times with isotonic solution and showered before fertilization. We investigated the effect of egg-washing using rainbow trout eggs on elimination of some causative agents of cold water disease (*Flavobacterium psychrophilum*), flunculosis (*Aeromonas salmonicida*), infectious hematopoietic necrosis (IHNV) and *Oncorhynchus masou* virus disease (OMV), quantitatively and on prevention of intra-ovum infection with *F. psychrophilum*. The number of live bacterial cells or virus infectivity titers which were eliminated by egg-washing, was 10^3 CFU/ml in *F. psychrophilum*, 10^5 CFU/ml in *A. salmonicida*, or 10^4 TCID₅₀/ml in both of IHNV and OMV. In shower washing, the eliminated extent of *F. psychrophilum* or *A. salmonicida* cells increased with increasing isotonic solution volume. The ratio of intra-ovum infection with *F. psychrophilum* was clearly less in rinsed eggs than in non-treated eggs, and result of detection from showered eggs was negative. These results suggest that egg-washing with isotonic solution is very effective to eliminate the bacteria or viruses on egg surface and is able to decrease the risk of intra-ovum infection.

Key words: Egg-washing; Isotonic solution; Intra-ovum infection; *Flavobacterium psychrophilum*

サケ科魚類に発生する病気の中で、卵内感染による垂直伝播が指摘されているものに、伝染性膵臓壊死症 (infectious pancreatic necrosis : IPN) および細菌性腎臓病 (bacterial kidney disease : BKD) がある (江草 1994)。さらに、細菌性冷水病 (bacterial cold-water disease : 冷水病) に関して、Kumagai et al. (2000) が授精後のギンザケ卵を 10^8 CFU/ml 濃度の菌液に浸漬して吸水させると卵内感染が成立すること、 10^6 CFU/ml 以上の菌濃度で汚染したニジマス卵でも卵内感染が起こることを報告している (熊谷ら 2007 ; 熊谷ら 2008)。卵内感染が成立した例は、いずれも高

濃度汚染卵であり、卵表面の高度な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。また、産卵期のサケ科魚類親魚は体腔液中にせっそう病菌 (野村ら 1992)、BKD 菌 (Evelyn et al. 1984)、冷水病菌 (Holt et al. 1993; 熊谷ら 2009)、伝染性造血器壊死症ウイルス (infectious hematopoietic necrosis virus : IHNV) およびサケ科魚類のヘルペスウイルス (*Oncorhynchus masou* virus : OMV) (吉水ら 1988) などの病原体を保有していることが報告されている。当然、採卵された卵の表面は、これらの病原体に汚染され、高度に汚染された場合には卵内感染の危険性が高

2009年10月21日受付 : 2009年12月3日受理。

¹長野県水産試験場 (Nagano Prefectural Fisheries Experimental Station, Azumino, Nagano 399-7102, Japan)。

²北海道大学大学院水産科学研究院 (Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan)。

*連絡先 (Corresponding author): E-mail: kohara-masakazu@pref.nagano.lg.jp (M. Kohara)。

くなることが考えられる。

ところで、内水面のサケ科魚類養殖においては、人工採卵の際に生じる潰卵が受精を阻害することから、採卵した未受精卵を、まず等調液で洗浄する等調液洗卵法（稲葉ら 1958；田代 1976）が普及している。採卵時の卵には糞、血液、卵殻および過熟卵などが混じるため、先ず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2～3回行う。次に、卵をザルに移し換えて等調液を取り除いてから、再度卵に対して等調液をシャワー状に散布して潰卵成分を洗浄する作業（以下、シャワー洗卵とする）が行われる。

このように、等調液洗卵法は受精率を向上させる目的で普及している作業工程であるが、洗卵によって冷水病菌、BKD 菌および IHN などの病原体を含む体腔液が洗い流され、卵表面が洗浄されることによって卵内感染のリスクが低くなっていることが考えられる。そこで、冷水病菌を主な対象として、人工採卵の際に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止効果について卵を用いた試験を行ったので、その結果を報告する。

材料および方法

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 9.04 g, KCl 0.24 g, CaCl₂ 0.26 g/蒸留水 1 l）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、菌液およびウイルス液の作製に用いた。冷水病菌およびせつそう病菌の洗卵試験にはそのまま供試し、IHN 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15 cm のガラスシャーレに体腔液40 ml を入れ、紫外線ランプ（15W）の30 cm 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、冷水病菌の卵感染試験では、体腔液に混じる一般細菌を除くために、孔径0.45 μm 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）に塗抹して冷水病菌およびせつそう病菌が存在しないことを確認した。また、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 IHN 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、ニジマス病魚から分離した冷水病菌（06-003株）およびブラウントラウト病魚から分離したせつそう病菌（08-029株）を供試した。冷水病菌については、改変サイトファーガ液体培地（FBS5%添加）で15℃ 3日間培養した培養菌液を、4,000 rpm 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冷水病菌液とした。せつそう病菌については、トリプトソイ液体培地（栄研化学）で20℃ 2日間培養した菌液を、冷水病菌と同様に洗浄を行い、せつそう病菌液を作製した。

ウイルス材料としては、ニジマス病魚から分離した IHN（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。IHN 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 μm 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℃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 IHN と同様に行った。

等調液洗卵試験

試験1 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。両試験の洗卵工程別に、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 30 ml に対して 3 ml 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、ビーカー（500 ml 容量）にニジマス未受精卵を 1,000 粒入れ、汚染体腔液を 15 ml 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100 ml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100 ml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 30 mlとともに卵をビーカーに収容した。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収容してから、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浄瓶（容量 100 ml または 500 ml）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 1 ml、また各洗卵工程では卵付着の等調液を 1 ml 採取し、生菌数またはウイルス感染価を測定した。

試験 2 シャワー洗卵強度の違いによる除菌効果

無処理体腔液 60 ml に対し、冷水病菌液 6 ml またはせっそう病菌液 6 ml を添加して、それぞれの汚染体腔液を作製した。ビーカー（500 ml 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 15 ml 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 400 ml 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 1 ml の試料を採取し、冷水病菌、せっそう病菌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 倍階段希釈し、ミスラ法（坂崎 1978）により生菌数を測定した。冷水病菌については、菌分離には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、黄色の菌集落について抗冷水病血清（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 検査（吉浦ら 2006）により菌を鑑別した。せっそう病菌については、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、濃紺色に染まった菌集落を判別して生菌数を数えた。また、同培地において増殖がみられたせっそう病菌以外の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 倍階段希釈し、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-kärbar 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。

冷水病菌の卵感染試験

改変サイトファーガ液体培地（FBS5% 添加）で 15℃

3 日間培養した菌液を、4,000 rpm で 5 分間遠心分離し、培地成分を除去した後に、滅菌等調液を加えて菌洗浄を 2 回行った。さらに遠心分離により等調液を除去した菌体を体腔液 10 ml に懸濁させて、感染用の冷水病菌液を作製した。

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。洗浄したニジマス未受精卵を 400 粒ずつ 4 区に分けて、各々を 200 ml 容量ビーカーに収容した。この卵に対して冷水病菌液を 2 ml 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、菌液の代わりに滅菌等調液 2 ml を加えた。また、濯ぎ洗卵区では、汚染卵に 40 ml 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 40 ml 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 0.2 ml 加えて授精した後に、各区の卵に滅菌飼育水 200 ml を加えてから 1 時間静置して吸水をさせた。その後、卵をポビドンヨード剤（水産用イソジン液：明治製菓）の 200 倍液で消毒してから、ふ化水槽に収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 0.5 ml 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、ポビドンヨード剤の 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（FBS5% 添加）上で転がし、卵表面からの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、抗冷水病血清によるスライド凝集試験および PCR 検査により菌を鑑別した。

結 果

洗卵工程別の除菌効果

等調液洗卵を行った場合の、冷水病菌、せっそう病菌および一般細菌の除菌効果を Table 1 に示した。冷水病菌数は、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 $10^{2.4}$ ～ $10^{2.7}$ 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。

せつそう病菌数は、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は $10^{2.5} \leq \sim 10^{5.1} \leq$ 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Table 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 $10^{0.7} \sim 10^{0.8}$ TCID₅₀/ml、シャワー洗卵による除去量は $10^{2.5} \sim 10^{3.3}$ 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、冷水病菌およびせつそう病菌の除菌効果をTable 3に示した。冷水病菌は、洗卵前における50, 100, 200および400 ml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。

せつそう病菌は、洗卵前における50, 100, 200および400 ml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

Table 1. The number of live cells of *F. psychrophylum*, *A. salmonisida* and other bacteria, eliminated by egg-washing with isotonic solution

Group	Process	<i>F. psychrophylum</i> (log ₁₀ CFU/ml)			<i>A. salmonisida</i> (log ₁₀ CFU/ml)			Other bacteria ¹ (log ₁₀ CFU/ml)		
		before	after	eliminated	before	after	eliminated	before	after	eliminated
Egg-washing	1st. Rinse	6.2	5.7	0.5	8.3	7.3	1.0	4.9	3.9	1.0
	2nd. Rinse	5.7	5.2	0.5	7.3	6.3	1.0	3.9	2.5	1.4
	Shower	5.2	2.5	2.7	6.3	3.1	3.2	2.5	0 ³	2.5 $\leq$
	Total ²			3.7			5.2			4.9 $\leq$
Shower egg-washing	Shower	6.1	3.7	2.4	8.4	5.7	2.7	5.1	0 ³	5.1 $\leq$

¹ Bacteria were isoreted with CBB-agar medium.

² Total eliminated number of bacterial cells.

³ The lower limit of detection was 1.3 (log₁₀) CFU/ml.

Table 2. The infectivity titers of IHNV and OMV, eliminated by egg-washing with isotonic solution

Grupe	Process	IHNV (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)			OMV (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)		
		before	after	eliminated	before	after	eliminated
Egg-washing	1st. Rinse	7.4	6.1	1.3	5.4	4.6	0.8
	2nd. Rinse	6.1	5.4	0.7	4.6	3.9	0.7
	Shower	5.4	3.1	2.3	3.9	1.4	2.5
	Total*			4.3			4.0
Shower egg-washing	Shower	7.1	4.6	2.5	5.1	1.9	3.3

* Total eliminated titer of viruses.

The limit of detection was 1.6 (log₁₀) TCID₅₀/ml.

Table 3. The number of live cells of *F. psychrophylum*, *A. salmonisida* and other bacteria, eliminated by shower-washing with isotonic solution of each volume

Isotonic solution volume (ml/1,000 eggs)	<i>F. psychrophylum</i> (log ₁₀ CFU/ml)			<i>A. salmonisida</i> (log ₁₀ CFU/ml)			Other bacteria* (log ₁₀ CFU/ml)		
	before	after	eliminated	before	after	eliminated	before	after	eliminated
50	7.7	6.1	1.6	8.2	6.2	2.0	5.6	4.0	1.6
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

* Bacteria were isoreted with CBB-agar medium.

The limit of detection was 1.3 (log₁₀) CFU/ml.**Table 4.** Detection of *F. psychrophylum* from rainbow trout eyed eggs, reared for 21days after egg-washing and fertilization

Group	Treatment	Number of live cells ¹ (log ₁₀ CFU/ml)	Number of positive eggs (positive/sample)	Ratio of positive eggs (%)
Poluted eggs	NT ²	9.1	13/60 ⁵	21.7
	Rinse-washing ³	7.8	3/60 ⁵	5.0
	Shower-washing ³	6.9	0/60	0
Un-poluted eggs	NT	0 ⁴	0/60	0

¹The number of *F. psychrophylum* live cells after egg-washing.²Without egg-washing.³Eggs (400) were rinsed or showered with 40 ml isotonic solution.⁴The limit of detection was 1.3 (log₁₀) CFU/ml.⁵Statistically significant at $P < 0.01$ by χ^2 -test.

果が向上した。

一般細菌は、洗卵前における50, 100, 200および400 ml 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。

冷水病菌の卵感染試験

冷水病菌を添加した体腔液で汚染した卵の区、汚染卵を2種類の方法で洗卵した卵および非汚染対照卵の4試験区の発眼卵について行った菌分離の結果をTable 4に示した。授精、吸水させる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、非感染対照区では0 CFU/mlであった。発眼卵の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冷水病菌が分離され、無洗卵区の陽性卵の割合は13/60粒(21.7%)であり、濯ぎ洗卵区は3/60粒(5.0%)であった。両区の陽性卵の割合においては、統計学的に有意差($P\chi^2 < 0.01$)があった。シャワー洗卵区および非汚染対照区の卵から冷水病菌は分離されなかった。また、卵内からの菌分離に先立っておこなった卵表面からの菌分離検査においては、全ての試験区の卵からも冷水病菌は分離されなかった。

考 察

サケ科魚類の採卵親魚の病原体保有に関しては、体腔液から冷水病菌が $10^1 \sim 10^{7.0}$ CFU/ml、せっそう病菌が $2 \times 10^1 \sim 8.3 \times 10^6$ CFU/ml(野村ら1992)、BKD菌が 4.0×10^9 cells/ml(Evelyn et al. 1984)、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1988)程度分離されることが報告されている。熊谷ら(2009)は、卵表面が冷水病菌で 10^6 CFU/ml以上に汚染されていると卵内感染が成立することを試験的に明らかにするとともに、全国における養殖サケ科魚類の中には 10^6 CFU/ml以上に保菌している親魚が一部で見つかることも報告している。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ている可能性があり、卵の汚染度を下げることにより卵内感染のリスクを小さくするための対策が必要である。

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、病原体に汚染された卵の汚染度を下げ、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 1～2 l 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として、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冷水病菌は $10^{0.5}$ 程度、せつそう病菌では 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、冷水病菌では 10^2 程度、せつそう病菌では 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、冷水病菌では 10^3 、せつそう病菌では 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 50 ml から 400 ml まで増加させることにより、シャワー洗卵の除菌効果が冷水病菌では 10^4 近く、せつそう病菌では 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、冷水病菌で高濃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菌濃度は $10^{9.1}$ 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 $10^{7.8}$ 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、菌濃度が $10^{6.9}$ までに低下しており、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、冷水病菌の濯ぎ洗卵における除菌量が、せつそう病菌や 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、また菌の特性によるものであるかどうかなど、今後の検討課題である。冷水病菌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おいて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。多数ある養魚場の中には、シャワー洗卵をせずに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が、卵の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、洗卵作業が生産現場へ普及することを期待したい。

また、今回の試験において、洗卵強度を増せば除菌効果が高くなるものの、完全には除去できないことも明らかとなった。洗卵後に残ってしまう病原体は卵消毒により殺菌・不活化する必要があると考える。等調液洗卵が行われていれば卵周囲の有機物量も少なく、より確実な消毒効果が期待される。一方、せつそう病菌の卵内感染を疑う研究例はこれまでのところ報告されていない。孵化場内でのせつそう病発生事例に関する報告も見られない。また IHNV については、人為的に注入した卵内のウイルスは、卵内容物により不活化されること（Yoshimizu et al. 1989）や、受精卵を IHNV で人為汚染しても、ウイルスはふ化用水で洗い流され、検出できないこと（吉水 2004）が報告されている。病原体の種類によって卵内感染のリスクは異なるものの、洗卵後の卵消毒により病原体の孵化場内への持ち込みが阻止され、防疫対策の効果は格段に上昇すると考えられる。よって、卵内感染防止のみならず飼育環境の汚染防止のためにも、未受精卵の洗卵と消毒を併用した防除対策の実施が必要であると考えられる。

要 約

冷水病菌、せつそう病菌、IHNV および OMV で汚染したニジマス卵を供試して、等調液洗卵の除菌効果を定量的に明らかにするとともに、ニジマス卵を使用した感染試験を行い、卵内感染の防止効果について検証した。その結果、冷水病菌、せつそう病菌ではそれぞれ 10^3 CFU/ml、 10^5 CFU/ml、IHNV および OMV については 10^4 TCID₅₀/ml 程度の菌体あるいはウイルスが等調液洗卵により除去されることが明らかとなった。また、シャワー洗卵においては、等調液量を増加させることにより、冷水病菌およびせつそう病菌の除菌量が増加した。さらに、冷水病菌で高度に汚染した卵を濯ぎ洗卵した場合には、卵内感染の割合が低くなり、シャワー洗卵をした卵では卵内感染卵は検出されなかった。これらの結果から、等調液洗卵法は卵表面に存在する細菌、ウイルスの除菌あるいは除去効果があり、卵内感染のリスクを小さくするために有効な方

法であることが示された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、冷水病菌の感染試験手法について丁寧な指導をいただいた宮城県水産技術総合センター主任研究員熊谷 明博士に対して感謝の意を表する。

文 献

- 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.
- Evelyn, T. P. T., J. E. Ketcheson and L. Prosreri-Porta (1984) Further evidence for the presence for *Renibacterium salmoninarum* in salmonid eggs and for the failure of povidone-iodine to reduce the intra-ovum infection rate in water-hardened eggs. *J. Fis. Des.*, **7**, 173-182.
- Holt, R. A., J. S. Rohovec and J. L. Fryer (1993) Bacterial cold-water disease. In “*Bacterial Diseases of Fish*” (ed. by V. Inglis, R. J. Roberts and N. R. Bromage), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 3-23.
- 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. 日水誌, **23**, 758-761.
- Kumagai, A., S. Yamaoka, K. Takahashi, H. Fukuda and H. Wakabayashi (2000) Waterborne transmission of *Flabobacterium psychrophilum* in Coho salmon eggs. 魚病研究, **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. 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, pp. 3-15.
- 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, pp. 204-215.
- 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. 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, pp. 27-40.
- 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 (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* subs *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. 新細菌培地学講座 - 上, 近代出版, 東京, pp. 200-220.
- 田代文男 (1976) 等調液による洗卵法. 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, p. 14.
- 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.
- 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・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.
- 吉水 守 (2004) サケ科魚類の伝染性造血器壊死症 (Infectious hematopoietic necrosis: IHN). 魚介類の感染症・寄生虫病 (若林久嗣・室賀清邦編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 38-44.
- 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.