

## ヒラメ受精卵のポビドンヨード剤による消毒効果の検討

|       |                                                                                                     |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| メタデータ | 言語: Japanese                                                                                        |
|       | 出版者:                                                                                                |
|       | 公開日: 2025-04-24                                                                                     |
|       | キーワード (Ja):                                                                                         |
|       | キーワード (En):                                                                                         |
|       | 作成者: 渡辺, 研一, 太田, 健吾, 高橋, 誠                                                                          |
|       | メールアドレス:                                                                                            |
| URL   | 所属:                                                                                                 |
|       | <a href="https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014596">https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014596</a> |

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.



# ヒラメ受精卵のポビドンヨード剤による消毒効果の検討

渡辺 研一<sup>\*1</sup>・太田 健吾<sup>\*2</sup>・高橋 誠<sup>\*2</sup>

## Disinfection of Fertilized Eggs of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* with Povidone-Iodine

Ken-ichi WATANABE, Kengo OHTA and Makoto TAKAHASHI

Suitable conditions for disinfection of fertilized eggs of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* with povidone-iodine were investigated. Fertilized eggs were incubated until hatching after exposure to povidone-iodine at 0 to 100 mg/ℓ concentrations for 5 to 20 min. Viable bacterial counts of both treated and untreated eggs were measured using seawater agar. The hatching rate of treated eggs at 100 mg/ℓ concentration or less for 5 min was almost the same as that of untreated eggs. A decrease of more than 90% was observed in viable bacterial counts of eggs treated with povidone-iodine at 25 to 100 mg/ℓ concentrations for 5 min. The hatching rate of fertilized eggs at the just closed blastopore stage was significantly different from that of fertilized eggs at the 7 other developmental stages. This study concluded that treatment with 25 to 100 mg/ℓ concentration of povidone-iodine for 5 min is suitable for disinfection of fertilized eggs of Japanese flounder, except for eggs that are at the just closed blastopore stage.

2008 年 1 月 30 日受理

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* は日本全国で 2,500 万尾あまりが放流されているもっとも重要な栽培漁業対象種の一つである<sup>1)</sup>。その種苗生産過程においては、ウイルス性表皮増生症やウイルス性神経壊死症 (VNN) を始めとするウイルス性疾患、消化管白濁症やビブリオ病を始めとする細菌性疾患などが発生し、種苗の安定生産を阻害する重要な問題となっている<sup>2)</sup>。

中でも VNN は、全世界の 30 種を超える魚種での発生が報告されており<sup>3)</sup>、シマアジ *Pseudocaranx dentex*<sup>4)</sup>、マツカワ *Verasper moseri*<sup>5)</sup>、シーバス *Dicentrarchus labrax*<sup>6)</sup>、マハタ *Epinephelus septemfasciatus*<sup>7)</sup> などでは、種苗生産過程における VNN の主要感染経路が親魚からの垂直感染と考えられており、ヒラメでも垂直感染の可能性は否定できない。魚類の増養殖における垂直感染の防除対策としては、サケ・マス類でポビドンヨード剤 (以下ヨード剤) を用いた卵消毒が実施されており<sup>8)</sup>、ヒラメでもいくつかの卵消毒条件に関する報告がある<sup>9, 10, 11)</sup>。しかしながら、これらの報告におけるふ化率

が低下しない浸漬条件は、有効ヨウ素濃度 10 mg/ℓ の海水に 10 分の浸漬から 100 mg/ℓ に 15 分まで様々であり、一定の基準が定められていない。また、シマアジ、マダイ *Pagrus major*、ホシガレイ *Verasper variegatus*、クエ *Epinephelus bruneus* などの海産魚では卵の発生段階によりヨード剤に対する感受性が異なる場合があることが報告されているが<sup>12, 13, 14)</sup>、本種における知見は見あたらない。

そこで、ヒラメ受精卵に対するヨード剤を用いた卵消毒に適した浸漬条件の検討および卵発生段階が異なる受精卵のヨード剤に対する感受性を明らかにするための試験を行ったので報告する。

### 材料と方法

**受精卵** 試験には、独立行政法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所栽培技術開発センターで、天然魚および人工生産魚を親魚になるまで養成したヒラメが自

<sup>\*1</sup> 独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所病害防除部 (National Research Institute of Aquaculture (NRIA), Fisheries Research Agency (FRA), Kamiura, Saiki, Ooita, 879-2602, Japan).

<sup>\*2</sup> 独立行政法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所 栽培資源部 栽培技術研究室 〒794-2305 愛媛県今治市伯方町木浦甲 2780.

然産卵した受精卵を用いた。

**ふ化に及ぼす影響** 桑実期の受精卵を用いてヨード剤に対する感受性を検討した。試験を、ポビドンヨード製剤である水産用イソジン液 10% 液（明治製菓）をろ過海水に有効ヨウ素濃度 0, 25, 50 および 100 mg/ℓ となるように添加し（以下ヨード海水）、いずれの濃度とも 5, 10, 15 および 20 分間浸漬して行った。対照区として、浸漬を行わない試験区を設けた。桑実期の受精卵 2.5 g（約 1,500 個）を 10 × 5cm、深さ 6 cm のポリエチレン製ネット 4 個にとり、所定濃度のヨード海水 30 ℓ を満たした水槽に移し、所定時間揺らした。所定時間経過後、ヨード海水から 1 個のネットを卵ごと取り出し、ろ過海水を流水とした水槽に移して 3 分間洗浄して、ヨード剤を洗い流した。洗浄した卵約 200 個を、ふ化までの間の細菌繁殖を防ぐ目的で 5 mg/ℓ の濃度となるように硫酸カナマイシンを添加したろ過海水 1,000 ml を満たしたポリエチレン製サンプル瓶に移した。サンプル瓶を、水温維持と卵同士の付着防止を目的として、ろ過海水の流水と強曝気を施した 0.5 kℓ 容量のポリエチレン水槽に収容し、ふ化まで管理した。対照区の卵がほとんどふ化した時に、すべての区のサンプル瓶にホルマリンを 2% 濃度となるように添加して固定し、後日ふ化状況の確認を行った。ふ化状況は、40 倍とした生物顕微鏡下で未ふ化卵、死亡卵、ふ化仔魚に分け、それぞれの数を測定した。ふ化率をふ化仔魚数 / 供試卵数 × 100 で算出した。対照区と試験区のふ化率を比較することにより、ヒラメ受精卵に対するヨード剤を用いた受精卵消毒における安全な浸漬条件を検討した。試験は産卵日の異なる受精卵を用いて 4 回繰り返した。試験期間中の水温は 17℃ であった。それぞれの桑実期における受精率は 88 ～ 94% であった。

**消毒効果の検討** ヨード海水への浸漬の前後における、受精卵の生菌数の減少状況により消毒効果を把握した。生菌数の測定は、以下の通り行った。上述のヨード海水への浸漬後、ろ過海水による洗浄を行う前に約 0.1 g の卵を採取し、2% ペプトン液 1 ml の入った滅菌ビニール袋にとり、ヨード剤の反応を止めた。卵の 9 倍量の滅菌人工海水を加えて磨砕し、それを原液として 10 倍希釈液列を作製し、海水培地<sup>15)</sup>表面に塗抹後 25℃ で 5 ～ 7 日間培養してコロニー数を測定した。得られた生菌数から消毒率を（1－試験区の生菌数 / 対照区の生菌数）× 100 で算出し、消毒効果を比較した。本試験は上述のふ化に及ぼす影響の検討に用いた 4 ロットのうち 3 ロットについて実施した。

**受精卵の発生段階ごとの感受性** 卵発生段階の違いによる受精卵のヨード剤に対する感受性の差を把握するために、4 ロットの受精卵を用いて試験を実施した。それぞれの桑実期における受精率は、85 ～ 99% であった。受精卵の発育段階が 2 ～ 4 細胞期、桑実期、囊胚期、胚体形成期、原口閉鎖期、クッパー氏胞出現期、クッパー氏

胞の消滅期および心臓拍動の開始期の各段階に達したときに、有効ヨウ素濃度 0 または 50 mg/ℓ のヨード海水に 5 分間ふ化に及ぼす影響を調査した試験と同一の卵密度となるように浸漬した。対照区として、浸漬を行わない試験区を設けた。受精卵約 200 個を上述のネットにとり、600 ml のヨード海水中で揺らした。浸漬終了後、上述と同様に洗浄・ふ化管理を行い、ふ化率を求めた。

**有効ヨウ素濃度の測定** 25 mg/ℓ のヨード海水を作製し、作製直後、受精卵を入れずに 20 分後および本試験に用いた浸漬密度の 1, 2, 4, 8 倍となるように受精卵を入れて 20 分後にそれぞれ、ヨウ素滴定法（JIS K0102 33.3 改変）<sup>16)</sup>を用いてヨウ素が中和されるのに要するチオ硫酸ナトリウム溶液の滴定量を測定し、本試験条件における有効ヨウ素濃度の減衰状況を調査した。

**統計解析** 受精卵の発生段階ごとの感受性試験で得られたふ化率について、対照区に対する有意性をダネットの方法を用いて多重比較検定を実施した。浸漬密度と有効ヨウ素濃度の減衰状況について、作製直後のヨード海水が中和されるのに要するチオ硫酸ナトリウム溶液の滴定量に対する割合を算出し、その値を逆正弦変換して Tukey 法を用いて多重比較を行った。

## 結 果

未処理の対照区のふ化率は平均 86% であり、ヨード剤を含まない海水に 5 ～ 20 分浸漬した試験区の平均ふ化率は 83 ～ 85% であった。一方ヨード海水に浸漬した試験区で 80% 以上の平均ふ化率を示したのは、いずれの濃度でも 5 分間浸漬した場合のみであった（表 1）。

ヨード剤を含まない海水に浸漬した試験区の消毒率は、93% を示す場合もあったが、多くの場合は消毒効果が認められなかった。ヨード海水に浸漬した試験区においては、25 mg/ℓ で 5 分浸漬した 2 回次の場合を除いて、いずれのロットにおいても生菌数が検出限界未満となる

表 1. ポビドンヨード剤を用いたヒラメの卵消毒試験における試験区ごとのふ化率

| 試験区             |             | ふ化率 (%) |      |      |      |      |
|-----------------|-------------|---------|------|------|------|------|
| ヨウ素濃度<br>(mg/ℓ) | 浸漬時間<br>(分) | 1回次     | 2回次  | 3回次  | 4回次  | 平均値  |
| 0               | 対照区         | 83.9    | 84.2 | 89.8 | 88.6 | 86.6 |
|                 | 5           | 80.5    | 83.8 | 89.8 | 87.7 | 85.4 |
|                 | 10          | 74.6    | 79.7 | 92.8 | 91.2 | 84.6 |
|                 | 15          | 71.0    | 86.5 | 88.2 | 90.4 | 84.0 |
|                 | 20          | 72.9    | 79.1 | 91.8 | 90.1 | 83.5 |
| 25              | 5           | 84.6    | 83.0 | 76.9 | 88.0 | 83.1 |
|                 | 10          | 51.9    | 76.6 | 78.1 | 63.8 | 67.6 |
|                 | 15          | 2.3     | 47.9 | 35.1 | 4.1  | 22.4 |
|                 | 20          | 8.1     | 14.8 | 50.8 | 0.0  | 18.4 |
| 50              | 5           | 78.5    | 80.4 | 76.1 | 88.7 | 80.9 |
|                 | 10          | 49.4    | 84.2 | 40.1 | 57.0 | 57.7 |
|                 | 15          | 7.1     | 39.5 | 3.6  | 0.0  | 12.5 |
|                 | 20          | 0.0     | 16.0 | 0.6  | 0.0  | 4.2  |
| 100             | 5           | 88.4    | 82.2 | 87.0 | 89.4 | 86.7 |
|                 | 10          | 61.3    | 78.8 | 48.6 | 30.6 | 54.8 |
|                 | 15          | 35.9    | 39.0 | 11.1 | 0.0  | 21.5 |
|                 | 20          | 0.9     | 20.2 | 9.3  | 0.0  | 7.6  |

表 2. ポビドンヨード剤を用いたヒラメの卵消毒試験における消毒率

| 試験区             |             | 消毒率 <sup>*1</sup> (%) |      |                     |
|-----------------|-------------|-----------------------|------|---------------------|
| ヨウ素濃度<br>(mg/l) | 浸漬時間<br>(分) | 1回次                   | 2回次  | 3回次                 |
| 0               | 5           | 7.7                   | 80.0 | N. E. <sup>*2</sup> |
|                 | 10          | 82.3                  | 70.0 | 0.0                 |
|                 | 15          | 80.8                  | 90.0 | N. E.               |
|                 | 20          | 93.1                  | 50.0 | N. E.               |
| 25              | 5           | Tr. <sup>*3</sup>     | 70.0 | 96.2                |
|                 | 10          | Tr.                   | 90.0 | Tr.                 |
|                 | 15          | Tr.                   | Tr.  | Tr.                 |
|                 | 20          | Tr.                   | Tr.  | Tr.                 |
| 50              | 5           | Tr.                   | 90.0 | 96.2                |
|                 | 10          | Tr.                   | Tr.  | Tr.                 |
|                 | 15          | Tr.                   | Tr.  | Tr.                 |
|                 | 20          | Tr.                   | Tr.  | Tr.                 |
| 100             | 5           | Tr.                   | Tr.  | Tr.                 |
|                 | 10          | Tr.                   | Tr.  | Tr.                 |
|                 | 15          | Tr.                   | Tr.  | Tr.                 |
|                 | 20          | Tr.                   | Tr.  | Tr.                 |

\*1 消毒率 = (1 - 試験区の生菌数 / 対照区の生菌数) × 100

\*2 N.E. は生菌数が浸漬前より増加したことを示す

\*3 Tr. は検出限界未満を示す

か、消毒率が 90% を超えた (表 2)。

卵発生段階ごとのヒラメ受精卵のヨード剤に対する感受性試験では、試験した 8 ステージのうち、原口閉鎖期の卵においてヨード海水に浸漬すると対照区と比較して有意にふ化率が低下した ( $p < 0.05$ )。一方同時期の卵をヨード剤を含まない海水に浸漬した場合では、ふ化率に有意差は認められなかった ( $p > 0.05$ ) (図 1)。

受精卵の浸漬密度と有効ヨウ素濃度の減衰状況を調査したところ、20 分間卵を入れずに放置した場合、本試験における浸漬密度の 1, 2, 4, 8 倍とした場合の作製直後のヨード海水のヨウ素濃度に対する割合は、 $0.90 \pm 0.02$ ,  $0.90 \pm 0.03$ ,  $0.92 \pm 0.04$ ,  $0.85 \pm 0.04$ ,  $0.80 \pm 0.05$  (平均値 ± 標準偏差) であり、本試験条件における有効ヨウ素濃度は、作製直後の濃度より卵を入れずに放置した場合でも有意に低下した ( $p < 0.05$ )。また、受精卵の浸漬密度を 4 倍までとした場合には、卵を入れずに放置した場合と比較して有意差は認められなかった ( $p >$

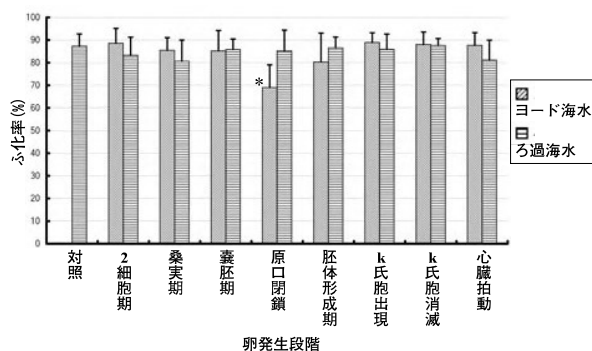


図 1. 50mg/l のヨウ素海水とろ過海水にヒラメ卵を 5 分浸漬した場合の卵発生段階ごとにおけるふ化率

\* ( $p < 0.05$ ): ダネット法による多重比較の結果、有意差が対照区に対して認められた場合に示す。

0.05) が、8 倍とすると有意に低下した ( $p < 0.05$ )。

## 考 察

ヨード剤を含まない海水に 5 ~ 20 分間浸漬した場合に、ふ化率は対照区と比較して低下しなかったことから、本試験における浸漬法はヒラメ受精卵のふ化に及ぼす影響が少ないものと考えられる。ヨード剤を用いた桑実期のヒラメ受精卵の安全な消毒条件は、有効ヨウ素濃度 25 ~ 100 mg/l において 5 分間以下であったことから、ヨード剤はヒラメ卵のふ化に悪影響を及ぼすと考えられる。一方、消毒効果が認められる浸漬条件は、一例の例外はあるものの、有効ヨウ素濃度 25 ~ 100 mg/l において 5 分間以上であった。また、本試験の浸漬条件においては、受精卵をヨード海水に浸漬しても、海水にヨード剤を溶解することによる有効ヨウ素の減衰以上の減衰は認められなかった。以上の結果から、25 ~ 100 mg/l の濃度で 5 分間ヨード海水に浸漬することにより、ヒラメ受精卵を安全にかつ効果的に消毒できると考えられる。また、卵の浸漬密度を変えて有効ヨウ素濃度の変化を調査した結果から、ヨウ素濃度を低下させずに浸漬できる卵密度は本試験条件の 4 倍すなわち、1.3 g/l 以下と考えられた。

ヨード剤を用いてヒラメの卵消毒条件を検討したいくつかの報告があるが<sup>9, 10, 11)</sup>、ふ化率が低下しない浸漬条件が 50 mg/l の海水に 10 分間<sup>9)</sup>、100 mg/l の海水に 15 分間<sup>10)</sup> もしくは 10 mg/l の海水に 10 分間<sup>11)</sup> 浸漬などのように本試験結果より長時間の場合がある。この要因の一つとして、ヨード海水中の有効ヨウ素濃度が低下したことが考えられる。本試験で明らかとなったように、受精卵の収容密度を高くすると有効ヨウ素濃度の減衰が大きかった。このことから、松田ら<sup>9)</sup>や中野・開の例<sup>10)</sup>では、ヨード海水の有効ヨウ素が大きく減衰していた可能性が考えられ、ヨード剤を用いて卵消毒を実施する際には、受精卵の浸漬密度に十分な注意を払う必要がある。

本試験結果から、原口が閉鎖する時期のヒラメ受精卵はヨード剤に対する感受性が高いことが明らかとなった。従って、原口閉鎖期にヨード剤によるヒラメの受精卵消毒を実施することは避けるべきである。しかし、通常の卵発生において原口が閉鎖する時期は産卵の翌日であり、産卵当日に卵消毒を行うことにより、卵の発生段階を原因とする受精卵の減耗を防除できるものと考えられる。また、シマアジ、マダイおよびホシガレイなどの海産魚でも、卵の発生段階によりヨード剤に対する感受性が異なることが報告されている<sup>12, 13)</sup>。本種の結果も考え併せると、ヨード剤を用いた卵消毒を実施する際には、魚種ごとに適正な消毒処理条件が異なる可能性や、同一魚種においても受精卵の発生段階などの状態によっては、同一条件で消毒処理を行っても正常ふ化に与える影響が異なる可能性があることを念頭に置くべきであ

る。

本報告では有効ヨウ素濃度 25 mg/ℓ のヨード海水に 5 分および 10 分の浸漬で十分な消毒効果が得られた。一方佐藤ら<sup>11)</sup>は、本種の安全な卵消毒条件が 10 mg/ℓ の濃度で 10 分間の浸漬と報告していることから、10 mg/ℓ のヨード海水に 5 分もしくは 10 分浸漬することの消毒効果を再確認する必要があると考えられる。

以上のことから、原口閉鎖期以外の卵を用いて、ポピドンヨード剤を用いた 25 ～ 100 mg/ℓ のヨウ素を含む海水に 5 分間浸漬することにより、ヒラメ受精卵を安全かつ効果的に消毒できるものと考えられる。

## 文 献

- 1) 水産庁・独立行政法人水産総合研究センター・(社)全国豊かな海作り推進協会(2007)平成17年度栽培漁業種苗生産、入手・放流実績(全国)～資料編～, 148-208.
- 2) Muroga K (2001) Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries. *Aquaculture*, **202**, 23-44.
- 3) Munday BL, Kwang J, Moody N (2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, **25**, 127-142.
- 4) Arimoto M, Mushiaki K, Mizuta Y, Nakai T, Muroga K, Furusawa I (1992) Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathol.* **27**, 191-195.
- 5) Watanabe K, Nishizawa T, Yoshimizu M (2000) Selection of broodstock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 219-223.
- 6) Breuil G, Pepin JF, Boscher S, Thiery R (2002) Experimental vertical transmission of nodavirus from broodfish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Fish Dis.*, **25**, 697-702.
- 7) 土橋靖史・栗山 功・黒宮香美・柏木正章・吉岡 基(2002)マハタ種苗生産におけるウイルス性神経壊死症(VNN)の防除対策の検討. 水産増殖, **50**, 355-356.
- 8) 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. さけ・ますふ研報, **47**, 1-99.
- 9) 松田浩一・山川 卓・辻ヶ堂 諦・竹内俊博(1988)ヒラメ卵のポピドンヨード剤に対する耐性試験. 昭和62年度三重県水産技術センター事業報告書, 50-51.
- 10) 中野平二・開 鉄生(1992)ヨード剤によるヒラメ卵の消毒. 平成3年度魚類防疫技術基盤確立事業海産魚の防疫事例集, 社団法人日本水産資源保護協会, 東京, 24-27.
- 11) 佐藤 修・村上啓士・水呉 浩・木村 淳・米司 隆・伏見 徹(1994)ポピドンヨード剤によるヒラメ卵の耐性. 平成5年度広島県栽培漁業協会事業報告, 83-87.
- 12) 虫明敬一(1994)シマアジおよびブリの親魚養成技術の開発に関する研究. 広島大学博士学位論文, 特別研究報告9号, 社団法人日本栽培漁業協会, 東京, pp.29-33.
- 13) Hirazawa N, Hara T, Mitsuboshi T, Ozaki J, Hata K (1999) Iodophore disinfection of eggs of spotted halibut *Verasper variegatus* and red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Sci.*, **65**, 333-338.
- 14) 佐藤 純・齊藤貴行・渡邊研一(2006)クエ受精卵に対するポピドンヨード処理の消毒効果および正常ふ化率に及ぼす影響. 水産増殖, **54**, 265-268.
- 15) Yamamoto H, Ezura Y, Kimura T (1982) Effects of antibacterial action of seawater on the viability of some bacterial species. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 1427-1431.
- 16) 日本規格協会編(2005)JISハンドブック 53 環境測定Ⅱ水質. 日本規格協会, 東京, pp.668-669.