

マダラ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: 佐藤, 純, 堀田, 卓朗, 渡辺, 研一
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014597

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



マダラ受精卵のポビドンヨード剤による消毒効果の検討

佐藤 純^{*1}・堀田卓朗^{*2}・渡辺研一^{*1}

Disinfection of Fertilized Eggs of Pacific Cod *Gadus macrocephalus* with Povidone-Iodine

Jun SATOH, Takurou HOTTA and Ken-ichi WATANABE

Suitable conditions for disinfection of fertilized eggs of Pacific cod *Gadus macrocephalus* with povidone-iodine were investigated. The morula stage eggs were exposed to seawater containing effective iodine concentrations of 0, 25, 50, and 100 mg/ℓ for 5, 10, 15, and 20 min, and the normal hatching rates and viable bacterial counts were determined. The normal hatching rates of groups exposed to less than 25 mg/ℓ povidone-iodine and with an exposure time of 5 min were almost the same as that of the control group. A decrease of more than 93.43% was observed in viable bacterial counts of eggs treated with povidone-iodine at concentrations of 25, 50, and 100 mg/ℓ for 5 min or more. Thus, disinfection of fertilized eggs of Pacific cod with povidone-iodine was found to be safe and effective at a concentration of 25 mg/ℓ with an exposure time of 5 min.

2008年1月18日受理

ウイルス性神経壊死症 (viral nervous necrosis: VNN) は、全世界の30を超える海産の増養殖対象種に発生もしくは感染が確認されている宿主範囲の広いウイルス感染症である¹⁾。北日本の栽培漁業対象種として期待されているマダラ *Gadus macrocephalus* の種苗生産過程においても VNN の発生が確認され²⁾、その防除対策の確立が望まれている。種苗生産過程における VNN の主たる感染経路がシマアジ *Pseudocaranx dentex* において詳細に検討され、採卵に用いる親魚からの垂直的な伝播であると考えられており³⁻⁵⁾、マダラの種苗生産過程におけるウイルス性神経壊死症原因ウイルス (nervous necrosis virus: NNV) の主たる感染経路も、採卵に用いる天然のマダラ親魚からの垂直伝播の可能性が疑われている⁶⁾。VNN の防除対策として、ノルウェーのハリバット *Hippoglossus hippoglossus* では、NNV に暴露した受精卵に対する、オゾン処理したオキシダント残留海水による受精卵洗浄の VNN 防除効果が確認されている⁷⁾。従って、受精卵の洗浄も効果を期待できる手法の一つと考えられており、いくつかの魚種では防除対策の一環として

取り入れられている^{8,9)}。また、サケ科魚類ではポビドンヨード剤 (以下ヨード剤) を用いた受精卵消毒が有効な垂直伝播の防除対策と考えられている¹⁰⁾。ヨード剤に対する受精卵の感受性については、有効ヨウ素濃度や消毒処理時間に影響されることがいくつかの海産魚介類でも報告され、安全で効果的な消毒処理法が検討されている魚種もある¹¹⁻¹⁴⁾。マダラ類の受精卵消毒については、大西洋マダラ *Gadus morhua* で報告があり、ヨード剤では、有効ヨウ素濃度 100 mg/ℓ で2分、10分および20分間浸漬した場合でも、対照区と比較して、ふ化後7日目の生残率に大きな差はなかったことや、オゾンによるオキシダント海水でも有効オキシダント濃度 2 mg/ℓ で1, 2および4分間の浸漬では対照区と変わらない、ふ化後7日目の生残率を示したことが報告されている (www.mbl.edu/aquaculture/nrac/Rob-erts.ppt)。しかし、本種 (太平洋マダラ) においては、ヨード剤による受精卵消毒方法についての詳細な報告は無い。そこで、異なる有効ヨウ素濃度と浸漬時間による消毒処理の影響と効果について調査したので報告する。

^{*1} 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 〒879-2602 大分県佐伯市上浦大字津井浦 (National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, Saiki, Oita879-2602, Japan)

^{*2} 独立行政法人水産総合研究センター五島栽培漁業センター

材料と方法

供試卵 受精卵は、富山県氷見市地先の定置網から漁獲直後のマダラ親魚雌雄各3個体を用いて、人工授精（雌雄各2個体）あるいは自然産卵（雌雄各1個体）により得た。人工授精による採卵は、2004年2月12日に500ℓのろ過海水を満たした500ℓ水槽に1個体の雄から精液を海水が白濁する程度まで搾出し、その後採卵可能と判断された雌1個体を当該水槽に収容し、腹部を軽く圧迫して卵を搾出して行った。なお、この方法の採卵を異なる2ペアの親魚について別々に行った。自然産卵による採卵は、2004年2月17日にろ過海水を満たした250ℓ水槽に採卵・採精可能と判断された雌雄を収容し、経過観察している間に、自発的に産卵したものから行った。得られた受精卵は、個体毎に異なるハッチングジャー（田中三次郎商店）に収容し、流水管理した。試験には、受精後24～32時間経過し、桑実期に達したものをを用いた。桑実期における受精卵の受精率は、人工授精では97.9%（ロットA）および78.0（ロットB）、自然産卵では、96.2%（ロットC）であった。試験期間中の水温は9.4～10.8℃であった。

ヨード海水への浸漬法 ポビドンヨード製剤である水産用イソジン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）、いずれの濃度ともそれぞれ5, 10, 15 および20分間浸漬した。無処理の対照区として、ヨード海水に浸漬を行わない区を設けた。桑実期の受精卵5g（約5,000個）を、市販の観賞魚飼育用のネット（縦5cm, 横10cm および深さ6cm）4個に取り、所定の濃度のヨード海水60ℓを満たした水槽に移し、それぞれの濃度において所定時間揺らした。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、ろ過海水の水槽に移して3分間の流水による洗浄を行った。

卵管理とふ化の観察 洗浄した卵は、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。サンプル瓶の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ポリカーボネート製500ℓ容量の水槽に収容し、ふ化させた。無処理対照区の卵がほとんどふ化したときに、すべての試験区のふ化の確認を行った。ふ化が確認されたサンプル瓶には、ふ化率の確認を行うためにm-アミノ安息香酸エチルメタンスルホン酸塩を24.5 mg/ℓとなるように添加してふ化仔魚に麻酔を施した後、生物顕微鏡下（×40）で未ふ化卵、死亡卵、ふ化仔魚、奇形仔魚および死亡仔魚の数を測定した。正常ふ化率は、ふ化仔魚数/供試卵数×100で算出した。

生菌数の測定 受精卵は、前出のロットBと2004年2月9日および2月17日に自然産卵（採卵方法は前出と同じ）によって得られたロットDおよびEを供試した。

生菌数の測定は、ヨード海水へ浸漬後、所定時間経過直後、すなわちろ過海水での流水洗浄を行う直前に0.1 g程度を滅菌した薬匙で採取し、1 mlの2%ペプトン液（塩化ナトリウム15 g, ペプトン20 g, 蒸留水1,000 ml, 高圧蒸気滅菌）の入ったストマッカー（オルガノ）の袋に入れて、ヨード剤の反応を止めた。水温で保管したこれらのサンプルを実験室に持ち帰り、9倍量の75%人工海水（塩化ナトリウム30 g, 塩化カリウム0.7 g, 硫酸マグネシウム7水和物5.3 g, 塩化マグネシウム6水和物10.8 g, 硫酸カルシウム2水和物1.3 g, 蒸留水1,000 ml, 高圧蒸気滅菌前にpH=7.8に調整）を加えて磨碎し、海水培地（ポリペプトン5 g, 肉エキス1 g, プロテオースペプトン1 g, 寒天15 g, 酵母エキス1 g, Herbst's 人工海水750 ml, 蒸留水250 ml, 高圧蒸気滅菌前にpH=7.8に調整）表面に塗抹後20℃で5日間培養してコロニー数を測定した。本法による生菌数の検出限界は $10^{0.70}$ CFU/gである。検出限界以下の場合には便宜的にこの値を生菌数とした。消毒率は、 $(1 - \text{各濃度のヨード海水に所定時間浸漬時の生菌数} / \text{ヨード剤を含まない海水に所定時間浸漬時の生菌数}) \times 100$ で算出した。

有効ヨウ素濃度の測定と減衰 消毒処理時のヨード海水中の有効ヨウ素濃度の減衰状況に及ぼす影響を調査した。有効ヨウ素濃度25 mg/ℓとなるように調整したヨード海水と、今回の試験で実施した0.33 g/ℓの密度となるように受精卵を入れ、20分間浸漬した場合の有効ヨウ素濃度を、JISK0102 工場排水試験方法33.3 残留塩素を改変した滴定法で測定した¹⁵⁾。有効ヨウ素濃度 I_2 (mg/ℓ) は、 $1/1,000N$ チオ硫酸ナトリウムによる滴定値 (ml) $\times f \times 0.1269 \times 1,000/V$ の計算式で求めた。fは、 $1/1,000N$ チオ硫酸ナトリウムのファクター ($f=0.9057$)、Vは、滴定に供試したサンプル液の量 (50 ml) とした。同じ方法で、合計で3回以上の測定を行った。

統計解析 ふ化率の比較においては、供試受精卵のロットごとおよび濃度ごとにヨード剤を含む海水に浸漬した区とヨード剤を含まない海水に同時間浸漬した時のふ化仔魚数とそれ以外（供試卵数－ふ化仔魚数）の数値を用いてx二乗検定を行った。ヨード剤を含まない海水に同時間浸漬した時のふ化率と有意差が認められたときに、ふ化に影響を及ぼしたと判定した。

有効ヨウ素濃度の減衰については、イニシャルの有効ヨウ素濃度と受精卵を入れた場合の20分後の有効ヨウ素濃度をStudent's t-検定で比較し、検討した。

結果および考察

ふ化に及ぼす影響 ロットA, B およびCの無処理対照区の正常ふ化率は、それぞれ、62.1, 73.2 および82.8%であった（表1）。ヨード剤を含まない海水に5, 10, 15 および20分間浸漬した場合の正常ふ化率は、ロットAでは、それぞれ67.3, 60.8, 42.4 および49.1%, ロッ

ロット B では、74.0、75.7、68.5 および 64.4%，ロット C では、81.7、91.5、79.4 および 71.4%であった。ロット C の受精卵を供した試験では、有効ヨウ素濃度 25 および 50 mg/ℓ のヨード海水に 5 分間浸漬した場合には、それぞれ 78.4 および 78.2%のふ化率となり、ヨード剤を含まない海水に浸漬した場合と比較して有意差は確認されず、正常なふ化に与える影響は少ないと考えられた。さらに、有効ヨウ素濃 100 mg/ℓ で 5 分間の処理でも 71.5%とヨード剤を含まない海水に浸漬した場合と比較して大きなふ化率の低下は確認されなかった。一方、何れの濃度においても 10 分間以上浸漬した場合には、有意差 ($p < 0.05$) が確認された。以上のことから、自然産卵によって得られた受精卵では、25 mg/ℓ のヨード海水にマダラ卵を 10 分以上浸漬すると、正常ふ化に影響を及ぼす可能性があると考えられた。ロット A の受精卵を供した試験では、有効ヨウ素濃度 25 mg/ℓ のヨード海水に 5 分間浸漬した場合には、54.9%のふ化率となり、ヨード剤を含まない海水に浸漬した場合と比較して有意差は確認されなかった。しかし、10 分以上の浸漬または、有効ヨウ素濃度 50 mg/ℓ 以上のヨード海水に浸漬

した場合には、有意に正常ふ化率が低下した。ロット B の受精卵では、何れの条件でもヨード剤を含まない海水に浸漬した場合のふ化率より有意に低下した。しかし、有効ヨウ素濃度 25 から 100 mg/ℓ で 5 分間の処理であれば、正常ふ化率が 53.9～58.8%と比較的高く、種苗生産に供試可能なふ化仔魚を得ることが可能と考えられた。

以上の結果を総合して考察すると、ヨード剤を用いてマダラ受精卵を消毒する場合に正常ふ化率に与える影響が少ない浸漬条件として、人工授精より得られた受精卵では、有効ヨウ素濃度 25 mg/ℓ で 5 分間、自然産卵により得られた受精卵では、有効ヨウ素濃度 100 mg/ℓ で 5 分間以内が望ましいと考えられた。従って、採卵方法に関係なく何れのロットとも有効ヨウ素濃度 25～100 mg/ℓ においては、10 分間以上の浸漬で正常ふ化に与える影響が大きくなる可能性が確認された。

大西洋マダラでは、有効ヨウ素濃度 100 mg/ℓ に 2、10 および 20 分間浸漬した場合のふ化率が、それぞれ、93、92 および 81%（対照区 90%）と報告されており、本報告における太平洋マダラ受精卵のヨード剤に対する

表 1. マダラ受精卵の正常ふ化率（%）に及ぼすポビドンヨード剤の影響

消毒時間（分）	ロット名	有効ヨウ素濃度（mg/ℓ）			
		0	25	50	100
0	A ^{*1}	62.1			
	B ^{*1}	73.2	—	—	—
	C ^{*2}	82.8			
	平均±標準偏差	72.7±10.34			
5	A	67.3	54.9	41.3	46.0
	B	74.0	58.8	53.9	56.7
	C	81.7	78.4	78.2	71.5
	平均±標準偏差	74.3±7.21	64.0±12.59	57.8±18.76	58.1±12.80
10	A	60.8	31.0	41.1	32.7
	B	75.7	36.2	45.9	38.5
	C	91.5	59.2	60.5	59.9
	平均±標準偏差	76.0±15.35	42.1±15.01	49.17±10.10	43.7±14.33
15	A	42.4	30.2	36.3	29.3
	B	68.5	40.6	38.0	40.6
	C	79.4	60.2	45.5	58.3
	平均±標準偏差	63.4±19.01	43.7±15.23	39.9±4.90	42.7±14.62
20	A	49.1	37.5	9.7	33.8
	B	64.4	37.1	17.0	39.3
	C	71.4	39.2	24.1	43.1
	平均±標準偏差	61.6±11.40	37.9±1.12	16.9±7.20	38.7±4.68

*1：人工授精により採卵

*2：自然産卵により採卵

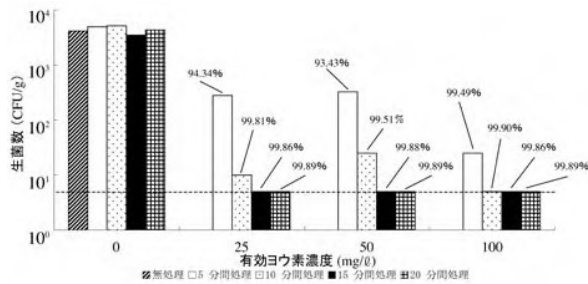


図 1-1. マダラ受精卵のポビドンヨード剤による消毒試験における生菌数の測定結果（ロット B：人工授精）
数値は、消毒率を示す
----- 点線は、検出限界を示す

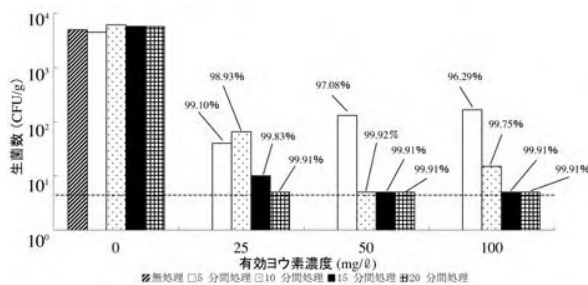


図 1-2. マダラ受精卵のポビドンヨード剤による消毒試験における生菌数の測定結果（ロット D：自然産卵）
数値は、消毒率を示す
----- 点線は、検出限界を示す

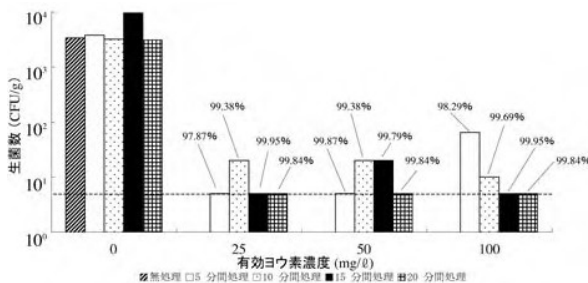


図 1-3. マダラ受精卵のポビドンヨード剤による消毒試験における生菌数の測定結果（ロット E：自然産卵）
数値は、消毒率を示す
----- 点線は、検出限界を示す

感受性とはかなり異なった。大西洋マダラの報告における詳細な消毒処理法は不明であるが、大西洋マダラと太平洋マダラの受精卵のヨード剤処理に対する耐性は大きく異なる可能性がある。

Arimoto *et al.*¹⁶⁾ は、シマアジのウイルス性神経壊死症原因ウイルスである SJNNV (striped jack nervous necrosis virus) が、有効ヨウ素濃度 50 mg/l で 10 分間の処理により不活化することを確認している。しかしながらマダラ受精卵では、有効ヨウ素濃度 50 mg/l の 10 分間の浸漬条件は、正常ふ化率が有意に低下したことから必ずし

も安全ではないと考えられる。従って、自然産卵により得られた受精卵では、実用的なふ化率が得られる有効ヨウ素濃度 100 mg/l で 5 分間浸漬することにより、VNN ウイルスの不活化も期待できる可能性がある。本報告で、採卵方法の違いによりヨード剤を用いた受精卵消毒が正常ふ化に影響を及ぼす可能性が示唆された。従って、実際にヨード剤による受精卵消毒を実施する際は、採卵時に起こる何らかの卵質に及ぼす影響にも留意する必要があると考えられた。これらの点を考慮すると、マダラ受精卵のヨード剤を用いた受精卵消毒においては、有効ヨウ素濃度 25 mg/l で 5 分間以内の消毒処理がふ化に及ぼす影響を最小限にできると考えられた。

生菌数に及ぼす影響 受精卵表面の生菌数の測定の結果、供試した受精卵の何れのロットにおいても各有効ヨウ素濃度の 20 分以上の処理条件では、生菌数が検出限界以下まで減少し、十分な消毒効果が得られることを確認した。ふ化に及ぼす影響を最小限にできる消毒処理条件と考えられる有効ヨウ素濃度 25 mg/l の 5 分間の浸漬条件でもヨード剤を含まない海水に 5 分間浸漬した場合に比較して、消毒率が 94.34% 以上 (94.34 ~ 99.87%) となり (図 1), 人工授精および自然産卵の採卵方法に関係なく効果的な消毒が期待できると考えられた。

有効ヨウ素濃度の測定と減衰 本試験での有効ヨウ素濃度の減衰状況について検討した。その結果、有効ヨウ素濃度 25 mg/l として作製した場合のイニシャルの有効ヨウ素濃度は 22.3 ± 0.21 mg/l, 今回の試験で実施した 0.33 g/l の受精卵の密度で浸漬した場合の 20 分後では 22.1 ± 0.67 mg/l と大きな差はなく、統計的な有意差も認められなかったことから、この消毒条件では、ヨウ素濃度の減衰は起こっていなかったものと考えられた。

以上の結果から、供試する受精卵の卵質に影響を及ぼす採卵方法の違い等に留意する必要があるが、25 mg/l のヨウ素を含む海水に、桑実期のマダラ受精卵を 5 分間浸漬することで、ふ化率に与える影響が少なく、かつ効果的な卵消毒が実施できると考えられた。

謝 辞

本実験は、独立行政法人水産総合研究センター能登島栽培漁業センターの協力により行われた。ここに記して深謝の意を表する。

文 献

- 1) Mundy, B.L., J.Kwang and N.Moddy (2002) Betanodavirus infections of teleost fish : a review. *J. Fish. Dis.*, **25**, 127-142.
- 2) 室賀清邦・古澤 徹・古澤 巖 (1998) シマアジのウイルス性神経壊死症. 水産増殖, **46**, 473-480.
- 3) Arimoto, M., K. Mushiake, Y. Mizuta, T. Nakai, K. Muroga and I. Furusawa (1992) Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay

- (ELISA). *Fish Pathol.*, **27**, 191-195.
- 4) Mushiake, K., T. Nishizawa, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga (1994) Control of VNN in striped jack : selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.*, **29**, 177-182.
 - 5) Nguyen, H.D., K. Mushiake, T. Nakai and K. Muroga (1997) Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Dis. Aquat. Org.*, **28**, 87-91.
 - 6) 日本栽培漁業協会 (1999) 種苗生産技術の開発, マダラ. 日裁協事業年報 (平成9年度), 177-180.
 - 7) Grotmol, S and G. K. Totland (2000) Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 89-96.
 - 8) 虫明敬一・有元 操 (2000) シマアジのウイルス性神経壊死症 (VNN) に関する防除対策. 栽培技研, **28**, 47-55.
 - 9) 渡辺研一 (2000) マツカワに発生したウイルス性神経壊死症の防除に関する研究, 特別研究報告 15 号. 日本栽培漁業協会, 東京, 71pp.
 - 10) 吉水 守 (1998) サケ科魚類の種苗期のウイルス病対策. 月刊海洋, 号外 14, 14-19.
 - 11) 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.
 - 12) Hirazawa, N., T. Hara, T. Mitsuboshi, J. Ozaki and K. Hata (1999) Iodophor disinfection of eggs of spotted halibut *Verasper variegatus* and red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Sci.*, **65**, 333-338.
 - 13) 佐藤 純・斉藤貴行・渡邊研一 (2006) クエ受精卵に対するポビ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.
 - 14) 佐藤 純・森 広一郎・西岡豊弘・服部圭太・岡 雅一・渡邊研一 (2006) ポビドンヨードを用いたクルマエビ受精卵の消毒法. 魚病研究, **41**, 117-120.
 - 15) 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.
 - 16) Arimoto, M., J. Satoh, K. Maruyama, G. Mimura and I. Furusawa (1996) Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture*, **143**, 15-22.