

ブリ受精卵のポビドンヨード剤による消毒の効果の検討

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: 堀田, 卓朗, 佐藤, 純, 渡辺, 研一
	メールアドレス:
URL	所属:
	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014598

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



ブリ受精卵のポビドンヨード剤による消毒の効果の検討

堀田 卓朗^{*1}・佐藤 純^{*2}・渡辺 研一^{*2}

Disinfection of Fertilized Eggs of Yellowtail *Seriola quinqueradiata* with Povidone-Iodine

Takurou HOTTA, Jun SATOH and Ken-ichi WATANABE

A suitable method for disinfection of fertilized eggs of yellowtail *Seriola quinqueradiata* with povidone-iodine was studied. The fertilized eggs (morula stage) were exposed to povidone-iodine at 0 to 100 mg/ℓ concentrations for 0 to 20 min, and the eggs were incubated until hatching. The number of viable bacteria on eggs was measured after treatment. The hatching rate of eggs treated with 25 mg/ℓ povidone-iodine 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 mg/ℓ for 5 min. Thus, treatment with povidone-iodine at 25 mg/ℓ (concentration) for 5 min (exposure time) is suitable for disinfection of fertilized eggs of yellowtail.

2008 年 2 月 4 日受理

ブリ *Seriola quinqueradiata* は、海産養殖魚において、最も生産量の多い魚種である。しかし、その種苗の全てを天然魚に依存しており、天然魚の好不漁によって種苗の価格が変動し、養殖経営を不安定なものとしている。そこで、人工種苗を生産する技術開発がいくつかの機関で行われている¹⁻⁴⁾。飼育下のブリの仔魚期および稚魚期には様々な疾病の発生が確認されている⁵⁾。特にウイルス性腹水症は親魚からふ化仔魚への垂直伝播が感染経路と考えられている⁶⁾。また、天然ブリ稚魚は採捕される段階で既にウイルスに感染している場合のあることがわかっており⁷⁾、天然魚を採卵親魚とする限り、得られた卵がウイルス性腹水症の原因ウイルスに汚染されている可能性を否定できない。このように垂直感染が疑われている疾病の有効な防除対策の一つとして卵消毒が行われており、サケ科魚類の伝染性造血器壊死症⁸⁾やクルマエビ *Penaeus japonicus* の急性ウイルス血症^{9,10)}ではポビドンヨード、シマアジ *Pseudocaranx dentex*¹¹⁾やマツカワ *Verasper moseri*¹²⁾のウイルス性神経壊死症ではオ

キシダント海水が用いられている。独立行政法人水産総合研究センターでは、種苗生産過程における垂直感染防除に有効とされている受精卵消毒について、ポビドンヨード剤（以下、ヨード剤）が海産魚介類の受精卵のふ化に及ぼす影響と消毒効果を、目ごとに対象種を選定して調査している。そこで、スズキ目の代表種としてブリに関する知見を得たので報告する。

材料と方法

供試卵 試験に供試した受精卵は、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、同古満目栽培漁業センター（現養殖研究所栽培技術開発センター古満目分場）において 1～3 年間養成した 3 から 4 歳の親魚にヒト胎盤性生殖腺刺激ホルモン（HCG）を投与し、自然産卵または人工授精により得た。試験は受精から約 6 時間経過したモルラ期の卵 3 ロットを用いて行った。それぞれのモルラ期の受精率は 86.2, 98.6, 96.1%であ

^{*1} 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 〒 853-0508 長崎県五島市玉之浦町布浦 122-7 (Goto Station, National Center for Stock Enhancement, Fisheries Research Agency, 122-7 Nunoura, Tamanoura, Goto, Nagasaki, 853-0508, Japan)

^{*2} 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 種苗期疾病研究グループ 〒 879-2602 大分県佐伯市上浦大字津井浦

った。採卵から卵消毒およびふ化までは水温を 20℃ に保った。

消毒条件および方法 試験は、水産用イソジン 10% 液（明治製菓）を水温 20℃ のろ過海水に計算上、有効ヨウ素濃度が 0, 25, 50 および 100mg/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。また、無処理の対照区を設けた。ヨード海水への浸漬は、縦 10cm、横 7cm、深さ 6cm のネット（ナイロン製、目合い 0.5mm）にモルラ期の受精卵約 2.5g（およそ 2500 粒）をとり、ヨード海水 7.5 ℓ を満たした水槽に移し、卵全体に消毒液が行き渡るように所定時間ゆっくり、ネットを揺らした。

ふ化の確認 ヨード海水に所定時間浸漬した後、ネットごとろ過海水を流水とした水槽に移して 3 分間洗浄した。洗浄した卵は、ろ過海水 500 ml の入った蓋付きプラスチック瓶（広口 T 型瓶、アズワン）に、200 粒を収容した。なお、用いたろ過海水には、ふ化までの間の細菌繁殖を防ぐ目的で、カナマイシン硫酸塩（ナカライテスク）を 5mg/ℓ となるように添加した。卵を収容したプラスチック瓶は、水温維持と卵同士の付着防止を目的として、20℃ に調温したろ過海水の流水と強曝気を施した 0.5 または 1 kℓ 水槽に収容し、ふ化まで管理した。無処理の対照区の卵がほとんどふ化した時点で、すべての試験区のふ化の確認を行った。ふ化の確認は、ホルマリン 1.5 ml を添加して仔魚等を固定、もしくは m- アミノ安息香酸エチルメタンスルホネート（ナカライ）を 25mg/ℓ となるように添加して麻酔を施し、実態顕微鏡下にて行った。ふ化仔魚、卵内で胚が確認できふ化直前まで発生が進んだと思われる未ふ化卵、および死亡卵の数を測定し、それぞれの割合を算出した。

生菌数の測定 ヨード海水への浸漬が終了した卵約 0.1

～ 0.2g を、滅菌 2% ペプトン水（1.5% NaCl 加）1 ml を入れた滅菌処理済の強化ポリエチレンの袋（ストマッカー用ポリ袋；オルガノ）に取り、ヨード剤の反応を止めた¹²⁾。これに卵の 9 倍量となるように滅菌した Herbst の人工海水¹³⁾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、海水培地平板表面¹⁴⁾に塗抹して 25℃ で 5 日間好氣的に培養して出現コロニー数から生菌数を算出した。以下の式により、消毒率を算出した。

消毒率 = $\{1 - (\text{試験区の生菌数}) / (\text{対照区の生菌数})\} \times 100$

有効ヨウ素濃度の測定 有効ヨウ素濃度が計算上 25 mg/ℓ となるように、ヨード剤をろ過海水に溶解し、溶解直後、溶解後受精卵を入れずに 20 分経過後、本試験と同じ 1 リットルあたり約 0.33g（以下基準量）、その 2 倍、4 倍および 8 倍量となるように受精卵を入れて 20 分後に、それぞれの有効ヨウ素濃度をヨウ素滴定法¹⁵⁾にて測定し、本試験条件における有効ヨウ素濃度の減衰を調査した。溶解直後と各条件との平均値の差の検定には t- 検定を用いた。

結 果

ふ化に及ぼす影響 ふ化率等の値を表 1 に示した。1 回次のふ化率は、対照区が 68.8%，有効ヨウ素濃度 0 mg/ℓ、浸漬時間 5, 10, 15 および 20 分は 80.1, 80.3, 79.2 および 84.7% であった。25mg/ℓ では 75.5, 66.0, 28.1 および 8.3% であり、浸漬時間が長くなるにつれ低下する傾向を示し、15 分を越えると大きく低下した。50 および 100mg/ℓ においても同様の傾向であった。未ふ化卵率は 0 mg/ℓ では 0 から 3.2% であった。25, 50 および 100mg/ℓ では、いずれの濃度も 5 分で数 %、10 分で 10% を超え、その後は浸漬時間が長くなる

表 1. ポビドンヨード剤によるブリの受精卵消毒におけるふ化率、未ふ化率、死亡卵率

単位: %

有効ヨウ素濃度 (mg/ℓ)	浸漬時間 (分)	1 回次			2 回次			3 回次		
		ふ化率	未ふ化卵率	死亡卵率	ふ化率	未ふ化卵率	死亡卵率	ふ化率	未ふ化卵率	死亡卵率
0	0	68.8	3.2	28.0	90.0	0.0	10.0	69.4	2.8	27.8
	5	80.1	1.7	18.2	83.4	0.0	16.6	78.5	2.8	18.7
	10	80.3	0.0	19.7	82.9	0.5	16.6	78.6	1.9	19.4
	15	79.2	0.0	20.8	85.1	0.0	14.9	71.6	5.4	23.0
	20	84.7	2.0	13.3	86.9	0.5	12.6	68.0	6.0	26.0
25	5	75.5	4.1	20.4	88.9	0.9	10.3	51.5	21.6	26.8
	10	66.0	15.6	18.4	80.3	1.4	18.3	62.6	22.0	15.4
	15	28.1	48.3	23.6	71.8	15.3	12.9	3.6	73.7	22.6
	20	8.3	81.1	10.7	66.8	22.3	10.9	3.0	79.9	17.2
50	5	79.1	3.7	17.1	88.8	3.6	7.6	55.3	23.5	21.2
	10	69.5	10.5	20.0	82.2	7.0	10.7	19.3	64.2	16.5
	15	26.6	51.1	22.3	72.1	10.2	17.7	1.8	77.2	21.1
	20	7.1	67.7	25.3	58.6	22.1	19.3	0.0	76.3	23.7
100	5	78.1	1.6	20.3	84.8	1.3	13.8	72.5	9.8	17.6
	10	67.6	16.6	15.9	68.0	11.0	21.0	24.0	58.0	18.0
	15	47.6	32.2	20.3	68.2	15.4	16.4	0.0	79.7	20.3
	20	9.1	31.1	59.8	51.1	33.9	14.9	0.0	42.9	57.1

につれ上昇する傾向にあった。100 mg/ℓ、20 分では死亡卵率が 59.8%と他の消毒条件と比べて高い値を示した。2 回次のふ化率は、対照区は 90.0%，有効ヨウ素濃度 0 mg/ℓでは 83.4、82.9、85.1 および 86.9%であった。25mg/ℓでは 88.9%，80.3%，72.1%，68.8%であり、1 回次同様、浸漬時間が長くなるにつれ低下する傾向にあり、50 および 100mg/ℓも同様であった。未ふ化卵率は、0 mg/ℓでは 0 から 0.5%であった。25、50 mg/ℓでは 15 分以上、100 mg/ℓでは 10 分以上では 10%を超え、1 回次同様、浸漬時間が長くなるにつれ上昇する傾向にあった。3 回次は、対照区は 69.4%，有効ヨウ素濃度 0 mg/ℓでは 78.5、78.6、71.6 および 68.0%であった。25mg/ℓでは 51.5%，62.6%，3.6%，3.0%であり 15 分以上、50 および 100mg/ℓでは 10 分以上で大きく低下した。未ふ化卵率は、0 mg/ℓでは 2.8 から 6.0%であった。25 mg/ℓでは 21.6、22.0、73.7 および 79.9%と 15 分以上、50 および 100 mg/ℓでは 10 分以上で大きく上昇した。100 mg/ℓ、20 分では死亡卵率が 57.1%と他の消毒条件と比べて明らかに高い値を示した。

消毒効果 生菌数および消毒率を表 2 に示した。有効ヨウ素濃度 0 mg/ℓの生菌数は $10^3 \sim 10^4$ CFU/g のオーダー、消毒率は 90%未満もしくは効果なしであった。一方、ヨード剤を用いた場合の生菌数は殆どで 10^2 CFU/g から検出限界以下、消毒率は殆どで 90%以上であったが、2 回次の 50mg/ℓに 10 分浸漬した区では、消毒率が 11%と効果は低かった。

表 2. ポビドンヨード剤によるブリの受精卵消毒における生菌数および消毒率

有効ヨウ素濃度 (mg/ℓ)	浸漬時間 (分)	1回次		2回次		3回次	
		生菌数 (CFU/g)	消毒率 (%)	生菌数 (CFU/g)	消毒率 (%)	生菌数 (CFU/g)	消毒率 (%)
0	0	2.6×10^3		1.2×10^1		3.5×10^3	
	5	2.9×10^1	ne	3.6×10^3	70	3.2×10^3	9
	10	1.9×10^3	27	6.0×10^3	50	2.9×10^3	17
	15	3.6×10^3	ne	1.6×10^1	ne	2.2×10^3	39
	20	1.0×10^1	ne	7.4×10^3	38	3.3×10^3	6
25	5	Tr.	>99	Tr.	>99	1.5×10^2	96
	10	Tr.	>99	Tr.	>99	3.0×10^2	91
	15	Tr.	>99	Tr.	>99	Tr.	>99
	20	Tr.	>99	Tr.	>99	Tr.	>99
	5	Tr.	>99	Tr.	>99	5.0×10^1	99
50	10	Tr.	>99	1.1×10^4	11	Tr.	>99
	15	Tr.	>99	Tr.	>99	Tr.	>99
	20	Tr.	>99	Tr.	>99	Tr.	>99
100	5	Tr.	>99	Tr.	>99	Tr.	>99
	10	Tr.	>99	Tr.	>99	Tr.	>99
	15	5.0×10^1	98	Tr.	>99	Tr.	>99
	20	Tr.	>99	Tr.	93	Tr.	>99

*Tr. : 検出限界以下
消毒率 = (1 - 浸漬後の生菌数 / 浸漬前の生菌数) × 100
ne: 効果なし

有効ヨウ素濃度 有効ヨウ素濃度の測定の結果を表 3 に示した。海水に溶解直後は 21.5 ± 2.8 mg/ℓであった。卵を入れず 20 分経過した場合は 19.4 ± 2.9 mg/ℓ、卵を基準量入れた場合は 17.6 ± 3.0 mg/ℓ、2、4 および 8 倍

表 3. ポビドンヨード剤によるブリの受精卵消毒における有効ヨウ素濃度 (実測値)

経過時間 (分)	卵量	平均値 ± 標準偏差 (mg/ℓ)
0	無	21.5 ± 2.8
20	無	19.4 ± 2.9 *
20	基準量	17.6 ± 3.0 **
20	2倍量	17.2 ± 3.9 **
20	4倍量	15.3 ± 3.2 **
20	8倍量	12.8 ± 3.9 **

有効ヨウ素濃度 25mg/ℓとなるように海水に溶解

基準量: 消毒液 1ℓあたり卵 0.33g

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ は経過時間 0 分、卵量無と統計的有意差あり

量では、 17.2 ± 3.9 、 15.3 ± 3.2 、 12.8 ± 3.9 mg/ℓであり、卵量が増えると有効ヨウ素濃度は減少する傾向にあった。いずれの条件においても溶解直後と統計的有意差が認められた。

考 察

ふ化に及ぼす影響 無処理の対照区と有効ヨウ素濃度 0 mg/ℓでは、いずれの浸漬時間もふ化率、未ふ化卵率に大きな差は無く、今回行った卵へのハンドリングは、ブリ受精卵のふ化に影響を及ぼすものではないと考えられた。ヨード海水に浸漬した場合は、各回次とも浸漬時間が長くなるにつれ、ふ化率が低下し、その代わりに未ふ化卵率が上昇する傾向にあり、トラフグ *Takifugu rubripes*¹⁶⁾、ハモ *Muraenesox cinereus*¹⁷⁾ においても同様の傾向が観察されている。ヒラメ *Paralichthys olivaceus* の受精卵をオゾン曝露海水に浸漬すると、ふ化腺の発達や卵膜の分解酵素の分泌は正常であったが、オゾン曝露海水の影響により卵膜の構造が変性し、未孵化生残卵が発生する¹⁸⁾と報告されている。今回のブリ受精卵をヨード海水に浸漬して生じた未ふ化卵についても、似たような現象によるものと推察され、浸漬時間長くなるにつれ、卵膜の構造がより変性した結果、未ふ化卵率が増えたと考えられた。また、1 および 3 回次の 100 mg/ℓ、20 分では、他の条件と比べて死亡率が高かった、これは高濃度、長時間の浸漬した結果、卵発生そのものに影響を及ぼしたと考えられた。試験回次ごとにふ化への影響が小さいと思われる条件は、1 回次はいずれの濃度も 5 分、2 回次は 25 および 50 mg/ℓでは 10 分まで、100 mg/ℓでは 5 分であると考えられた。3 回次は、25 および 50 mg/ℓ、5 分の未ふ化卵率が 0 mg/ℓと比べて高い値を示したが、25 mg/ℓでは 10 分まで、50 および 100 mg/ℓでは 5 分はふ化への影響は比較的小さいと考えられ、試験回次によって異なる結果であった。シマアジ *Pseudocaranx dentex*¹⁹⁾、マダイ *Pagrus major*²⁰⁾、オニオ

コゼ *Inimicus japonicus* ²¹⁾ では、受精率や採卵時期によっては、同じ条件で消毒してもふ化に与える影響が異なっていることが報告されている。今回、試験に用いた卵は受精率が異なっているだけでなく、採卵親魚も異なっている。すなわち、卵の質が異なっており、そのことが同じ条件で消毒しているにもかかわらず、結果に差を生じさせたと推察された。以上の結果から、ふ化への影響を最小限にする条件は有効ヨウ素濃度 25 から 100mg/l、浸漬時間 5 分以内であると考えられた。

消毒効果 0 mg/l の試験区では、消毒効果が認められなかったのに対して、ヨード剤を含む海水に浸漬した試験区の多くでは、消毒率 90% 以上であった。90% に満たない例も認められたが、同一回次・同一濃度で浸漬時間が短い条件でも消毒率が高かったこと、他の回次の同一条件では消毒率が高かったことを考え合わせると、死卵などが混入して生菌数が多く測定された異常値の可能性が考えられる。少なくとも、有効ヨウ素濃度 25mg/l、浸漬時間 5 分以上であれば、生菌数を 90% 以上減少させることが出来ると考えられた。

有効ヨウ素濃度の測定 計算上、有効ヨウ素濃度 25mg/l となるようにヨード剤を海水に溶解したが、実際の値は 21.5 ± 2.8 mg/l と設定値より低かった。また、溶解からの時間経過および卵量が増えるにつれ、有効ヨウ素濃度は減少する傾向にあった。ヨード剤は海水中で有効ヨウ素が低下すること ²²⁾、有機物量が多い海水では著しく消費されること ¹⁹⁾ が知られており、用いる海水によっては卵を浸漬する前に著しく低下している可能性も考えられるので、消毒にはできるだけ清浄な海水を用いる必要があるだろう。また、受精卵も有効ヨウ素濃度を低下させる要因であることから、今後は有効ヨウ素濃度が維持しつつ、大量の受精卵を処理する手法を開発する必要がある。

以上の結果から、ポビドンヨード剤を用いてブリ受精卵を安全かつ効果的に消毒する条件は、有効ヨウ素濃度 25 から 100mg/l、浸漬時間 5 分であり、これらの条件では消毒率 90% 以上が期待できると考えられた。

謝 辞

本試験を実施するに当たり、多大なご協力を頂いた水産総合研究センター五島栽培漁業センター、同古満目栽培漁業センター（現養殖研究所栽培技術開発センター古満目分場）の職員の方々に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 三浦慎一・渡邊新吾・尾上静正・米田 寛 (2002) ブリ種苗生産技術開発。平成 13 年度大分県海洋水産研究センター事業報告。93-96。
- 2) 東 秀一・金子文勝 (2003) ブリ早期採卵及び種苗生産試

験。平成 14 年度種苗生産事業報告書、財団法人熊本県栽培漁業協会、71-76。

- 3) 中田 久 (2003) トラフグおよびブリの親魚養成と採卵技術に関する研究。長崎県水産試験場研究報告、第 28 号 pp.63-86。
- 4) 浜田和久・虫明敬一 (2006) 日長および水温条件の制御によるブリの 12 月採卵。日水誌、72、186-192。
- 5) 西岡豊弘 (2006) IV 疾病対策。栽培漁業技術シリーズ ブリの種苗生産技術の開発。独立行政法人水産総合研究センター、東京、70-75。
- 6) 一色 正・河合研児・楠田理一 (1993) 採卵用ブリ親魚からの YAV と YAV 中和抗体の検出。魚病研究、28、65-69。
- 7) 一色 正・河合研児・楠田理一 (1989) 天然採捕ブリ稚魚における YAV 感染。日水誌、55、1305-1310。
- 8) 「魚類防疫への挑戦」編集委員会 (1993) - 成功・失敗事例集 - 魚類防疫への挑戦サケ・マス編。緑書房、東京、46-49。
- 9) 桃山和夫・谷村利克 (2004) クルマエビ受精卵消毒による PAV の予防。山口県水産試験場研究報告、2、117-123。
- 10) 佐藤 純・虫明敬一・森 広一郎・有元 操・今泉圭之輔 (2003) 衆生生産過程におけるクルマエビの急性ウイルス血症 (PAV) の防除対策。栽培技研、30、101-109。
- 11) 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。
- 12) 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、45-48。
- 13) 中村 浩 (1962) 海洋微生物。微生物学ハンドブック、技報社、東京、pp.610-621。
- 14) YAMAMOTO H, EZURA Y, KIMURA T. (1982) Effects of antibacterial action of seawater on the viability of some bacterial species. *Fisheries Sci.*, 48, 1427-1431。
- 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) 堀田卓朗・藤本 宏・山崎英樹・渡辺研一 (2004) トラフグ受精卵のヨード剤による消毒の効果。栽培漁業センター技報、2、92-95。
- 17) 堀田卓朗・西 明文・加治俊二・渡辺研一 (2007) ハモ受精卵のポビドンヨード剤による消毒の効果と安全性。栽培漁業センター技報、6、9-11。
- 18) 三村 元・長瀬俊哉・片山康人・難波憲二 (1999) 未孵化生残卵の生理学および組織学的考察。日水誌、65、448-456。
- 19) 有元 操 (1996) シマアジのウイルス性神経壊死症に関する研究。特別研究報告 10 号。日本栽培漁業協会、東京、33-37。
- 20) Noritaka HIRAZAWA, Takashi HARA, Jiro OKAZAKI, and Kazuhiko HATA (1999) Changes of Sensitivity of Red Sea Bream *Pagrus major* Eggs to Iodophor during the Spawning Season. *Fisheries Sci.*, 65, 484-485。
- 21) 太田健吾・堀田卓朗・渡辺研一 (2005) ポビドンヨード剤がオニオコゼ卵のふ化と生菌数に及ぼす影響。栽培漁業センター技報、3、35-39。
- 22) 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* に対する各種消毒薬の殺菌作用。魚病研究、23、219-229。