

トラフグ受精卵のヨード剤による消毒の効果

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2025-06-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 堀田, 卓朗, 藤本, 宏, 山崎, 英樹, 渡辺, 研一 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014685

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



トラフグ受精卵のヨード剤による消毒の効果

堀田卓朗^{*1}・藤本 宏^{*2}・山崎英樹^{*2}・渡辺研一^{*1}

(^{*1} 古満目栽培漁業センター, ^{*2} 屋島栽培漁業センター)

トラフグ *Takifugu rubripes* は、年間に放流用として299万尾、養殖用として1,427万尾の人工種苗が生産され¹⁾、産業上非常に重要な魚種である。本種の種苗期に発生する疾病としてウイルス性神経壊死症 (viral nervous necrosis: VNN)²⁾、口白症³⁾、ビブリオ病、滑走細菌症、イクチオボド症、ウーヅニウム症や白点病⁴⁾ などがあり、特に VNN は垂直感染が疑われている。魚介類の垂直感染防除対策として卵消毒が行われ、サケ科魚類の伝染性造血器壊死症⁵⁾ やクルマエビ類の急性ウイルス血症^{6,7)} ではポビドンヨード、シマアジ⁸⁾ やマツカワ⁹⁾ の VNN ではオキシダント海水が用いられている。

本報告ではトラフグにおける垂直感染防除を目的として、ポビドンヨード (以下、ヨード剤) を用いて卵消毒を行い、ふ化に及ぼす影響と消毒効果を検討した。

材 料 と 方 法

供試卵 試験に供試した卵は、屋島栽培漁業センターにおいて5年間および3年間養成した親魚から人工授精で得た。卵の輸送は、ポリエチレン製の袋に海水10ℓと約200gの卵を収容し、酸素を封入した後発砲スチロール容器に梱包して自動車で約5時間かけて輸送した。消毒試験は、受精後約10時間経過したモルラ期の受精卵に行った。卵は試験前にろ過海水で洗浄し、卵以外の夾雑物を可能な限り除去した。試験は1回次を2004年3月20日、2回次を4月13日、3回次を5月6日に行った。2～4細胞期にかけての受精率は93～98%であった。

有効ヨウ素濃度および浸漬時間 ヨード剤には、水産用イソジン液 (明治製菓) を用いた。消毒液は有効ヨウ素濃度が0, 25, 50および100mg/ℓとなるようにヨード剤をろ過海水に溶解して作製した。各濃度の消毒液に、卵を5, 10, 15および20分間浸漬した。未処理の卵を対照区とした。受精卵1g (約700粒) に対して、消毒液は3ℓを用いた。

浸漬方法 卵約2.2g (約1,500粒) をネット (10×7×6cm, ナイロン製, 目合い0.5mm) に入れ、ネットごと消毒液に浸漬し、卵全体に消毒液が行き渡るように所定時間内でゆっくり、ネットを揺らした。

ふ化管理 所定時間ヨード剤に浸漬した卵は、ろ過海水を流水にした水槽にネットごと移して3分間洗浄し、ヨード剤を速やかに除去した。洗浄後の卵200粒

を薬さじですくい取り、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ろ過海水500mlの入った蓋付きプラスチック瓶 (広口T型瓶, アズワン) に収容した。卵を収容したプラスチック瓶は、ろ過海水のかけ流しで強通気を施した1ℓ水槽に収容し、ふ化まで卵管理した。本種のふ化は数日間にわたり¹⁰⁾、ふ化により発生した有機物の腐敗による水質悪化が懸念されたため、最初のふ化を確認した日から対照区の卵がすべてふ化するまでの間、1日1回水量の60%の海水を換水した。

卵管理中の平均水温は、1回次18.1℃ (17.2～18.9℃)、2回次20.0℃ (19.5～20.5℃)、3回次18.6℃ (18.2～19.2℃) であった。

ふ化状況の観察 対照区の卵がすべてふ化した時点で、それぞれのプラスチック瓶に *m*-アミノ安息香酸エチルメタンスルホネート (ナカライテスク) を300mg/ℓとなるように添加して仔魚に麻酔をかけ、ふ化状況を実体顕微鏡下 (SMZ-U, ニコン) で観察した。正常ふ化仔魚、ふ化直前まで発生が進んだ未ふ化生残卵、仔魚膜異常、頭部が卵膜から抜けていない等の異常ふ化仔魚、および死亡卵に区分し、正常ふ化率、未ふ化生残卵率、異常ふ化率、死亡卵率、未ふ化生残卵と異常ふ化を合わせたふ化異常率を求めた。

消毒効果 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) 1mlをあらかじめ入れたストマッカーの袋 (オルガノ) に取り、ヨード剤の反応を止めた。卵の9倍量となるように滅菌人工海水を加えてホモジナイズし、10倍希釈液列を作製した。海水培地平板表面に塗抹して25℃で5日間好気的に培養して出現コロニー数から生菌数を算出し、以下の式により消毒率を求めた。

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

統計検定 正常ふ化率、死亡卵率、ふ化異常率について得られた値を逆正弦変換して2元配置の分散分析を行い、Turkeyの方法による多重比較を行った。

結 果

ふ化に及ぼす影響 ふ化状況の観察結果を表1にまとめた。ヨード剤を用いた試験区の正常ふ化率は、いずれの回次も浸漬時間が長くなるにつれて低下する傾向にあった。有効ヨウ素濃度0mg/ℓの全ての試験区、

および25, 50, 100mg/ℓに5分浸漬した区と対照区の正常ふ化率に有意差は認められなかった(表2)。

未ふ化生残卵はほとんどの試験区で観察された。ヨード剤を用いた試験区の未ふ化生残卵率は、いずれの回次とも浸漬時間が長くなるにつれて、割合が増える傾向が認められた。異常ふ化仔魚は、対照区およびヨード剤を含まない試験区では観察されなかったが、ヨード剤を用いた試験区のほとんどで観察され、異常ふ化仔魚率は浸漬時間10分が高い傾向が認められた。未

ふ化生残卵数と異常ふ化仔魚数を合計して求めたふ化異常率は、ヨウ素濃度0 mg/ℓの全ての試験区、および25, 50, 100mg/ℓに5分浸漬した区と対照区に有意差が認められなかった(表2)。全ての試験区で死亡卵が観察されたが、死亡卵率は試験区間で有意差が認められなかった($p<0.05$)。

消毒効果 生菌数および消毒率を表3に示した。ヨード剤を含まない試験区の消毒率は5%以下と低く、逆に処理後、生菌数が増加する傾向にあった。1およ

表1 ポビドンヨードによるトラフグの卵消毒における正常ふ化率、未ふ化生残率、異常ふ化率及び死亡卵率

ヨウ素濃度 (mg/ℓ)	浸漬時間 (分)	1回次				2回次				3回次			
		正常 ふ化率 (%)	未ふ化 生残卵率 (%)	異常 ふ化率 (%)	死亡 卵率 (%)	正常 ふ化率 (%)	未ふ化 生残卵率 (%)	異常 ふ化率 (%)	死亡 卵率 (%)	正常 ふ化率 (%)	未ふ化 生残卵率 (%)	異常 ふ化率 (%)	死亡 卵率 (%)
0	0	95.3	0.9	0.0	3.8	78.8	1.4	0.0	19.8	85.3	2.5	0.0	12.2
	5	91.8	2.6	0.0	5.6	82.0	0.7	0.0	17.3	79.8	2.7	0.0	17.5
	10	92.4	0.0	0.0	7.6	85.9	0.5	0.0	13.6	81.6	4.6	0.0	13.8
	15	95.8	0.3	0.0	3.8	83.4	0.4	0.0	16.2	83.7	1.7	0.0	14.5
	20	95.4	0.4	0.0	4.3	84.3	1.6	0.0	14.1	82.6	3.4	0.0	14.1
25	5	91.8	0.0	0.0	8.2	57.0	13.5	11.6	17.9	57.5	7.8	17.9	16.8
	10	66.0	4.3	24.7	5.1	8.5	53.7	14.7	23.2	22.2	30.1	30.1	17.6
	15	17.7	55.6	22.0	4.7	3.1	71.7	3.1	22.0	5.8	64.9	16.4	12.9
	20	8.7	57.7	30.2	3.4	2.5	71.0	6.0	20.5	3.4	71.2	10.1	15.4
50	5	95.4	0.8	0.8	3.1	50.6	8.8	17.6	22.9	62.6	4.7	22.3	10.4
	10	52.9	13.1	28.8	5.2	12.6	54.9	13.0	19.5	19.7	30.7	35.5	14.0
	15	25.4	50.4	17.8	6.5	2.7	64.9	1.6	30.8	8.6	53.3	24.3	13.7
	20	7.1	67.4	19.2	6.3	0.0	74.5	0.0	25.5	4.8	67.5	11.4	16.2
100	5	90.5	0.5	4.2	4.8	73.5	5.5	5.0	16.0	79.1	2.8	4.3	13.8
	10	19.2	49.4	24.9	6.5	32.2	28.8	20.0	19.0	15.8	35.7	34.8	13.6
	15	2.1	78.5	13.6	5.8	2.5	72.5	1.3	23.8	6.6	59.5	15.0	19.0
	20	2.7	83.5	9.0	4.8	0.0	75.4	0.0	24.6	8.2	60.2	17.2	14.3

表2 正常ふ化率およびふ化異常率に関する Turkey 法による有意差検定結果(上段:正常ふ化率, 下段:ふ化異常率)

ヨウ素濃度 (mg/ℓ)	浸漬時間 (分)	0	0	0	0	0	25	25	25	25	50	50	50	50	100	100	100	100
		0	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20
0	0	-	-	-	-	-	-	**	**	**	-	**	**	**	-	**	**	**
0	5	-	-	-	-	-	-	**	**	**	-	**	**	**	-	**	**	**
0	10	-	-	-	-	-	-	**	**	**	-	**	**	**	-	**	**	**
0	15	-	-	-	-	-	-	**	**	**	-	**	**	**	-	**	**	**
0	20	-	-	-	-	-	-	**	**	**	-	**	**	**	-	**	**	**
25	5	-	-	-	-	-	-	**	**	**	-	**	**	**	-	**	**	**
25	10	**	**	**	**	**	*	-	*	**	-	-	**	**	-	*	*	**
25	15	**	**	**	**	**	**	-	-	**	-	-	-	**	-	-	-	-
25	20	**	**	**	**	**	**	-	-	**	-	-	-	**	-	-	-	-
50	5	-	-	-	-	-	-	*	**	**	-	**	**	**	-	**	**	**
50	10	**	**	**	**	**	**	-	-	-	**	-	*	**	-	*	*	*
50	15	**	**	**	**	**	**	-	-	-	**	-	-	**	-	-	-	-
50	20	**	**	**	**	**	**	-	-	-	**	-	-	**	-	-	-	-
100	5	-	-	-	-	-	-	**	**	**	-	**	**	**	-	**	**	**
100	10	**	**	**	**	**	**	-	-	-	**	-	-	-	**	-	-	-
100	15	**	**	**	**	**	**	-	-	-	**	-	-	-	**	-	-	-
100	20	**	**	**	**	**	**	-	-	-	**	-	-	-	**	-	-	-

* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$

表3 受精卵の消毒前及び消毒後の生菌数の変化とポビドンヨードの消毒率

ヨウ素 濃度 (mg/ℓ)	消毒 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	7.0×10^3		1.6×10^3		3.3×10^3	
	5	1.0×10^4	-48.2	1.3×10^4	-722.6	6.2×10^3	-86.4
	10	2.2×10^4	-210.1	8.8×10^3	-464.5	3.2×10^3	4.5
	15	1.5×10^4	-116.5	2.2×10^4	-1335.5	2.5×10^4	-642.4
	20	2.1×10^4	-198.6	6.8×10^3	-338.7	4.8×10^4	-1354.5
25	5	4.0×10^2	94.2	7.5×10^2	51.6	0.0×10^0	>99.9
	10	7.0×10^2	89.9	5.5×10^1	96.8	5.0×10^1	98.5
	15	4.5×10^2	93.5	1.3×10^3	16.1	0.0×10^0	>99.9
	20	1.0×10^2	98.6	7.0×10^2	54.8	5.0×10^1	98.5
50	5	4.5×10^2	93.5	8.5×10^2	45.2	1.0×10^2	97.0
	10	5.5×10^2	92.1	4.0×10^2	74.2	0.0×10^0	>99.9
	15	4.5×10^2	93.5	1.9×10^4	-1141.9	5.0×10^1	98.5
	20	0.0×10^0	>99.9	5.5×10^1	96.8	3.5×10^2	89.4
100	5	8.5×10^2	87.8	1.2×10^4	-696.8	2.5×10^2	92.4
	10	3.0×10^2	95.7	1.0×10^2	93.5	5.0×10^1	98.5
	15	5.5×10^1	99.3	1.5×10^2	90.3	5.0×10^1	98.5
	20	2.5×10^2	96.4	2.0×10^2	87.1	0.0×10^0	>99.9

消毒率 = (1 - 消毒後の生菌数 / 消毒前の生菌数) × 100

び3回次では、ヨード剤を用いたいずれの試験区の消毒率も90%前後であった。2回次では、生菌数が全く減少していない試験区と90%台の消毒率の試験区があり、大きな差が認められた。いずれの回次においても、ヨウ素濃度の上昇、浸漬の長時間化に伴う消毒率の上昇は観察されなかった。

考 察

ふ化に及ぼす影響 対照区とヨウ素を含まない試験区間では、正常ふ化率、ふ化異常率および死亡卵率に有意差は認められなかったことから、今回行った卵へのハンドリングは、トラフグ卵のふ化に影響を及ぼさなかったと考えられた。

対照区とヨード剤を用いて5分浸漬した試験区の正常ふ化率とふ化異常率に統計的有意差が認められなかった。したがって、有効ヨウ素濃度100mg/ℓ以下の海水に5分間浸漬することは、トラフグ受精卵に対して安全であると考えられた。

死亡卵率は試験区間で有意差が認められなかったことから、今回試験した有効ヨウ素濃度および浸漬時間内では卵発生を停止させることは無いと考えられた。しかし、未ふ化生残卵もしくはふ化異常がヨード剤を用いた試験でのべ36例中35例確認されていることから、ヨード剤は卵膜もしくはふ化酵素の発現に影響を及ぼしていると考えられた。ヒラメ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、未ふ化生残卵になると考えられている¹¹⁾。今回のヨード剤によるトラフグの受精卵消毒において確認された未ふ化生残卵についても、同様の現象が起きていると考えられ、消毒時間が長くなるにつれ卵膜の構造がより変性した結果、未ふ化生残卵率が増えたと考えられた。また、異常ふ化仔魚は浸漬時間5分における割合は低く、10分で高く、15分以上では低くなる傾向であった。浸漬時間5分までは、ヨード剤による卵膜の構造の変性の程度は軽く、多くの受精卵において正常なふ化ができたと考えられた。一方、浸漬時間10分では変性の程度が進行したため、ふ化までは可能であったが異常ふ化の割合が増え、15分以上になると、多くの受精卵でふ化することすらできず、未ふ化生残卵となったと考えられた。

ヒラメにおける未ふ化生残卵の生存期間は、無処理のふ化のピークから約2日程度であったとの報告がある¹²⁾。今回のトラフグの未ふ化生残卵も、ヒラメ同様に未ふ化のまま死亡にいたると考えられた。また、異常ふ化仔魚のほとんどは卵膜が抜けられない状態であり、この状態は観察の翌日も続いていたことや、卵膜が仔魚の体にくい込んでいたことから、いずれ死亡すると考えられた。

消毒効果 ヨード剤を含まない試験区では、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90%前後の消毒率が得られたことから、トラフグ受精卵をヨード剤を用いて消毒できると考えられた。しかしながら、ヨウ素濃度の上昇や浸漬時間の長期化に伴う消毒率の上昇は観察

されなかった。本種は粘着卵であり、卵の表面の粘着物質による影響が考えられるが、今後の検討課題である。なお、2回次の試験において、生菌数が増加するなど、消毒率が大きく変化した原因は、消毒前の夾雑物の除去が不十分であったことや、死卵の混入、卵の表面の粘着物質の影響等が考えられた。

以上の結果から、ヨード剤を用いてトラフグの卵消毒を行う場合、ヨウ素濃度100mg/ℓ以下、浸漬時間5分までであれば、90%の消毒率で安全に消毒できると考えられた。

文 献

- 1) 水産庁・独立行政法人水産総合研究センター (2004) 平成14年度栽培漁業生産，入手・放流実績（全国）. pp. 37-38, 82-84.
- 2) 中井敏博・Nguyen Huu Dung・西澤豊彦・室賀清邦・有元 操・大槻観三 (1994) クエおよびトラフグにおけるウイルス性神経壊死症の発生. 魚病研究, **29**, 211-212.
- 3) 西岡豊弘・古澤 徹・水田洋之介 (1997) 種苗生産過程の海産魚介類における疾病発生状況 (1989～1994年). 水産増殖, **45**, 285-290.
- 4) 山口県・長崎県・福岡県 (1991) トラフグ放流技術開発事業総括報告書. pp 9-13.
- 5) 「魚類防疫への挑戦」編集委員会 (1993) 一成功・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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 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, pp. 71.
- 10) 神谷直明・辻ヶ堂 諦 (1995) トラフグ受精卵のふ化時刻. 栽培技研, **23**, 109-112.
- 11) 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.
- 12) 三村 元・長瀬俊哉・片山泰人・長光貴子・難波憲二 (1998) オゾン処理海水のヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) 卵に対する影響. 水産増殖, **46**, 101-110.