

原著論文

# サケとサクラマス的人工採卵時における等張液を用いた未受精卵の洗卵がふ化仔魚の生存に及ぼす効果

大本謙一<sup>\*1</sup>・小野郁夫<sup>\*2</sup>・平澤勝秋<sup>\*3</sup>・川名守彦<sup>\*4</sup>・吉水 守<sup>\*5</sup>

Effect of washing unfertilized eggs with isotonic solution on egg viability in chum salmon *Oncorhynchus keta* and masu salmon *Oncorhynchus masou*

Ken-ichi OHMOTO, Ikuo ONO, Katuaki HIRASAWA,  
Morihiro KAWANA and Mamoru YOSHIMIZU

The effectiveness of washing eggs with an isotonic solution as a measure for preventing fish pathogens was examined at a practical scale in cultured salmonid fish. The effectiveness of washing on the number of viable bacteria infecting eggs at the eyed stage of development, as well as the survival rates of hatched fry, were examined in masu salmon *Oncorhynchus masou* and chum salmon *O. keta*. In masu salmon, the number of bacteria on the egg surface before washing was approximately  $10^4$  CFU/mL, which decreased to  $10^2$  CFU/mL after washing. In chum salmon, the number of bacteria was  $10^3$  CFU/egg before washing, which decreased to  $10^1$  CFU/egg after washing. The findings showed that washing was effective for reducing the number of bacteria on eggs. In the case of shower washing with stirring, the fertility rate decreased due to physical shock. The mortality of hatched fry was significantly lower in breeding ponds stocked with fry from eggs that had been subjected to washing, suggesting that it was effective for increasing fry survival in aquaculture ponds. For masu salmon, a combination of rinsing and showering without stirring is proposed, whereas for chum salmon, showering without stirring is proposed.

キーワード：サケ科魚類，未受精卵，等張液洗卵，仔魚  
2013年9月12日受付 2015年12月18日受理

サケ科魚類のふ化場では，病原体フリーのふ化用水の確保と発眼期にポピドンヨード剤（以下，ヨード剤）を用いて卵消毒を行うことにより，卵表面汚染を介した垂直伝播の防除が可能となった（Yoshimizu *et al.* 1989）。

しかし，病原体が卵内に侵入することが知られている細菌性腎臓病（以下，BKD）や細菌性冷水病（以下，冷水病）では十分な効果が認められていない。近年，冷水病およびBKD共に体腔液あるいは卵汚染液中の原因菌の生

\*1 国立研究開発法人水産総合研究センター東北区水産研究所沿岸漁業資源研究センターさけます資源グループ  
〒027-0097岩手県宮古市崎山4-9-1

Salmon Resources Research Group, Research Center for Coastal Fisheries and Aquaculture, Tohoku National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency,  
4-1-9 sakiyama, miyako, iwate 027-0097, JAPAN  
ohmoto@affrc.go.jp

\*2 国立研究開発法人水産総合研究センター北海道区水産研究所さけます資源部静内さけます事業所

\*3 国立研究開発法人水産総合研究センター北海道区水産研究所さけます資源部根室さけます事業所（現所属一般社団法人根室管内さけ・ます増殖事業協会）

\*4 国立研究開発法人水産総合研究センター北海道区水産研究所さけます資源部

\*5 北海道大学 大学院水産科学研究院

菌数が  $10^7$  CFU/mL 以上の場合、吸水時に原因菌が卵門から卵腔に入り込み、そこで生存することによりふ化時に感染が成立することが明らかになった (Kohara *et al.* 2012, Kumagai and Nawata 2010a, Kumagai and Nawata 2010b)。感染を防ぐには、受精・吸水前の卵表面の菌数を下げることが重要であり、さらに、この時に卵消毒を併用すると、ふ化施設内への病原体の侵入を高い確率で阻止できる (小原ら 2010, Kumagai and Nawata 2010b)。

ニジマス *Oncorhynchus mykiss* など多回産卵魚の人工採卵は搾出法と呼ばれる腹部を圧迫して生殖孔から排出される卵を採る方法で行われている。この方法では圧迫により潰れた卵 (以下、潰卵) が混入し受精率を低下させることから、受精率向上を目的として等張液で洗卵する方法 (以下、洗卵法) が古くから行われてきた (小原ら 2010)。近年、受精前に等張液で1回洗浄するごとに、細菌およびウイルスの数は1桁減少することが報告され、体腔液中で汚染された卵表面の病原体を除菌するのに有効であることが示された (小原ら 2010)。この方法はニジマスおよび在来マスを対象とした養鱒場で、その重要性の再確認と普及が図られている。一方、増殖対象サケ・マス類 (サケ *O. keta*, カラフトマス *O. gorbuscha*, サクラマス *O. masou*, ベニザケ *O. nerka*) は1回産卵魚で、人工採卵は腹部を切開して腹腔内に排卵された卵を採取する切開法で行われている (野川 2010)。そのため潰卵の混入が少ないことや採卵の規模が大きく作業負担が過大となることから、洗卵法は全く普及していないのが現状である。増殖対象サケ・マス類の種苗生産現場において洗卵法が普及すれば、サクラマスで多発するBKD (奥田ら 2007) およびサケ仔稚魚で問題となっている冷水病 (Misaka and Suzuki 2007) の防除に効果があると考えられる。さらに、養魚池での原因不明の減耗をはじめ、未だ解決されていない卵膜軟化症や水腫症等の疾病についても、原因が細菌などの垂直伝搬によるものであれば洗卵法の導入により発生軽減が期待できる。

本研究ではサクラマスとサケを対象に、事業規模で未受精卵を等張液で洗卵し、卵表面の細菌数の変動を把握すると共に、発眼率および仔魚の生残率に洗卵がどの程度影響を及ぼすか検討した。また、事業規模での応用を目的として効率的な洗卵作業の方法を提案する。

## 材料と方法

**サクラマス 洗卵工程とシャワー洗卵の違いによる発眼率と生残数の比較** 試験に用いたサクラマスの採卵は独立行政法人 (現国立研究開発法人) 水産総合研究センター北海道区水産研究所伊茶仁さけます事業所 (以下、伊茶仁事業所) および独立行政法人 (現国立研究開発法人) 水産総合研究センター北海道区水産研究所根室さけます事業所 (以下、根室事業所) で9月中旬に実施した。

本研究は通常行われる採卵工程 (採卵・受精) に、現在ニジマスなどの養鱒場で広く使用されている 0.9 ~ 1.0% NaCl 水溶液 (小原 2013) を等張液として用いた洗卵 (採卵・洗卵・受精) を組み入れて事業規模で実施した。

伊茶仁事業所の洗卵行程では、まず、サクラマス親魚 10 尾から切開法で採卵した約 15 千粒 (約 1.9kg) の未受精卵を等張液 (5L) の入った受卵盆 (容量 16L・直径 40cm) と呼ばれるタライ (以下、受卵盆) に移し、攪拌しながら潰卵や臓器片などの懸濁物を洗い流す濯ぎ洗卵を2回行った。その後、底面が球状のステンレス製のザル (上部の直径 40cm) に移し替え、水中ポンプのホースに接続されたシャワーノズル (毎分 2L 噴射) を用い攪拌しながらシャワー状に散布するシャワー洗卵を1分間行い、その後、雄親魚 5 尾の精子をかけ受精させた。この工程を繰り返し 130 千粒の受精卵を得た。

一方、根室事業所の採卵行程はシャワー洗卵方法のみ変更した。洗浄には、園芸用ジョーロ (毎分 10L 噴出) を用い、攪拌せずに 30 秒間シャワー洗卵を行なった。この工程で 240 千粒の受精卵を得た。

伊茶仁事業所で採卵された卵は稚魚期まで根室事業所で管理されるため、物理的衝撃に強くするため、卵を受精後1時間吸水槽で吸水させたのち、伊茶仁事業所から受精卵を根室事業所へ運搬した。両事業所の受精卵をヨード剤消毒 (50ppm・15分) して、水温 8.0°C の湧水を毎分 30L 通水した、増収型アトキンスふ化槽 (長さ 350cm, 幅 35cm, 高さ 30cm で4槽に区分)、各1列に伊茶仁川卵2槽、標津川卵3槽に収容した。発眼時に死卵を取り除き (300°C・日)、再度ヨード剤消毒を行った。

ふ化前の発眼卵は砂利を引き詰めた室内のコンクリート製養魚池 (縦 15.6m × 幅 1.65m × 水深 0.08m, 水温 8.0°C, 流速 0.8cm/s) に移した。その際、各事業所の発眼卵の収容密度が養魚池ごとにほぼ同様となるように (5.6 ~ 5.8 千粒/m<sup>2</sup>)、ふ化した仔魚が均一に分布するように散布し、ふ上まで管理した。死亡数の確認は1日1回行い、受精 126 日後 (積算温度 960°C・日) の生残数をふ上数とした。

**洗浄液の違いによる発眼率と生残数の比較** 洗浄液の違いによる発眼率と生残数の比較をするため、伊茶仁事業所において、受卵盆に移された未受精卵の一部を採取した。試験では等張液区、ヨード剤等張液区 (水産用イソジン液 10% を等張液で 200 倍希釈したヨード剤添加等張液) (水産用イソジン液 10%, Meiji Seika ファルマ株式会社)、無洗卵区の3試験区を設定した。等張液区は濯ぎ洗卵を2回、シャワー洗卵を1回行った。ヨード剤等張液区は等張液区と同じ工程後、卵をヨード剤等張液の入ったボール (容量 3.2L) に移し、15分浸漬した後、ザルに移し等張液で10秒間シャワー洗卵した。無洗卵区のサンプルは等張液の入った受卵盆に移される前の未受精卵を用いた。

各試験区の卵は下部がロート状になったふ化器 (ハッ

チパイプ：直径 20cm，高さ 68.5cm）を用い，水温 8.0°C の湧水を毎分 3L 通水して，ふ化仔魚がふ上するまで管理した。

**洗卵による除菌効果** 伊茶仁事業所の採卵工程（採卵・洗卵・受精）の中から，洗卵前の未受精卵，1 回目濯ぎ洗卵，2 回目濯ぎ洗卵およびシャワー洗卵後の卵を 2 工程分採取した。採卵尾数は 1 工程 10 尾とした。卵は滅菌広口瓶に各 500 粒入れ，下に溜まった液（約 0.5mL）を細菌検査用サンプルにした。なお，洗卵前の未受精卵を収容した容器に溜まった液は体腔液である。

次いで，5 尾のサクラマス親魚から個別別に各 500 粒，洗卵前の未受精卵を滅菌広口瓶に採取し，下に溜まった体腔液を無洗卵サンプルにした。滅菌生理食塩水 100mL を加え 10 回攪拌し，上澄みを捨て残った液（約 0.5mL）を 1 回目濯ぎ洗卵サンプルに，再度，同様に滅菌生理食塩水で攪拌し残った液を 2 回目濯ぎ洗卵サンプルにした。濯ぎ洗卵が終わった卵を滅菌したザルに移し，滅菌生理食塩水 100mL をシャワー状にかけて洗卵し，シャワー洗卵サンプルにした。

細菌の培養は各サンプルを  $10^8$  まで 10 倍段階希釈し，CBB 培地（野村ら 2002），KDM-2 培地（Matsui *et al.* 2009），改変サイトファーガ培地（Misaka and Suzuki 2007）の表面に，それぞれ 100 $\mu$ L を塗抹し，15°C で 5 日間行った。生菌数は各希釈段階の 2 枚の培地上に出現したコロニー数の平均値から算出した。なお，KDM-2 培地は別途ミスラー法（坂崎 1978）で  $10^1 \sim 10^8$  段階希釈液を 50 $\mu$ L ずつ滴下し 15°C で 10 日間培養した。なお，CBB 培地はせっそう病原菌（*Aeromonas salmonicida*），KDM-2 培地平板は BKD 原因菌（*Renibacterium salmoninarum*），改変サイトファーガ培地は冷水病原菌（*Flavobacterium psychrophilum*）の分離を目的として供試した。

**サケ 洗卵工程とシャワー洗卵による発眼率と死亡割合の比較** サケ親魚は標津川採卵場（一般社団法人根室管内さけ・ます増殖事業協会）で畜養されている伊茶仁川産サケと標津川産サケを使用し，10 月上旬に伊茶仁事業所へ収容する卵 1,500 千粒を試験に供した。

サケの採卵は大規模で行われることが多く，サクラマス同様の洗卵方法では時間がかかるため，濯ぎ洗卵を省略してシャワー洗卵のみ行った。その際，サクラマスと同じ組成の等張液を使用し緩やかに攪拌しながらシャワー洗卵した。さらに時間短縮を図るため，シャワーノズルを毎分 6L 噴射に取り換えてシャワー洗卵した。

切開法で採卵し受卵盆（容量 12L・底面直径 33cm・上面直径 46cm）に収容したサケの未受精卵，約 38 千粒（15 尾分，約 9.7kg）を 2 等分し，底面が球状のステンレス製のザル（上部の直径 40cm）に約 19 千粒（約 4.85kg）ずつ移し替え，シャワーノズルで 30 秒間シャワー洗卵し，これを試験区（洗卵）とした。一方，通常の工程で採卵したものを対象区（無洗卵）とした。なお，受卵盆

に収容した未受精卵を 2 等分しザルに移したのは 1 ザル当たりの未受精卵の収容量を減らし，未受精卵に均一に等張液を散布するためである。

受精卵は標津川採卵場の吸水槽で 1 時間吸水させてから運搬し，洗卵区 2 区分と無洗卵区 2 区分に分けて，水温 8.0°C の湧水を毎分 50L 通水したボックス型ふ化槽（縦 87cm，横 63cm，高さ 50.5cm）に収容した。

収容直後に卵膜軟化症を防ぐため，卵膜の硬化作用があるカテキン（ポリフェノン K・三井農林株式会社）による浸漬処理（350ppm・30 分）を行った。また，死卵による水カビの発生を抑制するため，発眼まで週 2 回，魚卵消毒剤パイセス（ノバルティス アニマルヘルス株式会社）による消毒（用水 1L 当たり 0.2mL・30 分）を行った。

発眼時に死卵を取り除き，ヨード剤消毒を行った後，洗卵区と無洗卵区の受精卵をそれぞれ砂利が引き詰められたコンクリート製の屋内養魚池（縦 36.0m × 幅 1.65m × 水深 0.10m）に移した。その際，ふ化した仔魚が均一に分布するように発眼卵を散布した。

両試験区においてふ化からふ上までの期間 1 日 1 回，排水部に流れ着いた瀕死魚と死亡魚を取り上げ，瀕死魚を含む死亡数（以下，死亡数）を積算温度 50°C・日ごとに記録した。

**シャワー洗卵強度の違いによる発眼率の比較** 洗卵強度試験はサケ親魚 10 尾から切開法で採卵し受卵盆に収容した未受精卵（約 29 千粒・約 6.98kg）を 4 等分し，毎分 6L 噴出するシャワーノズルで 30 秒間，攪拌しながらシャワー洗卵する攪拌洗卵と，攪拌せずシャワー洗卵する無攪拌洗卵を各 2 回行い，受精 44 日後（積算水温 353°C・日）における発眼率を比較した。

**シャワー洗卵による除菌効果** 洗卵前のサンプルはサケ親魚 15 尾から切開法で採卵され受卵盆に収容し，ザルに 2 等分し移された未受精卵（約 19 千粒・約 4.85kg）を用いた。その後，シャワー洗卵（毎分 6L，30 秒間攪拌洗浄）を行なった直後の未受精卵を洗卵後のサンプルに用いた。

サンプルのうち卵 40 粒を滅菌 PBS10mL 含む滅菌遠心管（容量 50mL）に入れ，ボルテックスで激しく 20 秒間攪拌することにより卵表面の細菌を剥して PBS に懸濁させた。細菌の培養はミスラー法により，懸濁液を滅菌 PBS で  $2.5 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^8$  まで 10 倍段階希釈し，TSA 培地，改変サイトファーガ培地，KDM-2 培地の 3 種類の培地表面（各 2 枚）にそれぞれ 25 $\mu$ L を塗布し 15°C で 14 日間行なった。生菌数は 2 枚の培地に出現したコロニー数を平均し，希釈系列からミスラー法により求めた卵 40 粒の懸濁液の菌数から，卵 1 粒あたりの表面付着菌数（CFU/粒）として示した。

**統計処理** 各試験の発眼率の比較には  $\chi^2$  検定を用いた。養魚池における試験区間の死亡数の比較は *t* 検定を用いた。

## 結 果

**サクラムス 洗卵工程とシャワー洗卵の違いによる発眼率と生残数の比較** シャワー洗卵方法が異なる伊茶仁川産および標津川産サクラムスのふ上期までの比較を表1に示した。発眼率は伊茶仁事業所卵（84.6%）が根室事業所卵（92.9%）より低く、有意差が認められた。 $(\chi^2=3.841, p<0.05)$  ふ化からふ上まで有意差は認められなかった。 $(\chi^2=3.841, p>0.05)$ 。

**洗卵液の違いによる発眼率と生残数の比較** 洗浄液の違いによるサクラムス卵の発眼率は、ヨード剤洗卵区が70.8-81.5%、洗卵区が77.8-89.0%、対照区が93.0-98.7%と各区の間に有意差が認められた（表2）。 $(\chi^2=5.991, p<0.05)$  洗浄液にかかわらず、ふ化した仔魚はほぼすべてが浮上した。

**洗卵による除菌効果** 洗卵前に $10^4$ CFU/mL程度であった生菌数は1回目の濯ぎ洗卵で $10^3$ CFU/mLに減少し、2回目の濯ぎ洗卵では2つの検体を除いて洗浄液からコロニーの出現は見られなくなった（10 CFU/mL以下）。さらに、シャワー洗卵後の洗浄液の生菌数も求められなくなり、回数を重ねる毎に生菌数が減少した。なお、供試した3種類の培地の生菌数に明瞭な差はなく、*F. psychrophilum* および *R. salmoninarum* が優勢と考えられるコロニーが出現した平板は認められなかった（表3）。

**サケ 洗卵工程とシャワー洗卵による発眼率と死亡割合の比較** 試験区（洗卵）における発眼率は88.6-89.6%、ふ化率は98.9-99.0%であった。一方、対照区（無洗卵）の発眼率92.0-92.7%、ふ化率98.8-99.0%でありふ化率はほぼ同じであった。発眼率は試験区の方が対照区より2.4-4.1%低くなったが有意差は認められなかった $(\chi^2=3.841, p>0.05)$ （表4）。

積算温度 $540^\circ\text{C}\cdot\text{日}$ でふ化したサケの仔魚は試験区、

対照区ともに積算温度 $750^\circ\text{C}\cdot\text{日}$ ころから死亡が始まり、累積死亡割合は試験区が0.99%、対照区が1.32%で、両区の間に有意差が認められた（t-test,  $p<0.05$ ）（図1）。両区ともに瀕死魚および死亡魚の頭部、背部、尾部などの一部に水カビが付着し、積算温度 $900^\circ\text{C}\cdot\text{日}$ ころからは腹部が膨満し、肛門部が出血している症状が多く見られた。（写真1）

**シャワー洗卵強度の違いによる発眼率の比較** シャワー洗卵時における攪拌の影響を表5に示した。攪拌洗卵では発眼率が81.9-84.8%となり発眼率の低下が見られたが、無攪拌洗卵では発眼率が99.1-99.3%と高く、攪拌洗卵と無攪拌洗卵の間に有意差が認められた。 $(\chi^2=3.841, p<0.05)$

**シャワー洗卵による除菌効果** 標津川採卵場で行ったサケ卵のシャワー洗卵による除菌効果を表6に示した。供試した3種類の培地とも洗卵前に約 $10^3$ CFU/粒の生菌が確認され、洗卵後にはサクラムスの洗卵と同様に2桁の除菌効果が見られた。

## 考 察

2009年級から2011年級のサクラムス卵の平均発眼率は伊茶仁事業所で93.5%、根室事業所で94.4%とほぼ同じであった。一方、今回行った洗卵では伊茶仁事業所の発眼率が根室事業所に比べて低下した。両者の違いは洗卵の際に使用したシャワー器具、等張液量、洗卵時間と攪拌の有無である。伊茶仁事業所ではシャワーヘッド（2L・1分間）を用い攪拌しながらシャワー洗卵を行ったのに対し、根室事業所では園芸用ジョーロ（5L・30秒）を用い攪拌せずシャワー洗卵を行った。シャワー器具の噴出圧や攪拌による衝撃、等張液量や洗卵時間の違いが発眼率の低下を招いた可能性が考えられた。そのため、

表1. シャワー洗卵方法が異なる標津川産および伊茶仁川産サクラムス卵におけるふ上までの比較

	採卵数 (千粒)	発眼卵数 (千粒)	発眼率 (%)	ふ化数 (千粒)	ふ化率 (%)	ふ上数 (千尾)
標津	240	223	92.9	222	92.5	220
伊茶仁	130	110	84.6	110	100.0	110

表2. サクラムス卵の洗卵液の違いによるふ上までの比較

	試験	採卵数 (粒)	発眼卵数 (粒)	発眼率 (%)	ふ化数 (粒)	ふ化率 (%)	形態異常数 (粒)	ふ上数 (粒)
ヨード剤	1	1,698	1,384	81.5	1,378	99.6	5	1,372
	2	1,625	1,150	70.8	1,137	98.9	5	1,131
洗卵	1	1,773	1,578	89.0	1,571	99.6	14	1,557
	2	1,564	1,217	77.8	1,199	98.5	7	1,190
対照区	1	1,657	1,635	98.7	1,630	99.7	6	1,623
	2	1,294	1,203	93.0	1,202	99.9	2	1,199

未受精卵の洗卵がふ化仔魚におよぼす影響

表 3. サクラマス卵の洗卵による除菌効果 (生菌数 CFU/mL)

培地	洗卵	**10尾プール		個体別				
		1	2	1	2	3	4	5
CBB	洗卵前	$1.8 \times 10^4$	$2.1 \times 10^4$	$1.2 \times 10^4$	$8.0 \times 10^3$	$1.3 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$
	1回洗浄	$3.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$ *	$1.0 \times 10^3$	$4.0 \times 10^3$	<10*	$1.0 \times 10^3$	<10
	2回洗浄	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	シャワー洗卵	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
改変サイト ファーガ	洗卵前	$1.7 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$
	1回洗浄	$5.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$	<10	<10
	2回洗浄	$1.0 \times 10^3$	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	シャワー洗卵	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
改変 KDM	洗卵前	$1.5 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$1.9 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$
	1回洗浄	<10	$1.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$	$3.0 \times 10^3$	<10	<10	<10
	2回洗浄	<10	<10	<10	$1.0 \times 10^3$	<10	<10	<10
	シャワー洗卵	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

\*30 ~ 300 コロニー出現平板を数える場合の最小菌数は  $3.0 \times 10^2$  以下 CFU/mL

\*\* 受卵盆に採取された 10 尾分の未受精卵をプールして 1 検体とした

表 4. 試験区 (洗卵) と対照区 (無洗卵) によるサケ卵の発眼率とふ化率の比較

試験	採卵数 (千粒)	発眼卵数 (千粒)	発眼率 (%)	ふ化数 (千粒)	ふ化率 (%)	
対照区	1	431	397	92.0	393	99.0
	2	371	344	92.7	340	98.8
試験区	1	331	297	89.6	294	99.0
	2	405	359	88.6	355	98.9

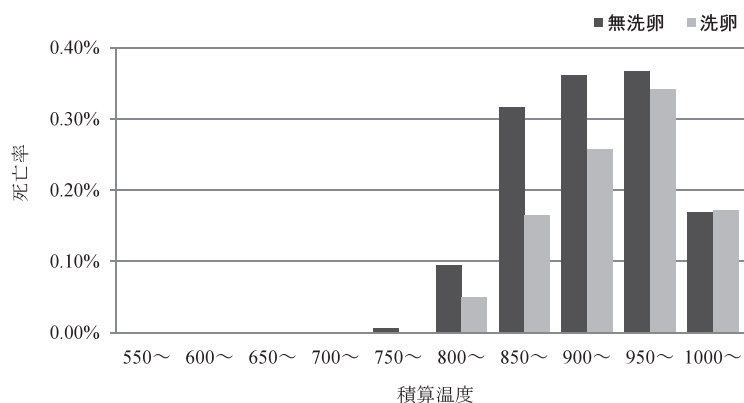


図 1. 洗卵および無洗卵由来のサケの養魚池における積算温度別死亡数



写真 1. 死亡魚の症状 左: 積算温度 750°C・日 (矢印は水カビ部位を示す) 右: 積算温度 900°C・日

表 5. サケ卵の洗卵時における攪拌の影響

	試験	採卵数(粒)	発眼卵数(粒)	発眼率(%)
攪拌洗卵	1	7,359	6,238	84.8
	2	7,284	5,965	81.9
無攪拌洗卵	1	7,151	7,089	99.1
	2	6,915	6,867	99.3

表 6. サケ卵のシャワー洗卵による除菌効果 (生菌数 CFU/粒)

試験	培地		
	TSA	改変サイトファーガ	KDM-2
洗卵前	$2.2 \times 10^3$	$2.6 \times 10^3$	$3.2 \times 10^3$
洗卵後	$4.0 \times 10^1$	$6.0 \times 10^1$	$2.5 \times 10^1$

サケ卵で洗卵強度試験を行った結果、シャワー器具、等張液量、洗卵時間(3L・30秒)は同様であっても、攪拌しながらシャワー洗卵した場合、伊茶仁川産サクラマスと同様にサケ卵でも発眼率が低下した。一方、無攪拌でシャワー洗卵を行った場合には99%以上の高い発眼率が得られたことから、攪拌時にザルの網目の凹凸により物理的衝撃が加わり卵を傷つけ発眼率の低下を引き起こすことが示唆された。そのため、事業規模で行ったサケの洗卵では、サクラマスより緩やかに攪拌シャワー洗卵を行ったが、サクラマスほどではないものの発眼率の低下が見られた。緩やかな攪拌であっても、卵の生残に影響するものと思われる。

防疫対策上はヨード剤添加等張液による洗卵工程を組み込む方がより有効的と考えられるが、サクラマス卵の発眼率はヨード剤洗卵区の方が低くなった。今後、ヨード剤の影響を検討すると共に上記の洗卵強度や攪拌の影響を最小限にする手法を考案する必要があると考える。

伊茶仁事業所に蓄養されたサクラマス親魚から得られた未受精卵の表面から約 $10^4$ CFU/mLの生菌が、標津川採卵場に蓄養された伊茶仁川産サケの未受精卵の表面から約 $10^3$ CFU/粒の生菌が検出された。しかしながら、冷水病原菌、BKD原因菌と思われる細菌が多い検体は見られなかった。

シャワー洗卵により、冷水病菌で $10^2$ CFU/mL程度、せつそう病菌で $10^3$ CFU/mL程度、伝染性造血器壊死症(以下、IHNV)および、サケ科魚ヘルペスウイルス病ウイルス(OMV)で $10^2$ TCDI<sub>50</sub>/mL程度の除菌・除去効果が報告されている(小原2013)。BKD原因菌への洗卵効果も同様に認められている(吉水未発表)。また、シャワー洗卵に使用する等張液の量を増加させることにより除菌効果が上がることが報告されている(小原2013)。事業規模で行った本研究でも、シャワー洗卵で約2桁の菌数の低下がみられた。無攪拌シャワー洗卵の除菌効果は、攪拌シャワー洗卵より低下すると推測されるため、効果を上げるためにはシャワー洗卵に使用する等張液量

を増加させる必要がある。未受精卵は物理的衝撃に弱く、噴出量の多い水中ポンプを使用すると、シャワーノズルからの噴出圧が高くなるため未受精卵への損傷が懸念される。そのため噴出圧を抑え、噴出量を増加させるにはシャワーヘッドの面積が大きく、穴数が多いものが適していると思われる。また、今回の試験で使用したザル底面の形状は球形であったが、ザルの底面が平らで面積の広いものを使用することにより、等張液と接触する卵の露出面積が広くなり、シャワー洗卵の除菌効果はさらに向上すると思われる。

サケ養魚池における死亡魚の観察結果では、両区とも積算温度 $750^\circ\text{C}$ ・日ころから瀕死および死亡が始まり、積算温度 $900^\circ\text{C}$ ・日までの死亡数は無洗卵区で2倍以上多く見られたが、それ以降の上まで死亡数に差が見られなくなった。両区とも積算温度 $750^\circ\text{C}$ ・日ころからの瀕死魚および死亡魚の外観症状は体表の一部に水カビが繁殖していたが、死亡数に差が見られなくなった積算温度 $900^\circ\text{C}$ ・日ころからは、腹部が膨満し、肛門部が出血している個体が多く見られた。積算温度による死亡魚の症状の違いが、なぜ起こるのか不明であるが、養魚池の累積死亡数に有意な差が出たことから、洗卵が積算温度 $900^\circ\text{C}$ ・日までの仔魚の減耗を抑制する可能性があると思われる。

今回の研究での仔魚期の死亡割合は両区とも1%程度であったが、伊茶仁事業所のサケ養魚池では20%を超える仔魚の減耗が生じる場合があり、このような状況の時、洗卵効果がどの程度あるのか、今後、検討する必要がある。

**洗卵方法の提案** サクラマスは、死亡率の高いBKDやIHNの発症がふ化場で問題となっている。発病魚が確認された場合、発病していない魚も含め、その池の魚を全数処分しなくてはならない。BKDやIHNの発症リスクを最小限にするために卵表面をしっかりと除菌する必要がある。サクラマスは採卵規模がサケより比較的小さく、洗卵作業工程を増やしても作業量的な負担が少ないことから、濯ぎ洗卵とシャワー洗卵を組み合わせることで、より高い除菌効果が得られる。サクラマスの採卵では、濯ぎ洗卵を2回行った後、攪拌をせずシャワー洗卵することを提案する。

サケは仔稚魚期の冷水病がたびたび問題となっている。また、卵膜軟化症や水腫症、養魚池の不明減耗など、これら原因の解決されていない疾病が細菌などによる垂直伝搬が原因であるならば発症の軽減を図れる可能性がある。濯ぎ洗卵を2回行った後、シャワー洗卵を行うことが望ましいが、採卵規模が大きく、洗卵は作業量的な負担が大きくなる。また、事業規模で洗卵法を普及させるためには時間短縮も重要であることから、濯ぎ洗卵を省き、等張液量を増やし、攪拌をせずシャワー洗卵することを提案する。

## 謝 辞

本試験は、一般社団法人根室管内さけ・ます増殖事業協会（根室管内増協）の全面的な協力により実施した。また、試験方法の助言を長野県水産試験場長 小原昌和博士にいただいた。本論文を取りまとめるに当たり有益なご助言をいただいた国立研究開発法人北海道区水産研究所さけます資源部 浦和茂彦博士、東北区水産研究所資源生産部 資源増殖グループ長（現所属水産庁栽培増殖課）大河内裕之氏、採卵作業に従事した根室管内増協職員ならびに根室さけます事業所職員に厚く感謝申し上げます。

## 文 献

- 小原昌和（2013）長野県内の養鱒場における等調液洗卵の実態と除菌効果。長野水試研報, **14**, 7-10.
- 小原昌和・小川 滋・笠井久会・吉水 守（2010）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。水産増殖, **58**, 37-43.
- Kohara M, Kasai H, Yoshimizu M. (2012) Intra-ovum Infection in Salmonid Eggs by Experimental Infection with Fish Pathogenic Bacteria, *Flavobacterium psychrophilum*, *Renibacterium salmoninarum* and *Aeromonas salmonicida*. *Fish Pathol.*, **47**, 49-55.

- Kumagai A, Nawata A (2010a) Mode of the intra-ovum infection of *Flavobacterium psychrophilum* in salmonid eggs. *Fish Pathol.*, **45**, 31-36.
- Kumagai A, Nawata A (2010b) Prevention of *Flavobacterium psychrophilum* vertical transmission by iodophor treatment of unfertilized eggs in salmonids. *Fish Pathol.*, **45**, 164-168.
- Matsui T, Nishizawa T, Yoshimizu M (2009) Modification of KDM-2 with culture-spent medium for isolation of *Renibacterium salmoninarum*. *Fish Pathol.*, **44**, 139-144.
- Misaka N, Suzuki K (2007) Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in chum salmon *Oncorhynchus keta* and virulence of isolated strains to salmonid fishes. *Fish Pathol.*, **42**, 201-209.
- 野川秀樹（2010）さけます類の人工ふ化放流に関する技術小史（序説）。水産技術, **3**, 1-8.
- 野村哲一・本間裕美・笠井久会・吉水 守（2002）CBB 培地による河川および沿岸で採取されたサケ（*Oncorhynchus keta*）からのせつそう病原菌 *Aeromonas salmonicida* の検出。北大水産彙報, **53**, 45-50.
- 奥田律子・西澤豊彦・吉水 守（2007）特異抗体を指標としたサクラムス増養殖における *Renibacterium salmoninarum* 感染環の推定。魚病研究, **41**, 175-178.
- 坂崎利一（1978）培地の試験法。新細菌培地学講座一上, 近代出版, 東京, p.200-220.
- Yoshimizu M, Sami M, Kimura T (1989) Survivability of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in fertilized eggs of masu (*Oncorhynchus masou*) and chum salmon (*O.keta*). *J.Aquat. Animal Health*, **1**, 13-20.

