

技術情報

サケの採卵における等張液を用いた未受精卵の洗卵の効果と方法の検討

おおもと けんいち

大本 謙一（北海道区水産研究所 さけます生産技術部 虹別さけます事業所）

はじめに

サケ科魚類のふ化場では、清浄な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搬の防除が可能となりました。しかし、病原体が卵内に侵入することで親から子に伝搬する病気として細菌性腎臓病（BKD）と冷水病があり問題となっています。最近になって、冷水病および BKD 共に原因菌の卵表面生菌数が 1,000 万個/mL 以上の場合、吸水時に原因菌が卵門から卵腔に進入し、そこで生存することにより感染が成立することが明らかにされました（Kohara et al. 2012; Kumagai and Nawata 2010a, b）。その感染を防ぐには、受精前に卵表面の菌数を下げることが重要になります（小原ら 2010; Kumagai and Nawata 2010b）。

ニジマスなど多回産卵魚の人工採卵では圧迫法で卵を搾出するため潰卵が生じ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ました。近年この方法は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と報

告され（小原ら 2010）、それによると受精前に等張液で 1 回洗浄するごとに、細菌およびウイルスの数は 1 桁減少することから、洗卵法は極めて有効な感染防除法となります。一方、増殖対象さけます類（サケ、カラフトマス、サクラマス、ベニザケ）のふ化場においては、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採卵が行われます（野川 2010）。そのため潰卵の混入が少ないこと、また採卵の規模が大きいため作業負担が過大となることから洗卵が普及していません。さけます類の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）やサケ仔稚魚で問題となっている冷水病（Misaka and Suzuki 2007）の発生の軽減が期待されるほか、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などの疾病についても、原因が細菌などの垂直感染によるものであれば発生の軽減が期待されます。

そこで今回、さけます増殖の現場での試みとして等張液洗卵を行い、その除菌程度及び受精後の発眼率、稚魚生産率等を調べ、効果的な洗卵方法について検討したので紹介します。

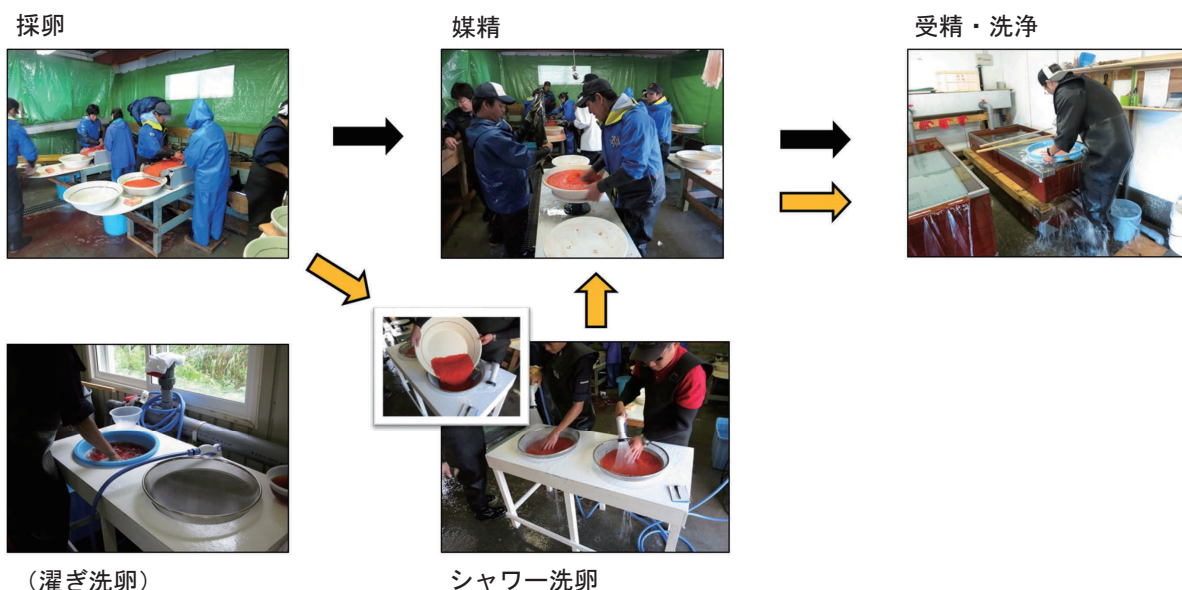


図 1. 洗卵工程。通常の採卵・受精工程（黒矢印）のうち、媒精の前に洗卵を組み入れました（橙矢印）。ただしこの試験での洗卵は、作業効率化のため濯ぎ洗卵はせず、小分けにしてシャワー洗卵（6L/分×30 秒）のみ行いました。なお、濯ぎ洗卵を行う場合は、ひたひたになる程度の等張液の中で卵を緩やかに撈拌します。

洗卵方法と作業工程

試験は標津川採卵場において採卵したサケ卵約 150 万粒を対象とし、洗卵区 2 区分、無洗卵区 2 区分を設けて、洗卵とその前後に卵表面の生菌数の測定、さらに通常管理下で発眼率、ふ化率等の追跡調査を行いました。

洗卵は通常行われる採卵・受精作業工程の一部に組み入れて事業規模で行うこととし、現在、ニジマスなどの養魚場で広く使用されている 0.9%～1.0%NaCl (塩分 99.9%以上の精製塩) 水溶液を洗浄用等張液として使用しました。洗卵法は濯ぎ洗卵を 2 回行った後、シャワー洗卵 (卵 1 万粒当たり 1～2 リットル) を 1 回行うのが一般的ですが (小原ら 2010 ; Kumagai and Nawata 2010a), サケは採卵規模が大きく、濯ぎ洗卵を行う方法では時間がかかり、事業としては馴染みにくいと考えるため、この試験ではシャワー洗卵のみを行いました。手順は、サケの未受精卵 (約 1 万 9 千粒) をステンレス製のザルに移し替え、毎分 6 リットルのシャワーで 30 秒間緩やかに攪拌しながらシャワー洗卵しました (図 1)。

結果

・除菌効果

シャワー洗卵の前後に測定した卵表面の生菌数を表 1 に示しました。CBB 培地では洗卵前の生菌

数は 1,000～10,000 個/粒のオーダーで確認され、シャワー洗卵後には 100 個/粒オーダーに減少しました。同様に、その他の培地でも洗卵前に 1,000 個/粒オーダーの生菌が確認され、シャワー洗卵後には 10 個/粒オーダーと 2 桁の減少が見られました。

・発眼率およびふ化率

洗卵区と無洗卵区におけるサケ卵の発眼率とふ化率の比較を表 2 に示しました。洗卵区における発眼率は 88.6 - 89.6%，ふ化率は 98.9 - 99.0%でした。無洗卵区は発眼率 92.0 - 92.7%，ふ化率 98.8 - 99.0%で、発眼率は無洗卵区より洗卵区の方が 2.4 - 4.1%低くなりましたが、ふ化率についてはほぼ同様の結果となりました。

・養魚池におけるふ化仔魚の死亡状況

洗卵区および無洗卵区のサケ仔魚の養魚池における積算温度別の死亡割合を図 2 に示しました。積算温度 540℃でふ化したサケの仔魚は両試験区とも積算温度 750℃頃から死亡が始まり、積算温度 900℃までの死亡数は無洗卵区で 2 倍以上多く見られましたが、それ以降は、ふ上まで死亡数の差は縮小し見られなくなりました。累積死亡割合は洗卵区が 0.99%，無洗卵区が 1.32%で、両区の間で統計学的な差が見られました (大本ら 2016)。外観症状は両区とも、積算温度 750℃頃からの瀕死魚および死亡魚の頭部、背部、尾部などの一部

表 1. シャワー洗卵の前後に測定した生菌数 (個/粒)。

①* CBB培地を用いた測定結果

試験	洗卵	総生菌数	<i>A. salmonicida</i>	他の菌
1	洗卵前	4,000	3,200	870
	洗卵後	180	91	85
2	洗卵前	22,000	22,000	500
	洗卵後	140	110	35

②* TSA, * m-Cy, * KDM-2 培地を用いた測定結果

試験	細菌数 (個/粒)		
	* TSA培地	* m-Cy培地	* KDM-2培地
洗卵前	2,200	2,600	3,200
洗卵後	40	60	25

* CBB 培地はせつそう病原菌 *Aeromonas salmonicida* , KDM-2 培地はBKD 原因菌 *Renibacterium salmoninarum* , m-Cy 培地は冷水病原菌 *Flavobacterium psychrophilum* , TSA 培地は一般細菌の菌数測定に有効な培地です。

表 2. 洗卵区と無洗卵区における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 (%)
洗卵区	1	331	297	89.6	294	99.0
	2	405	359	88.6	355	98.9
無洗卵区	1	431	397	92.0	393	99.0
	2	371	344	92.7	340	98.8

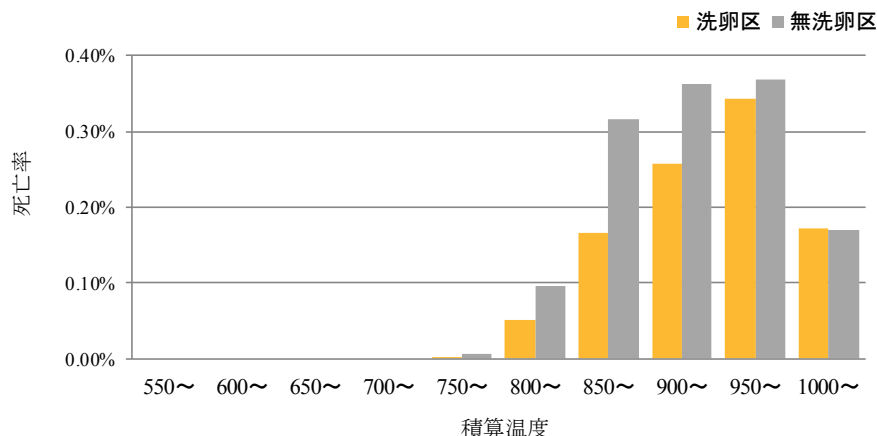


図2. 洗卵区および無洗卵区のサケ仔魚の養魚池における積算温度別の死亡割合.

に水カビが付着し、積算温度 900°C 頃から瀕死魚および死亡魚は腹部が膨満し、肛門部が出血している症状が多く見られました (写真1).

・洗卵強度の違いによる発眼率の確認

追加試験として、洗卵による卵への影響を見るため、洗卵強度を変えた試験を併せて行いました。試験した洗卵方法は、濯ぎ洗卵 2 回の後攪拌しながらシャワー洗卵する方法と、攪拌せずシャワー洗卵のみする方法で、発眼率の比較を行いました。その結果、前者の発眼率は 81.9 - 84.8% と低く、後者では発眼率が 99.1 - 99.3% と高くなりました (表3)。

洗卵効果と影響の検討

今回の試験では標津川採卵場で採卵したサケ卵表面から検出された生菌数は 1,000~10,000 個/粒ほどのオーダーで、冷水病原菌や BKD 原因菌が特に多い検体は見られませんでした。これらをシャワー洗卵することにより生菌数は元の 1/100 ほどの水準に減少しており、さけます増殖の現場においてもシャワー洗卵により 2 桁ほどの除菌効果が認められました。

また、その後の養魚池での死亡魚の観察結果では、洗卵区と無洗卵区の間で累積死亡割合に統計学的な差が認められました。両区の死亡割合に差が見られた時期は主に積算温度 900°C 頃までであり、前述の通り 900°C 頃を境に外観症状も変化しました。積算温度による症状の違いがなぜ起こるのか不明ですが、洗卵が積算温度 900°C までの仔魚の水カビ繁殖に伴う減耗の抑制には有効である可能性が考えられます。

ただし、洗卵の仕方によっては卵の発生に逆効果となるケースも見られました。緩やかに攪拌しながらシャワー洗卵した洗卵区の発眼率は、無洗卵区よりも低い結果となっています。洗卵強度を

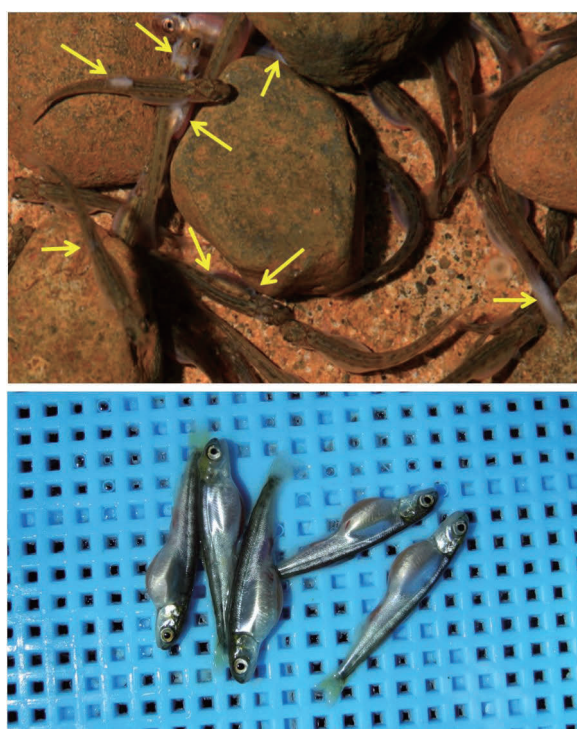


写真1. 養魚池における仔魚の症状(上:積算温度 750°C・日, 下:積算温度 900°C・日). 矢印は水カビ繁殖部位.

変え、濯ぎ洗卵 2 回の後攪拌しながらシャワー洗卵した場合、発眼率は 85% 以下となった一方、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、攪拌による物理的衝撃が発眼率の低下を招くと考えられました。除菌効果を高めようと攪拌を行うと発眼率が低下する恐れがあるため、攪拌せずにシャワー洗卵を行うことが適当と思われる。

なお、攪拌無しにシャワー洗卵の除菌効果を上げる方法の一つとして、シャワーする等張液量の増加が挙げられます。これには未受精卵へ物理的衝撃を与える噴出圧を抑えるため、面積が大きく、穴数が多いシャワーヘッドの使用が適しています。

表 3. 洗卵強度を変えた試験における発眼結果.

洗卵方法	区分	採卵数 (粒)	発眼卵数 (粒)	発眼率 (%)
濯ぎ洗卵2回+ 攪拌シャワー洗卵	1	7,359	6,238	84.8
	2	7,284	5,965	81.9
無攪拌シャワー洗卵	1	7,151	7,089	99.1
	2	6,915	6,867	99.3

また、ザルには底面が平らで面積の広いものを使用すると、シャワーの当たる卵の露出面積が広くなり、除菌効果はさらに向上すると思われます。

おわりに

このように等張液を用いた未受精卵の洗卵には防疫上のメリットが考えられます。洗卵効果のみを考慮するならば、濯ぎ洗卵を2回行った後、攪拌をせずシャワー洗卵を行うのが理想ですが(小原ら 2010; 大本ら 2016)、サケの人工ふ化放流事業は採卵規模が大きいため、洗卵作業の負担も大きくなります。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す。したがって、サケ未受精卵については当面、シャワー洗卵のみに簡略化するのが現実的と考えます。

しかし洗卵を行っても、体腔液や洗卵廃液を何も処理せずに環境中へ排水してしまえば魚病対策の意味がありません。体腔液や洗卵廃液が元で病原体がふ化場内へ侵入し魚病が発生する可能性や河川へ流出すれば野生魚に影響を及ぼす可能性があります。また精液中の病原体数が多い場合には洗卵効果が弱まります。今後の課題として体腔液、洗卵廃液の処理、精液の病原体数を下げる方法を考えなくてはなりません。

本稿では標津川採卵場で試みたサケ卵の洗卵結果を紹介させていただきました。洗卵法は今のところ、さけます増殖の現場には普及しておらず、未だ不明な点、検討すべき点もありますが、安定した種苗生産のための新しい技術情報として、本稿が少しでも参考になれば幸いです。

本試験は、一般社団法人根室管内さけ・ます増殖事業協会の全面的な協力により実施しました。試験の際、採卵作業に当たっていただいた同協会職員の皆さまに厚く感謝申し上げます。

引用文献

- 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張液洗卵法の除菌効果. 水産増殖, 58: 37-43.
- Kohara, M., Kasai, H., and 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., and Nawata, A. 2010a. Mode of the intra-ovum infection of *Fravobacterium psychrophilum* in salmonid eggs. Fish. Pathol., 45: 31-36.
- Kumagai, A., and Nawata, A. 2010b. Prevention of *Fravobacterium psychrophilum* vertical transmission by iodophor treatment of unfertilized eggs in salmonids. Fish. Pathol., 45: 164-168.
- 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): 1-8.
- 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マス増養殖における *Renibacterium salmoninarum* 感染環の推定. 魚病研究, 41: 175-178.
- 大本謙一・小野郁夫・平澤勝秋・川名守彦・吉水 守. 2016. サケとサクラマスの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. 水産技術, 8(2): 45-51.