ポビドンヨードを用いたクルマエビ 受精卵の消毒法

佐藤 純^{1*}・森 広一郎¹・西岡豊弘²
服部圭太³・岡 雅一⁴・渡辺研一⁵

(2006年 5月15日受付)

Disinfection Method for Fertilized Eggs of Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* Using Povidone-iodine

Jun Satoh^{1*}, Koh-ichiro Mori¹,
Toyohiro Nishioka², Keita Hattori³,
Masakazu Oka⁴ and
Ken-ichi Watanabe⁵

¹Aquatic Animal Health Division, Kamiura Station, National
Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research
Agency, Kamiura, Saiki, Ooita 879-2602, Japan

²Diagnosis and Training Center for Fish Diseases, National
Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research
Agency, Minami-Ise, Mie 516-0193, Japan

³Goto Station, National Center for Stock Enhancement,
Fisheries Research Agency, Tamanoura,
Nagasaki 853-0508, Japan

⁴Headquarters, Fisheries Research Agency, Yokohama,
Kanagawa 220-6115, Japan

⁵Aquatic Animal Health Division, Komame Station, National
Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research
Agency, Ootsuki, Kouchi 788-0315, Japan

(Received May 15, 2006)

ABSTRACT—Conditions suitable for disinfection of fertilized eggs of *Penaeus japonicus* using povidone-iodine were investigated. Eggs 10 h after fertilization were exposed to 0, 2.5, 5.0 and 10.0 mg/L of active iodine for 5, 10, 15 and 20 min. Hatching rate showed no significant difference between control and test groups in concentration of 2.5 mg/L of active iodine for 5 to 20 min and 5.0 mg/L for 5 to 15 min. Viable bacterial counts in these conditions decreased by more than 90% when compared

with those of control groups. There was no significant difference in the hatching rates of eggs with eight different developmental stages between control and tested groups exposed to 5.0 mg/L of active iodine for 5 min.

Key words: *Penaeus japonicus*, kuruma prawn, fertilized egg, disinfection, povidone-iodine

クルマエビ (*Penaeus japonicus*) 急性ウイルス血症 (PAV: penaeid acute viremia) は, WSS (white spot syndrome) あるいはWSD (white spot disease) と呼ばれ (ICTV8 版), 国内外を問わずクルマエビ類の増養殖に大きな被害を与えている¹⁾。この疾病は, 国内では1993年に中国から購入したクルマエビ種苗を導入した養殖場に初めて発生し²⁾, 以後西日本の各地に伝播し, 被害が拡大した。種苗生産過程における本疾病の防除対策として, 親エビからの垂直感染を防止するためにヨード剤による受精卵消毒が栽培漁業センターなどで広く実施されている^{3,4)}。また, ウシエビにおいては, WSSV (White spot syndrome virus) が卵巣卵内に存在すると卵の発育が阻害されて, 垂直伝播が起これないといわれているが, 卵およびふ化幼生については洗浄または消毒を実施することが有効な垂直伝播の防除になるとしている⁵⁾。WSSVは, 有効ヨウ素濃度 2.5 mg/L 海水で10分間⁶⁾, 2.5 mg/L 以上では0.2分以内, 1.0 mg/L では2分以内⁷⁾ に不活化されるとの報告がある。受精卵の消毒による垂直感染防除効果を得るためには, 病原体の消毒剤に対する感受性の検討に加え, 受精卵の消毒処理に対する耐性を明らかにすることが必要である。さらに種苗生産施設で卵消毒を行う場合には, ふ化率に影響が少ない範囲内で消毒する必要がある。ポビドンヨード剤が海産魚介類の受精卵消毒剤として未承認であるため, 水産総合研究センターでは, その効能拡大を最終的な目的として受精卵の消毒条件の把握に関する実験を実施しているが, 本報告では, ポビドンヨードがクルマエビ受精卵に毒性を及ぼす濃度と処理時間を卵発生段階毎に検討するとともに, 受精卵の一般生菌数の変化からヨード剤の殺菌効果についても検討した。

ポビドンヨード剤として水産用イソジン液 (明治製菓) を用い, 水産総合研究センター上浦栽培技術開発センターおよび五島栽培漁業センターの濾過海水を用いて所定濃度に希釈して消毒液 (以下, ヨード液) を作製した。

有効ヨウ素濃度と消毒時間が受精卵のふ化に与える影響と消毒効果を把握するための指標として用いられている生菌数の減少効果⁸⁾ については, 以下の方法で試験を行った。種苗生産における卵消毒実施時期を考慮して, 水温22°Cで受精後 6 ~ 9 時間経過して胚に環状帯が形

¹ (独) 水産総合研究センター 養殖研究所 病害防除部 (上浦栽培技術開発センター)

² (独) 養殖研究所 魚病診断・研修センター

³ (独) 水産総合研究センター 五島栽培漁業センター

⁴ (独) 水産総合研究センター 本部

⁵ (独) 水産総合研究センター 養殖研究所 病害防除部 (上浦栽培技術開発センター古満目分場)

* Corresponding author

E-mail: junsatoh@fra.affrc.go.jp

成された以降のステージの受精卵を用いた。採卵には捕獲直後の天然クルマエビ（以下、親エビ）を用い、異なる3個体の親エビから得られた受精卵を供試した。それぞれの親エビの全長、体重および産出卵の受精率は、A個体 24.9 cm, 104.0 g, 95.7%, B個体 21.2 cm, 113.4 g, 98.2%およびC個体 24.5 cm, 107.2 g, 97.5%であった。親エビは、個体毎に 500 L ポリエチレン水槽に収容し、微通気、無注水で産卵させた。水温は、加温装置を用い22°Cに維持した。産卵の確認された水槽から卵を集め、75 L のプラスチック容器（三甲）に 0.02 g/L (2,000 個/L) となるように収容した。ヨード液は、有効ヨウ素濃度 2.5, 5.0 および 10.0 mg/L の3濃度とし、それぞれの濃度で 5, 10, 15 および 20 分間消毒した。消毒は、目的のステージに達した各受精卵 0.6 g を所定濃度に希釈したヨード液 1.8 L に浸漬して行った。所定時間に到達した段階で、直径 6 cm, 深さ 2 cm, 目合い 200 μ m のネット（ニッタル 7xx-200）に取り出した。生菌数の測定に供試するため 0.1 g の受精卵を取り、1 mL の 2% ペプトン水でヨードの反応を止めた。また、受精卵 0.002 g をろ過海水の流水中（600 mL/min）に置いたネットに収容して3分間洗浄し、新しいシャーレ（直径 9 cm, 深さ 1.5 cm, 水量 13 mL）に移して22°Cの室内でふ化させた。対照区は、ろ過海水に所定時間浸漬した。ふ化を確認後ノープリウス 2 期⁹⁾に到達した段階でルゴール液により固定し、未ふ化生残卵（発生は正常に進んでいるがふ化していない受精卵）、死卵、正常ノープリウス、死亡ノープリウスおよび異常ノープリウスを実体顕微鏡下で計数し、ふ化率（[正常ノープリウス数/総数]×100）を算出した。

生菌数は、滅菌ペプトン水で洗浄した受精卵に9倍量の滅菌人工海水を加えて磨砕し、10倍希釈液列を作製し、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）平板表面に塗抹後、25°C で5日間培養してコロニー数を測定した。

有効ヨウ素濃度 2.5 mg/L で 5～20 分間消毒した場合および 5.0 mg/L で 5, 10 および 15 分間消毒した場合のふ化率は、対照との間に有意差はなかった ($p>0.05$; Fisher's PLSD による多重比較検定)ものの、種苗生産を成功させるためには経験的に50%以上のふ化率の受精卵を供試することが望まれることから、いずれの濃度においても5分間以内に消毒を終える必要があると考えられた。有効ヨウ素濃度 5.0 mg/L で20分および 10.0 mg/L で 5～20 分間消毒した場合には、ふ化率が対照区のそれと比較して有意 ($p<0.01$ または $p<0.05$) に低下した (Fig. 1)。このときすべての実験区の生菌数は約 1 桁減少し、対照に比較して有意に減少した ($p<0.01$; Fisher's

Fig. 1. Sensitiveness of kuruma prawn eggs (1st antenna is formed above the 2nd appendage stage) on treatment of povidon-iodine. Experiments in triplicate were conducted for 5, 10, 15 and 20 min. Values are means and standard deviations. Significant differences from the control values are indicated by * ($p<0.05$) or ** ($p<0.01$).

▨; 5 min treatment, □; 10 min treatment, ▤; 15 min treatment, ■; 20 min treatment

Fig. 2. Viable bacterial counts of iodine treated eggs (means and standard deviations). Significant differences from the control values are indicated by ** ($p<0.01$).

▨; no treatment, □; 5 min treatment, ▤; 10 min treatment, ■; 20 min treatment

PLSD による多重比較検定) (Fig. 2)。

次いで 2.5 mg/L のヨード液を作製し、作製直後と20分経過後にヨード剤濃度を測定した。また、受精卵を今回の試験条件である 0.33 g/L 濃度となるように 2.5 mg/L のヨード液に収容し、20分間消毒処理を行った後、ヨウ素濃度を測定した（日本工業規格 (JIS k 0102 工場排水試験方法33.3 残留塩素)⁹⁾を改変)。その結果、作製直後のヨード液のヨウ素濃度に対し、受精卵を入れない場合の減衰率は11.5%±1.65, 受精卵を入れた場合の減衰率は19.7%±2.69となった。検定の結果 (Student's *t* 検定), 有意差は認められなかった ($p>0.05$) ことから、今回の試験条件では、受精卵の有無によるヨウ素の減衰

はなかったものと考えられた。

さらに卵発育段階ごとの受精卵のヨード剤に対する感受性試験を、前記試験と同様に捕獲直後の親エビから自然産卵によって得た受精卵を用いて実施した。供試した3個体の親エビの全長、体重および産出卵の受精率は、D 個体 22.2 cm, 90.0 g, 92.3%, E 個体 20.2 cm, 88.0 g, 92.0% および F 個体 20.8 cm, 77.0 g, 90.8% であった。産卵方法は前述の方法とした。産卵が確認された水槽から直ちに卵を採取し、卵管理水槽として用いた75Lのプラスチック容器に0.03 g/L となるように収容し、死卵などの異常卵を取り除くことなく管理した。消毒試験には、卵管理水槽から所定のステージに90%以上が達したことを確認した受精卵の0.002 g をランダムに直径6 cm, 深さ2 cm, 目合い200 μ m のネット（ニッタル7xx-200）に取り、有効ヨウ素濃度5 mg/L のヨード液6 mL の入ったシャーレ（直径9 cm, 深さ1.5 cm）に収容し、5分間の消毒処理を行った。対照区として、ろ過海水を用いて同じ処理を行う区を設けた。さらに、未処理区を設けた。5分後、受精卵を流水のろ過海水中（600 mL/分）に置いたネットに収容して3分間洗浄し、新しいシャーレ（前出）に移して22°Cの室内でふ化させた。受精卵の発育段階は、2細胞期、128細胞期、胚に環状帯出現期、第1触角の始痕の形成期、附属肢の分叉肢の形成

Fig. 3. Influence of povidon-iodine treatment on hatching rate at different developmental stages in kuruma prawn. Eggs were treated with 5 mg/L active iodine for 5 min. Eggs in the control of each developmental stage were incubated in sea water for 5 min. Experiments were done three times and each bar represents the mean value and standard deviations. Developmental stages are categorized as : A; 2 or 4 cell stage, B; 128 cell stage, C; embryo with a ring-shaped middle part, D; embryo with 1st antenna formed above 2nd appendage, E; embryo with biramous 2nd and 3rd appendages, F; embryo with appendages with exopodite and endopodite, G; egg containing nauplius at an early developmental stage, H; egg containing nauplius at a later developmental stage. Significant difference from the non-treatment group is indicated by* ($p < 0.05$). Non-treatment group represent eggs maintained in the original tank throughout the experiment period.

期、外肢および内肢の形成期、卵内ノープリウス初期および卵内ノープリウス後期の8期とした¹⁰⁾。なお、試験水温は、加温装置を用いて21.8~22.4°Cに保った。

ふ化率の算出は前述の方法で行った。128細胞期以外のふ化率は、すべて80%以上の値を示したが、128細胞期におけるふ化率は、対照区およびヨード区でそれぞれ63.5%±21.4および71.6%±23.3となった。128細胞期の対照区のふ化率は、未処理区と比較して有意 ($p < 0.05$, Dunnett 法による多重比較検定) に低下した。ヨード区のふ化率は未処理区と比較して有意差は認められなかった (Fig. 3)。これらのことから、この8ステージに対してヨード剤による消毒の影響はないものと考えられる。しかしながら、128細胞期におけるハンドリングの影響は、他の7ステージより大きいことがわかった。128細胞期は水温22°Cにおいては産卵2時間後に到達するが、一般的な種苗生産現場では夜間産卵するクルマエビの採卵は朝行われるため、消毒時にはすでにこの時期は経過して、実際には問題ないと考えられる。しかし、ハンドリングの影響を受け易いこの時期での消毒の実施は避けるべきと考えられる。

ヨード剤は有効ヨウ素濃度5 mg/L で10分まではクルマエビ受精卵に毒性がないとする報告¹¹⁾の他、有効ヨウ素濃度5 mg/L で5分間の卵消毒で安全性を確認した報告^{*1}などがあり、これらと本実験結果は大きく変わらないことが確認された。受精卵に対する安全性が確認された有効ヨウ素濃度2.5および5.0 mg/L で5分間の消毒処理により、本報における生菌数の減少率は90%以上であり、ある程度の殺菌効果が認められた。一方、WSSVは、有効ヨウ素濃度2.5 mg/L で10分間⁶⁾や2.5 mg/L 以上で0.2分以内、1.0 mg/L では2分以内⁷⁾で不活化されると報告されており、ヨード剤による安全な消毒条件はウイルスの不活化も期待できると考えられる。

これらの結果からヨウ素の減衰が起こらないことが確認された卵密度 (0.33 g/L) で、かつウイルスの不活化が確認されている有効ヨウ素濃度2.5~5.0 mg/L の海水に、クルマエビ受精卵を5分間浸漬することは、安全かつ効果の期待できる卵消毒方法であると考えられた。

謝 辞

本稿をとりまとめるにあたり貴重なご助言と御校閲を賜った北海道大学大学院の吉水 守教授に御礼申し上げます。また、本試験を実施するに際し、種々ご配慮、ご協力を頂いた水産総合研究センター栽培漁業部の皆様ならびに上浦栽培技術開発センター、五島栽培漁業センターの職員の方々に感謝致します。

*1 虫明敬一・森 広一郎・有元 操・佐藤 純・今泉圭之輔 (1998) クルマエビ種苗生産における PAV 防除対策の現状、平成10年度日本魚病学会春期大会講演要旨集, p. 20.

文 献

- 1) Lightner, D. V. (1996): Special publication of the World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. 2) 中野平二・河邊博・梅沢 敏・桃山和夫・平岡三登里・井上 潔・大迫典久 (1994): 魚病研究, **29**, 135-139. 3) Mushiake, K., K. Shimizu, J. Satoh, K. Mori, M. Arimoto, S. Ohsumi and K. Imaizumi (1999): *Fish Pathol.*, **34**, 203-207. 4) 佐藤 純・虫明敬一・森 広一郎・有元 操・今泉圭之輔 (2003): 栽培技研, **30**, 101-109. 5) Lo, C. F., C. H. Ho, C. H. Chen, K. F. Liu, Y. L. Chiu, P. Y. Yeh, S. E. Peng, H. C. Hsu, H. C. Liu, C. F. Chang, M. S. Su, C. H. Wang and G. H. Koh (1997): *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 53-72. 6) 中野平二・平岡三登里・鮫島守・木村武志・桃山和夫 (1998): 魚病研究, **33**, 65-71. 7) 桃山和夫・谷村利克 (2004): 山口県水産研究センター研究報告, **2**, 117-123. 8) 笠井久会・渡辺研一・吉水 守 (2001): 日水誌, **67**, 222-225. 9) 日本規格協会編 (2005): 日本規格協会, 東京, pp. 668-669. 10) 藤永元作 (1935): 早稲水産研究所報告, **1**, 1-51. 11) 桃山和夫 (1990): 山口県内海水産試験場報告, **18**, 50-54.