

オゾン水によるアユ受精卵の冷水病原菌消毒の可能性

中居 裕, 景山 哲史

Potentiality as disinfection of ayu fertilized egg in ozonated water
for *Flavobacterium psychrophilum*

YUTAKA NAKAI AND TETSUSHI KAGEYAMA

アユの冷水病は、1987年に徳島県で発病が確認¹⁾されて以来、現在では全国に蔓延し、アユ養殖業に大きな被害をもたらしている。²⁾

冷水病感染耐過アユ由来の卵は、冷水病原菌に汚染されているものの、ポビドンヨード製剤および過酸化水素水による卵表面消毒により冷水病原菌が分離されなくなることから、冷水病原菌は卵表面には存在するものの、卵内には存在しない可能性が指摘されている。³⁾ このことは、アユ人工種苗生産施設において、卵表面を消毒することにより冷水病原菌未感染種苗を生産できる可能性を示している。

本研究では、未だ実用化されていないアユ卵消毒技術を開発する目的で、マツカワ種苗生産で実用化されているオゾン水による卵消毒技術⁴⁾がアユ卵に適用可能かどうかを検討した。

方 法

1 冷水病原菌のオゾン水に対する感受性

- 1) 供試菌株：CS-1株（1995年に12.9gのアユ病魚より分離）
- 2) 菌液調製：改変サイトファーガ液体培地⁵⁾（以下MCYB）で15℃・3日間静置培養し、菌液を10000rpm、10分間の遠心沈殿後、上清を捨て、それと同量の滅菌蒸留水に再懸濁したものを供試菌液とした。供試前の菌数は 6.4×10^7 CFU/mLであった。
- 3) オゾン発生装置：ZR-03ML（ロキテクノ社製）
なお、オゾン生成に必要な酸素は純酸素を用いた。
- 4) オゾン感作：

1Lガラスビーカーに滅菌蒸留水1Lを入れ、マグネチックスターラーで攪拌しながらオゾンを通気して、あらかじめ所定のオゾン濃度となる時間にオゾン通気を止め、それと同時に菌液1mLを接種した。所定時間毎にビーカーから1mL採取して、9mLの改変MCYBに接種後、15℃で培養した。なお、オゾン濃度測定はヨウ素

滴定法⁶⁾により、菌液接種直前に10mL採水することにより行った。

また、対照区はオゾン通気無しの滅菌蒸留水1Lで行った。

- 5) 効果判定：培養7日後の供試菌の増殖の有無により効果判定を行った。なお、本試験の検出限界は1CFU/mLである。

2 アユ受精卵のオゾン水に対する安全性の検討

2-1 第1回試験

1) 供試魚

雄親魚：両側回遊系親魚（交配1代目：以下同じ）5尾（平均体重：41.1g）より採精した。採取した精液をその20倍量のニジマス用人工精漿⁷⁾で希釈し、10℃で培養した。1時間後、その運動性を確認した。

雌親魚：両側回遊系親魚6尾（平均体重：37.5g）より採卵し、重量換算で採取した卵の2倍量のコイの受精液（0.4%NaCl・0.3%尿素）と混合後、卵の10%（重量比）の培養精液で受精させた。1粒当たりの卵重量は0.40mgであった。

2) オゾン水作製

オゾン発生装置 (ZR-03ML : ロキテクノ社製) とオゾン反応槽 (荏原実業株式会社製) を組み合わせた装置で、流水のオゾン水を作製した。用水は井戸水、オゾン生成に必要な酸素は純酸素を用いた。

3) オゾン濃度および作用時間

オゾン濃度は1mgO₃/L、2mgO₃/L、3mgO₃/Lおよび4mgO₃/Lとし、作用時間はそれぞれのオゾン濃度で、5分、10分および15分で行った。また、対照区は無処理とした。

4) 処理方法

50Lコンテナの中にスライドグラスを並べ、それに飼育水を張った。その後、受精卵を水中に投入し、水を攪拌して、卵がスライドグラスに1枚につき150粒程度となるように付着させた。吸水完了 (1時間) 後、所定濃度のオゾン水 (流水) 中に所定時間作用させた。なお、オゾン濃度はヨウ素滴定法⁹⁾ で作用直前に測定した。また、15分作用終了後にも測定し、所定のオゾン濃度が維持されているかを確認した。その後、発眼期まで飼育して、発眼率を求めた。なお、発眼卵は飼育を継続し、ふ化率及び奇形率 (肉眼で異常とわかるものを奇形魚とした) を求めた。対照区は飼育水 (井戸水) 浸漬とした。1区につきスライドグラスを3枚使用した。

5) 飼育

飼育水温は、急激な水温変化を防ぐためにヒーターによって加温して15.0~17.0℃に維持した。発眼期までは流水で飼育し、ふ化2~3日前から広口ポリ瓶 (250 mL) の中に飼育水を満たし、その中にスライドグラスを立てて止水で飼育した。ふ化飼育水温を一定に保つために飼育水が広口ポリ瓶の外側を流れるようにした。

なお、水カビ寄生防止のため、マラカイトグリーン3ppm・1時間浴を受精後、適宜行った。

6) ふ化仔魚及び奇形魚の計数

ふ化率及び奇形率の計数に際しては、最終濃度1%となるようホルマリンを段階的に飼育水に滴下して、ふ化仔魚を緩慢に死亡させた。死亡を確認後、最終濃度5%となるようにホルマリンを追加して固定後、計数した。なお、対照区及び各試験区の発眼卵数やふ化尾数については、 χ^2 検定により統計処理を行った。

2-2 第2回試験

1) 供試魚

雄親魚 : 両側回遊系親魚3尾 (平均体重 : 41.8 g) より採精した。その他は2-1と同様である。

雌親魚 : 両側回遊系親魚5尾 (平均体重 : 42.8 g)

より採卵し、重量換算で採取した卵の2倍量のコイの受精液 (0.4%NaCl・0.3%尿素) と混合後、卵の10% (重量比) の培養精液で受精させた。1粒当たりの卵重量は0.36 mgであった。

2) オゾン水作製 : 2-1と同様である。

3) オゾン濃度および作用時間

以下のように設定した。

0.5mgO₃/L 15分・30分・45分・60分

1.0mgO₃/L 15分・30分・45分・60分

対照区 : 飼育水60分

4) 処理方法 : 2-1と同様である。ただし、1区につきスライドグラスを4枚使用した。

5) 飼育

飼育水温を16.0~17.0℃に維持した以外は2-1と同様である。

6) ふ化仔魚及び奇形魚の計数

2-1と同様である。

3) アユ卵表面に人為的に付着させた冷水病原菌に対するオゾン水処理の実効性についての検討

3-1 第1回試験

1) 供試魚

雄親魚 : 両側回遊系親魚1尾 (体重 : 28.45g) より採精した。採精時には親魚の体表を紙タオルを用いて水、粘液をできる限り拭き取り、総排泄孔付近をアルコール綿で拭き、精子に糞等が混じらないように注意深く採精した。採取した精液の0.05mLを改変サイトファーガ寒天培地⁹⁾ (以下MCYA) に接種し、精液中の冷水病菌保菌状況を調べた。また、濾過滅菌した20倍量のニジマス用人工精漿⁹⁾ で無菌的に希釈し、10℃で培養した。そして1時間後、その運動性を確認した。また、採精を行った親魚それぞれの腎臓からMCYAを用いて常法に従って菌分離を行った。

雌親魚 : 両側回遊系親魚1尾 (体重 : 38.02g) より採卵した。採卵時は採精時と同様にできる限り無菌的に採卵作業を進めた。供試卵は重量換算で採取した卵の2倍量の濾過滅菌したコイの受精液 (0.4%NaCl・0.3%尿素) と混合後、これも重量換算で卵の10%の培養精液をクリーンベンチ内で受精させた。また、別途採取した未受精卵0.1gをエッペ

ンドルフチューブに秤り取り、ペレットミキサーを用いて磨砕し、MCYB0.9mLで懸濁した。この混合液（原液）を0.1mLをMCYAに接種した。また、受精卵についても受精後0.1gを秤り取り、未受精卵同様に菌分離を行った。採卵に用いた親魚についても雄親魚同様に腎臓から菌分離を行った。

2) オゾン水作製

オゾン発生装置（ZR-03ML：ロキテクノ社製）とオゾン反応槽（荏原実業株式会社製）を組み合わせた装置で、流水のオゾン水を作製した。用水は井戸水、オゾン生成に必要な酸素は純酸素を用いた。

3) オゾン濃度および作用時間

以下のように設定した。

1mgO₃/L 1分・3分・5分・10分

2mgO₃/L 1分・3分・5分・10分

対照区：無処理

4) 処理方法

まず滅菌したステンレスバットに滅菌井戸水を入れ、ガラス棒（直径2mm、長さ7cm）を必要量投入した。滅菌井戸水には10⁴CFU/mLのとなるよう冷水病原菌（CS-1）を接種した。その後、受精卵をガラス棒へ付着させた。吸水完了（1時間）後、所定濃度のオゾン水（流水）中に所定時間作用させた。なお、オゾン濃度はヨウ素滴定法⁹⁾で作用直前に測定した。また、10分作用終了後にも測定し、所定のオゾン濃度が維持されているかを確認した。

なお、オゾン水0.1mLをMCYB10mLに接種して、オゾン水中の細菌の有無を確認した。オゾン処理は1濃度・1作用時間当たり2本のガラス棒を用いて行った。所定時間終了後、10mLのMCYBにて作用停止を行った。その後、ガラス棒2本は別々のMCYB10mLに投入し、卵数を計数するとともに15℃のインキュベーターに収容した。なお、すべての分離培養は培養温度15℃で培養を行い、冷水病菌の増殖状況を2週間観察した。また、オゾン水処理以外のすべての作業は無菌的に行うためにクリーンベンチ内で行った。

5) 処理方法

MCYBによって菌分離を行い、2週間以上の観察期間を経たのち菌の増殖が認められない試験区は過酸化水素製剤による消毒処理の効果が認められたものとした。また、細菌の増殖が認められた場合には、PCR⁹⁾により冷水病原菌の確認を行った。

3-2 第2回試験

1) 供試魚

雄親魚：両側回遊系親魚3尾（平均体重：29.6g）より採精した。その他は3-1と同様である。

雌親魚：両側回遊系親魚3尾（平均体重：36.1g）より採卵した。

採卵は個別別に行い滅菌した薬じを用いて約1gずつを混合して供試卵とした。その他は3-1と同様である。

2) オゾン水作製：3-1と同様である。

3) オゾン濃度および作用時間

以下のように設定した。

0.5mgO₃/L 15分・30分・45分・60分

1.0mgO₃/L 15分・30分・45分・60分

対照区：無処理

4) 処理方法：3-1と同様である。

5) 処理方法

その他は3-1と同様である。ただし、PCRは別の方法⁹⁾で行った。

3-3 第3回試験

1) 供試魚

雄親魚：両側回遊系親魚3尾（平均体重：60.3g）より採精した。その他は3-1と同様である。

雌親魚：両側回遊系親魚3尾（平均体重：67.3g）より採卵した。その他は3-1と同様である。

2) オゾン水作製：3-1と同様である。

3) オゾン濃度および作用時間

以下のように設定した。

0.5mgO₃/L 1分・3分・5分

1.0mgO₃/L 1分・3分・5分

対照区：無処理

4) 処理方法

3-1と同様である。ただし、吸水完了後、滅菌1/7アレン人工海水（処方：飼育水1L、NaCl 4.23gMgCl₂ 0.383g KCl 0.116g CaCl₂ 0.18g MgSO₄ 0.526g NaHCO₃ 0.033g）に40分、滅菌飼育水に40分浸漬した後、オゾン水浸漬処理を行った。

5) 処理方法：3-2と同様である。

結果

1 冷水病原菌のオゾン水に対する感受性

結果を第1表に示した。すべてのオゾン水作用区で供試菌は殺菌された。

2 アユ受精卵のオゾン水に対する安全性の検討

2-1 第1回試験

結果を第2表に示した。

1mgO₃/L浸漬区では10分区分の発眼卵数および5分区分の正常魚ふ化尾数で統計学的有意差(p<0.05)が認められた。2mgO₃/L浸漬区以上の高濃度浸漬区では、2mgO₃/L・5分区分以外のほとんどの区で統計学的有意差が認められた。ただし、奇形魚ふ化尾数については、2mgO₃/L・5分区分以外の区で統計学的有意差が認められなかった。

第1表 冷水病原菌のオゾン水に対する感受性

オゾン濃度 (mgO ₃ /L)	作用時間(秒)		
	15秒	30秒	60秒
0 (対照区)	NT	NT	—
0.5	—	—	—
1.13	—	—	—

—：供試菌増殖 +：供試菌増殖せず
NT：未実施
供試時菌濃度：6.4×10⁴CFU/mL

第2表 アユ受精卵のオゾン水に対する安全性 (第1回試験)

濃度(mgO ₃ /L)	時間	供試卵数	発眼卵数	発眼率(%) ^{*1}	ふ化尾数	ふ化率(%) ^{*2}	正常魚ふ化尾数	正常魚ふ化率(%) ^{*3}	奇形魚ふ化尾数	奇形魚ふ化率(%) ^{*4}	
1(0.94)*5	5分-1	155	141	91.0	127	90.1	127	90.1	0	0.0	
	5分-2	155	139	89.7	100	71.9	99	71.2	1	0.7	
	5分-3	173	143	82.7	133	93.0	133	93.0	0	0.0	
	計	483	423	87.6	360	85.1	359*7	84.9	1	0.2	
	10分-1	193	163	84.5	142	87.1	140	85.9	2	1.2	
	10分-2	157	138	87.9	136	98.6	134	97.1	2	1.4	
	10分-3	157	127	80.9	118	92.9	112	88.2	6	4.7	
	計	507	428*7	84.4	396	92.5	386	90.2	10	2.3	
	15分-1	145	132	91.0	124	93.9	120	90.9	4	3.0	
	15分-2	171	147	86.0	140	95.2	139	94.6	1	0.7	
	15分-3	182	160	87.9	151	94.4	149	93.1	2	1.3	
	計	498	439	88.2	415	94.5	408	92.9	7	1.6	
	2(2.10)*5	5分-1	129	110	85.3	105	95.5	98	89.1	7	6.4
		5分-2	123	104	84.6	94	90.4	91	87.5	3	2.9
5分-3		114	101	88.6	90	89.1	90	89.1	0	0.0	
計		366	315	86.1	289	91.7	279	88.6	10*7	3.2	
10分-1		155	125	80.6	111	88.8	111	88.8	0	0.0	
10分-2		152	132	86.8	69	52.3	69	52.3	0	0.0	
10分-3		162	137	84.6	128	93.4	127	92.7	1	0.7	
計		469	394*7	84.0	308	78.2	307*8	77.9	1	0.3	
15分-1		161	105	65.2	85	81.0	82	78.1	3	2.9	
15分-2		146	119	81.5	89	74.8	88	73.9	1	0.8	
15分-3		139	109	78.4	83	76.1	82	75.2	1	0.9	
計		446	333*8	74.7	257	77.2	252*8	75.7	5	1.5	
3(2.97)*5		5分-1	128	112	87.5	99	88.4	97	86.6	2	1.8
		5分-2	137	113	82.5	107	94.7	105	92.9	2	1.8
	5分-3	183	153	83.6	146	95.4	144	94.1	2	1.3	
	計	448	378*7	84.4	352	93.1	346	91.5	6	1.6	
	10分-1	152	132	86.8	126	95.5	124	93.9	2	1.5	
	10分-2	149	88	59.1	71	80.7	68	77.3	3	3.4	
	10分-3	174	106	60.9	77	72.6	76	71.7	1	0.9	
	計	475	326*8	68.6	274	84.0	268*8	82.2	6	1.8	
	15分-1	126	104	82.5	87	83.7	86	82.7	1	1.0	
	15分-2	135	91	67.4	79	86.8	79	86.8	0	0.0	
	15分-3	153	74	48.4	67	90.5	67	90.5	0	0.0	
	計	414	269*8	65.0	233	86.6	232*8	86.2	1	0.4	
	4(3.99)*5	5分-1	131	118	90.1	116	98.3	115	97.5	1	0.8
		5分-2	144	122	84.7	116	95.1	115	94.3	1	0.8
5分-3		154	95	61.7	93	97.9	89	93.7	4	4.2	
計		429	335*8	78.1	325	97.0	319*7	95.2	6	1.8	
10分-1		185	143	77.3	106	74.1	105	73.4	1	0.7	
10分-2		169	64	37.9	33	51.6	33	51.6	0	0.0	
10分-3		158	86	54.4	58	67.4	58	67.4	0	0.0	
計		512	293*8	57.2	197	67.2	196*8	66.9	1	0.3	
15分-1		146	18	12.3	10	55.6	10	55.6	0	0.0	
15分-2		128	37	28.9	17	45.9	17	45.9	0	0.0	
15分-3		166	66	39.8	36	54.5	36	54.5	0	0.0	
計		440	121*8	27.5	63	52.1	63*8	52.1	0	0.0	
対照区		15分-1	170	151	88.8	—*6	—*6	—*6	—*6	—*6	—*6
		15分-2	141	121	85.8	106	87.6	106	87.6	0	0.0
	15分-3	144	136	94.4	130	95.6	128	94.1	2	1.5	
	計	455	408	89.7	236	91.8	234	91.8	2	0.8	

*1 発眼率=(発眼卵数/供試卵数)×100

*2 ふ化率=(ふ化尾数/発眼卵数)×100

*3 正常魚ふ化率=ふ化率-奇形魚ふ化率

*4 奇形魚ふ化率=(ふ化時の奇形魚尾数/発眼卵数)×100

*5 ()内は実測値

*6 飼育途中の事故により計数不能

*7 : χ²検定によりp>0.05

*8 : χ²検定によりp>0.01

2-2 第2回試験

結果を第3表に示した。

0.5mgO₃/L浸漬区では60分区分の正常魚ふ化尾数以外は統計学的有意差が認められなかった。1.0mgO₃/L浸漬区では、30分区分以外は統計学的有意差が認められた。ただ

し、奇形魚ふ化尾数については、1.0mgO₃/L・15分区分以外の区では統計学的有意差が認められなかった。

なお、1.0mgO₃/L・60分浸漬区では、発眼卵の卵膜が軟弱化しているのが観察された。

3 アユ卵表面に人為的に付着させた冷水病原菌に対す

第3表 アユ受精卵のオゾン水に対する安全性 (第2回試験)

濃度(mgO ₃ /L)	時間	供試卵数	発眼卵数	発眼率(%) ^{*1}	ふ化尾数	ふ化率(%) ^{*2}	正常魚ふ化尾数	正常魚ふ化率(%) ^{*3}	奇形魚ふ化尾数	奇形魚ふ化率(%) ^{*4}	
0.5 (0.53) ^{*5}	15分-1	157	136	86.6	123	90.4	122	89.7	1	0.7	
	15分-2	183	162	88.5	147	90.7	143	88.3	4	2.5	
	15分-3	168	153	91.1	144	94.1	142	92.8	2	1.3	
	15分-4	174	157	90.2	148	94.3	144	91.7	4	2.5	
	計	682	608	89.1	562	92.4	551	90.6	11	1.8	
	30分-1	131	112	85.5	103	92.0	102	91.1	1	0.9	
	30分-2	123	114	92.7	112	98.2	110	96.5	2	1.8	
	30分-3	134	120	89.6	119	99.2	118	98.3	1	0.8	
	30分-4	136	122	89.7	117	95.9	115	94.3	2	1.6	
	計	524	468	89.3	451	96.4	445	95.1	6	1.3	
	45分-1	138	128	92.8	112	87.5	109	85.2	3	2.3	
	45分-2	147	129	87.8	118	91.5	117	90.7	1	0.8	
	45分-3	161	149	92.5	144	96.6	137	91.9	7	4.7	
	45分-4	157	141	89.8	129	91.5	129	91.5	0	0.0	
	計	603	547	90.7	503	92.0	492	89.9	11	2.0	
	60分-1	140	126	90.0	117	92.9	114	90.5	3	2.4	
	60分-2	151	136	90.1	125	91.9	119	87.5	6	4.4	
	60分-3	142	128	90.1	114	89.1	110	85.9	4	3.1	
	60分-4	114	98	86.0	88	89.8	87	88.8	1	1.0	
	計	547	488	89.2	444	91.0	430 ^{*6}	88.1	14	2.9	
	対照区	60分-1	164	149	90.9	140	94.0	135	90.6	5	3.4
		60分-2	146	131	89.7	128	97.7	122	93.1	6	4.6
		60分-3	146	132	90.4	127	96.2	124	93.9	3	2.3
		60分-4	168	152	90.5	139	91.4	138	90.8	1	0.7
計	624	564	90.4	534	94.7	519	92.0	15	2.7		
1.0 (1.09) ^{*5}	15分-1	131	120	91.6	115	95.8	112	93.3	3	2.5	
	15分-2	171	149	87.1	145	97.3	144	96.6	1	0.7	
	15分-3	178	156	87.6	153	98.1	152	97.4	1	0.6	
	15分-4	152	131	86.2	126	96.2	123	93.9	3	2.3	
	計	632	556 ^{*6}	88.0	539	96.9	531 ^{*7}	95.5	8 ^{*6}	1.4	
	30分-1	157	142	90.4	140	98.6	139	97.9	1	0.7	
	30分-2	144	135	93.8	135	100.0	133	98.5	3	2.2	
	30分-3	157	145	92.4	145	100.0	145	100.0	0	0.0	
	30分-4	156	147	94.2	144	98.0	144	98.0	0	0.0	
	計	614	569	92.7	564	99.1	561	98.6	4	0.7	
	45分-1	151	101	66.9	93	92.1	92	91.1	1	1.0	
	45分-2	142	91	64.1	85	93.4	83	91.2	2	2.2	
	45分-3	167	99	59.3	96	97.0	95	96.0	1	1.0	
	45分-4	155	131	84.5	111	84.7	111	84.7	0	0.0	
	計	615	422 ^{*7}	68.6	385	91.2	381 ^{*7}	90.3	4	0.9	
	60分-1	167	148	88.6	145	98.0	144	97.3	1	0.7	
	60分-2	130	95	73.1	87	91.6	85	89.5	2	2.1	
	60分-3	137	116	84.7	102	87.9	100	86.2	2	1.7	
	60分-4	163	100	61.3	81	81.0	81	81.0	0	0.0	
	計	597	459 ^{*7}	76.9	415	90.4	410 ^{*7}	89.3	5	1.1	
	対照区	60分-1	164	155	94.5	150	96.8	149	96.1	1	0.6
		60分-2	186	167	89.8	167	100.0	167	100.0	1	0.6
		60分-3	184	164	89.1	161	98.2	161	98.2	0	0.0
		60分-4	164	152	92.7	148	97.4	148	97.4	0	0.0
計	698	638	91.4	626	98.1	625	98.0	2	0.3		

*1 発眼率=(発眼卵数/供試卵数)×100

*2 ふ化率=(ふ化尾数/発眼卵数)×100

*3 正常魚ふ化率=ふ化率-奇形魚ふ化率

*4 奇形魚ふ化率=(ふ化時の奇形魚尾数/発眼卵数)×100

*5 ()内は実測値

*6 : χ^2 検定により $p>0.05$

*7 : χ^2 検定により $p>0.01$

第4表 アユ卵表面に人為的に付着させた冷水病原菌に対するオゾン水処理の実効性 (第1回試験)

濃度(mgO ₃ /L)\時間(分)	0 (対照区)	1	3	5	10
1 (1.02) ^{*1}	-- ^{*2}	--	--	--	--
2 (2.10) ^{*1}	--	--	--	--	--

*1 ()内は実測値

*2 --は2本とも冷水病原菌が増殖したことを示す

るオゾン水処理の実効性についての検討

3-1 第1回試験

結果を第4表に示した。いずれの濃度・時間でもアユ卵表面に付着した冷水病原菌をすべて殺菌することはできなかった。なお、オゾン水からは細菌は分離されなかった。

3-2 第2回試験

結果を第5表に示した。いずれの濃度・時間でもアユ卵表面に付着した冷水病原菌をすべて殺菌することは

できなかった。なお、1.0mgO₃/Lオゾン水のみから細菌が分離された(MCYB)が、MCYAでは分離されなかったことから、1.0mgO₃/Lオゾン水中に生存している細菌はごくわずかと考えられた。

3-3 第3回試験

結果を第6表に示した。人工海水の前処理の有無にかかわらず、いずれの濃度・時間でもアユ卵表面に付着した冷水病原菌をすべて殺菌することはできなかった。なお、オゾン水からは細菌は分離されなかった。

第5表 アユ卵表面に人為的に付着させた冷水病原菌に対するオゾン水処理の実効性 (第2回試験)

濃度 (mgO ₃ /L) \ 時間 (分)	0 (対照区)	15	30	45	60
0.5 (0.58) *1	--*2	--	--	--	--
1.0 (1.06) *1	--	--	--	--	--

*1 ()内は実測値

*2 --は2本とも冷水病原菌が増殖したことを示す

第6表 アユ卵表面に人為的に付着させた冷水病原菌に対するオゾン水処理の実効性 (第3回試験)

濃度 (mgO ₃ /L) \ 時間 (分)	前処理	0 (対照区)	1	3	5
0.5 (0.53) *1	飼育水	--*2	--	--	--
	人工海水	--	--	--	--
1.0 (1.01) *1	飼育水	--	--	--	--
	人工海水	--	--	--	--

*1 ()内は実測値

*2 --は2本とも冷水病原菌が増殖したことを示す

考 察

冷水病原菌はオゾン水に対して0.50mgO₃/L・15秒で殺菌された。魚病細菌のオゾン水殺菌効果として、*Aeromonas salmonicida*で0.04mgO₃/L・30秒、*Yersinia ruckeri*で0.01mgO₃/L・30秒で殺菌可能¹⁰⁾との知見がある。それらと比較して、冷水病原菌に対するオゾン水殺菌効果は劣るものの、オゾン濃度としては低濃度で瞬時に殺菌可能と判断された。

次にアユ受精卵のオゾン水に対する安全性は、0.50mgO₃/Lでは60分浸漬まで、1mgO₃/Lでは30分浸漬まで、2mgO₃/Lでは5分浸漬まではほとんど影響なく浸漬処理が可能と判断された。淡水魚類卵のオゾン水浸漬による影響の検討例は少なく、アユ卵についての知見は無かった。本研究で得られた結果はアユ卵へのオゾン水利用の基礎知見となりうるものである。

以上の結果から、安全な濃度・時間でオゾン水消毒したアユ受精卵から完全に冷水病原菌を殺菌できるものと期待したが、完全な消毒はできなかった。

その理由としては、以下のことが考えられた。

アユ受精卵の付着器である反転膜はスポンジ状の構造で、冷水病原菌の菌液に浸漬すると、その空隙深くまで冷水病原菌が浸襲するとのことである。¹¹⁾従って、オゾン水は反転膜深くまで浸透しないと反転膜深部に達した冷水病原菌を殺菌できないこととなる。ところで、第1回試験実施時に、冷水病原菌浸漬処理まで全く同じ由来の卵・菌液を用いて過酸化水素を用いた卵消毒実験を並行して行っているが、600ppm・30分で完全に消毒可能であった。¹²⁾このことは、反転膜深部まで消毒剤が

浸透することで消毒が可能であることを示していると思われる。このことから、オゾン水が反転膜深部まで浸透しなかったことが、冷水病原菌菌液浸漬したアユ受精卵から本菌を完全に消毒できなかった理由と考えられた。

アユ受精卵は受精後すぐに人工海水中に移しても飼育可能であることが示されている。¹³⁾そこで、一旦人工海水中に受精卵を浸漬した後、淡水であるオゾン水に浸漬して、浸透圧を利用することで反転膜深部にオゾン水を浸透させるねらいで実験(第3回実験)を行ったが、結果は同じであった。

このことから、現状では、冷水病原菌殺菌を目的としたオゾン水によるアユ卵消毒の実用化は極めて困難と考えられた。

要 約

1. 冷水病原菌はオゾン水に対して0.50mgO₃/L・15秒で殺菌された。
2. アユ受精卵のオゾン水に対する安全性は、0.50mgO₃/Lでは60分浸漬まで、1mgO₃/Lでは30分浸漬まで、2mgO₃/Lでは5分浸漬まではほとんど影響なく浸漬処理が可能と判断された。
3. 安全な濃度・時間でオゾン水消毒したアユ受精卵からは完全には冷水病原菌を殺菌できなかった。
4. このことから、現状では、冷水病原菌殺菌を目的としたオゾン水によるアユ卵消毒の実用化は極めて困難と考えられた。

今回の研究に際し、オゾン水作製およびその測定方法に関してご助言下しました荏原実業株式会社中央研究所長瀬俊哉氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 若林久嗣, 沢田健蔵, Bertolini JM, Rohovec JS. Ayuの冷水病について, 平成4年度日本魚病学会春季大会講演要旨集 1992;5.
- 2) 井上 潔. Ayuの冷水病, 海洋と生物 2000;22:35-38.
- 3) Kumagai A, Nakayasu C, Oseko N. No evidence for the presence of *Flavobacterium psychrophilum* within ayu eggs. *Fish Pathol.* 2004;39(4):183-187.
- 4) 渡辺研一. マツカワに発生したウイルス性神経壊死症の防除対策に関する研究. 博士論文, 北海道大学, 北海道. 2000.
- 5) Wakabayashi H, Egusa S. Characteristics of myxobacteria associated with some freshwater fish disease in Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1974;40:751-757.
- 6) 日本水道協会. 上水試験方法, 東京. 2001:259-262.
- 7) 高橋一孝. マス類の染色体操作による育種試験-I (温度ショックによるニジマス染色体の倍数化). 昭和59年度山梨県魚苗センター事業報告書 1985:81-91.
- 8) Toyama T, Kita-Tsukamoto K, Wakabayashi H. Identification of *Cytophaga psychrophilum* by PCR targeted 16S ribosomal RNA. *Fish Pathol.* 1994;29(4):271-275.
- 9) Izumi S, Wakabayashi H. Sequencing of gyrB and their application in the identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR. *Fish Pathol.* 2000;35(2):93-94.
- 10) Wedemeter GA, Nelson NC. Survival of two bacterial fish pathogens (*Aeromonas salmonicida* and the enteric redmouth bacterium) in ozonated, chlorinated and untreated waters. *J. Fish. Res. Board Can.* 1977;34:429-432.
- 11) 熊谷私信.
- 12) 岐阜県淡水魚研究所. 新しい疾病の防疫に関する研究「Ayuの冷水病及び細菌性出血性腹水病(シュードモナス病)に関する研究, 平成15年度養殖衛生管理技術開発研究成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 東京. 2003:119-137.
- 13) 中居 裕, 景山哲史, 大野平祐, 畑井喜司雄. 人工海水飼育によるAyu卵水カビ病予防の可能性, 平成17年度日本魚病学会大会講演要旨集.