

## マス類の卵膜軟化症 症状再現方法の検討

中居 裕, 原 徹

Soft egg disease in salmonid fishes, studies on how to reproduce the symptoms

YUTAKA NAKAI, TORU HARA

マス類の卵膜軟化症(以下、本症)は、卵膜を犯し、卵膜の軟化、び爛、卵の発生経過如何によっては早期孵化等を起こさしめ、卵を致死させる(川本:1975)こととされる。本症の発症により、種苗生産施設では卵の死亡、発眼卵の輸送中では卵膜が破れる等により、産業被害が生じる。

原因については、少なくとも全容は解明されていない状況にある。これまで、多くの報告で細菌の関与を指摘(例えば、高安ら:1934 梅原ら:1985)している。他の原因説として、水質説(伊澤ら:1998)、高水温+細菌説(Cousins and Jensen:1994)、低溶存酸素や卵管理の不備等(水産庁:1982)等がある。なお、細菌説の場合、原因細菌が特定されたという報告はない。

全国的には散発的に発生していると想定されるが、海外でも発病例が報告されている(例えば、Toney:1971, Wolf:1971)。ただし、北海道では広く多発しているようである(伊澤ら:1998, 佐々木・吉光:2008)。以上のことを勘案すると、本症は原因の詳細はなお不明であり、したがって、原因是一つではなく、しかもそれらが地域によって異なる可能性も想定される。

卵膜軟化の抑制方法としては、緑茶抽出物に浸漬することで卵膜を強固にする方法が知られる(佐々木・吉光:2008)。しかし、その処置によると考えられる孵化異常例も報告されている(名倉:2011)。

本症を実験的に再現させた研究として、伊澤ら(1998)は、飼育水中における硫酸イオンの過剰およびカルシウムイオンの過少が本症の主な原因とした例がある一方、西川ら(2015)は、飼育水を中空糸ろ過( $0.2\mu\text{m}$ )した飼育水では本症が発病せず、未処理水では本症が発病したことから、その原因を環境由来の細菌としている例がある。いずれの方法も、流水飼育で実験を行っているため、温度条件等、実験条件の多数の設定が困難である。このことが、本症の原因究明および対策研究推進の障害になっているものと考えられる。

これまでの研究経過を見る限り、本症の原因を科学的に究明することは、少なくとも短期間では困難であることが想定される。したがって、産業的見地から必要である対策研究には、本症の原因究明よりも、実験室内における本症再現方法を確立することが先決と判断し、その再現方法を検討した。

なお、前出(梅原ら:1985)の知見は、当研究所下呂支所で生産されたアマゴ卵の発症卵の電顕観察によるものである。実験実施場所が同じであることから、本研究は細菌説の立場から進めることとした。

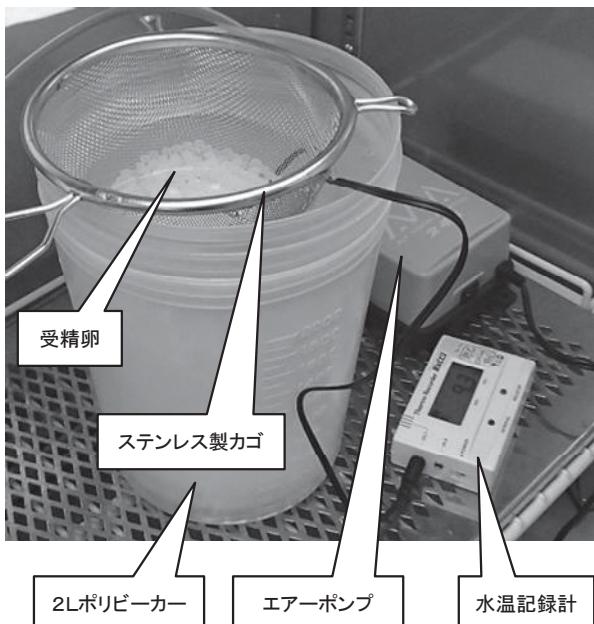
キーワード:卵膜軟化症、マス類、細菌、止水飼育、体腔液

### 材料と方法

#### 実験 1 受精卵の止水飼育法の検討およびマス類の受精卵・発眼卵の卵膜破断強度の測定

当研究所下呂支所で採卵したニジマス、アマゴ、イワナの各受精卵を約200~500粒程度を供試した。吸水前に、ポビドンヨード製剤で消毒(有効ヨウ素濃度 50ppm・15分 等張液中)した。なお、一部の実験(第1表の実験番号⑤⑥⑦⑨)は、

当研究所下呂支所の発眼卵販売事業として採卵したものの一部を供試した。それら供試卵と同一ロットは、別途、円筒型孵化槽(大きさ:直径 25cm×高さ 90cm 注水量:数 L/分 水温:アマゴ・イワナはおおむね 13~15°C、ニジマスはおおむね 7~10°C、死卵への水カビ寄生対策として、プロノポール浴を週 3 回実施)に収容して発眼期まで飼育されたことから、それら飼育群の発眼率を比較することで、止水飼育の影響を見ることとした。



第1図 飼育装置(インキュベーター内)

次に、第1図に示した装置で止水飼育を行った。2L ポリビーカーに飼育水(井戸水:流水飼育で使用するものと同じで、IHN 対策として紫外線照射を行ったもの)を満たした。ポリビーカーの縁にステンレス製カゴを置き、その中に受精卵を収容した。なお、エアーポンプとエアーストーンを用いて卵が動かない程度の通気を行った。飼育水は、原則として飼育終了まで交換しなかった。

装置は 10°C、13°C および 15°C のインキュベーター内に設置した。なお、死卵は、毎日ピンセットで取り除いた。したがって、死卵への水カビ寄生対策は行わなかった。発眼時に発眼卵を計数した。

供試卵は、受精卵(第1図の装置に収容前)と発眼卵において、卵膜破断強度を測定した。卵圧測定にはアナログフォースゲージ(AN-50: 日本計測システム株式会社製)を用い、卵が動かないよう固定後、測定器のステージを垂直に押し付け

て、卵膜が破断した時の圧力を卵膜破断強度とした。なお、測定器の測定可能範囲は 0~50kg·m/s<sup>2</sup>である。50kg·m/s<sup>2</sup>以上を示した卵についてはすべて 50kg·m/s<sup>2</sup>、測定器の自重(606.2g)で卵膜が破断した卵については 0kg·m/s<sup>2</sup>として記録した。

### 実験 2 卵膜軟化症の再現条件の検討(体腔液添加:添加濃度の影響)

第1図に記した止水飼育装置に用いた飼育水に、飼育水に対して 1% および 5% となるよう体腔液を添加した。供試はニジマス卵とし、添加した体腔液は、供試したニジマス卵の採卵時に採取したものある。なお、対照区は無添加とし、飼育水温は 10°C とした。その他の条件および測定項目は実験1と同様である。なお、対照区は、実験1の実験番号⑦と同じである。

### 実験 3 卵膜軟化症の再現条件の検討(体腔液添加:飼育温度の影響)

第1図に記した止水飼育装置に用いた飼育水に、飼育水に対して 1% となるよう体腔液を添加した。供試はイワナ卵とし、添加した体腔液は、それぞれ供試したイワナ卵の採卵時に採取したものである。なお、対照区は無添加とし、飼育水温は 10°C、13°C とした。その他の条件および測定項目は実験1と同様である。なお、対照区は、実験1の実験番号⑥と同じである。

### 実験 4 卵膜軟化症の再現条件の検討(死卵添加の影響)

第1図に記した止水飼育装置に用いた飼育水に、供試(ニジマス卵)と同一ロットのニジマス卵の死卵 5 粒を飼育開始当日に軽くつぶして飼育水に添加した。なお、対照区は無添加とし、飼育水温は 10°C とした。

その他の条件および測定項目は実験1と同様である。

なお、対照区は、実験1の実験番号⑪と同じである。

### 実験 5 卵膜軟化症を発病した卵表面の観察

実験2で症状の再現性が確認された体腔液添加による飼育を行い、卵表面の継時的变化を観察した。供試はヤマメ卵とし、添加した体腔液(1%)は、供試したヤマメ卵の採卵時に採取したものである。なお、対照区は無添加とし、飼育水温は 10°C とした。卵は、採卵 6 日後、13 日後、20 日後に数粒ずつ採取し、2%グルタールアルデヒド溶液中で保存した。

卵表面は、低真空走査型電子顕微鏡(TM3030 (株)日立ハイテクサイエンス製)で観察した。

### 実験 6 飼育水に人工海水を用いた卵膜軟化症発症抑制の試み

実験3のイワナ(飼育水温 10°C)の発眼率を観察後、実験区、対照区をそれぞれ 2 つに分け、一方は井戸水、もう一方は人工海水(1/7 アレン処方: 塩分として 3‰S)を飼育水として、7 日間飼育した。その他の条件および測定項目は実験1と同

様である。

(使用した人工海水組成)

NaCl:4.23g MgCl<sub>2</sub>:0.383g KCl:0.116g CaCl<sub>2</sub>:0.18g  
MgSO<sub>4</sub>:0.526g NaHCO<sub>3</sub>:0.033g 井戸水:1L

## 結 果

### 実験 1 受精卵の止水飼育法の検討およびマス類の受精卵・発眼卵の卵膜破断強度の測定

結果を第1表に示した。

受精卵の平均卵膜破断強度は、イワナ、ヤマメ、アマゴ、ニジマスの順に強かった。ただし、同じ魚種でも受精日が異なるとその強度は異なった。また、同じ受精日の卵においても卵膜破断強度のばらつきは大きかった。

発眼卵の平均卵膜破断強度は、一例(実験番号⑥)を除いて、受精卵に比べて強かった。

明確に本症を発病した卵と考えられる  $0\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$  卵は受精卵では見られなかつたが、発眼卵では2例(実験番号④⑦)で見られた。

事業用飼育群との発眼率の比較が可能であった実験区(実験番号⑤⑥⑦⑨)では、事業用飼育群の発眼率が高かつたのは実験番号⑥(10°C)のみで、他のすべての例ではその逆であった(第2表)。

第2表 実験飼育におけるニジマス・アマゴ・イワナ各卵の発眼率および卵膜破断強度

実験番号	魚種	飼育水温	発眼率(%) (発眼卵/供試卵)	事業用飼育群発眼率(%) (発眼卵/供試卵)
⑤	イワナ	10°C	68.8 <sup>a</sup> (286/413)	60.2(10,300/17,100)
⑥	イワナ	10°C 13°C	21.1 <sup>b</sup> (95/450) 31.3 <sup>a</sup> (169/540)	24.0(9,300/38,400)
⑦	ニジマス	10°C	74.1 <sup>b</sup> (169/228)	71.6(242,000/338,000)
⑨	ニジマス	10°C	42.9 <sup>a</sup> (129/301)	18.8(12,000/64,000)

\*: 発眼率 a: 事業用飼育群発眼率との間に統計学的有意差あり

( $\chi^2$ 検定  $p < 0.01$ )

b: 対照区との間に統計学的有意差なし( $\chi^2$ 検定  $p > 0.05$ )

### 実験 2 卵膜軟化症の再現条件の検討(体腔液添加:添加濃度の影響)

結果を第3表に示した。

発眼率は1%体腔液添加区では対照区と遜色はなかつた( $\chi^2$ 検定  $p > 0.05$ )が、5%体腔液添加区は対照区と比べて明らかに低かつた( $\chi^2$ 検定  $p < 0.01$ )。

平均卵膜破断強度は、対照区では、発眼卵は受精卵よりも高かつたが、体腔液添加区はその逆であった。特に5%体腔液添加区の卵膜破断強度の低下は著しく、発眼卵すべてが  $0\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$  であった。

### 実験 3 卵膜軟化症の再現条件の検討(体腔液添加:飼育

## 温度の影響)

結果を第4表に示した。

発眼率は、10°C区では、対照区と1%体腔液区にはほとんど差が見られなかつた( $\chi^2$ 検定  $p > 0.05$ )が、13°C区では1%体腔液添加区で発眼率の低下が見られた( $\chi^2$ 検定  $p < 0.01$ )。

発眼卵の卵膜破断強度では、10°C・13°C区ともに、対照区に比べて1%体腔液区の卵膜破断強度の低下が見られた(スチューデントの  $t$  検定  $p < 0.01$ )。

### 実験 4 卵膜軟化症の再現条件の検討(死卵添加の影響)

結果を第5表に示した。

発眼率、発眼卵の卵膜破断強度とともに、対照区と死卵添加区の間に差が見られなかつた(発眼率:  $\chi^2$  検定  $p > 0.05$  発眼卵の卵膜破断強度: スチューデントの  $t$  検定  $p = 0.25$ )。

### 実験 5 卵膜軟化症を発病した卵表面の観察

結果を第2図に示した。

受精13日後の卵までは、対照区と1%体腔液添加区とともに、卵表面に大きな差はみられなかつた。しかし、受精20日後では、1%体腔液添加区のみに夥しい数の  $2\sim3\mu\text{m}$  の桿菌状の物体が卵表面を覆い、卵表面を侵食している状況が観察された。

なお、本実験では卵膜破断強度の測定は行わなかつたが、受精20日後では、1%体腔液添加区の卵は、ピンセットでつまむだけで、卵膜が破断する卵が見受けられたことから、その時点では本症が発病しているものと考えられた。

### 実験 6 飼育水に人工海水を用いた卵膜軟化症発症抑制の試み

結果を第6表に示した。

発眼まで井戸水および1%体腔液を飼育水に添加した区の両区において、発眼後、飼育水を人工海水とした区では、井戸水とした区に比べて生卵率は低下した(井戸水: フィッシャーの直接確率計算法  $p < 0.05$  1%体腔液添加区: フィッシャーの直接確率計算法  $p < 0.01$ )。卵膜破断強度については、両区とも、発眼後、飼育水を人工海水とした区と、井戸水とした区の間に差は見られなかつた。

## 考 察

本研究を遂行する場合、飼育条件(水温、その他)別の実験区を設定する必要があつた。しかし、流水飼育では多数の実験区を設定することが困難と想定された。そのため、流水飼育と同等の飼育成績となる止水飼育法をまず検討する必要があつた。本研究で用いた止水飼育装置によるマス類卵飼育の

第1表 実験飼育におけるニジマス・アマゴ・イワナ各卵の発眼率および卵膜破断強度

実験番号	受精年月日	魚種	飼育水温	発眼率(%)	卵膜破断強度(kg·m/s <sup>2</sup> )		卵比率(%)
					平均値土標準偏差(標本数)(最大値/最小値)	発眼卵 受精卵	
①	2014.10.17	アマゴ	15°C	10.1(14/138)	11.2±0.70(34)(19.0/5.0)	19.5±1.42(14)(26.2/8.2)	25.7 0.0 0.0 0.0
②	2014.10.20	アマゴ	15°C	7.8(12/153)	11.8±0.62(35)(20.0/3.8)	17.3±1.45(12)(22.8/8.8)	14.3 0.0 0.0 0.0
③	2015.11.2	アマゴ	13°C	86.4(191/221)	14.8±0.80(30)(22.5/8.2)	22.9±1.39(30)(38.1/11.0)	0.0 0.0 0.0 0.0
④	2014.11.10	ヤマメ	15°C	51.5(169/328)	15.9±0.90(45)(35.1/4.4)	17.4±0.62(168)(36.5/0.0)	6.7 7.1 0.0 2.4
⑤	2014.11.17	イワナ	10°C	68.8(286/413)	32.6±2.02(38)(50.0/7.9)	36.6±0.80(178)(50.0/12.7)	2.6 0.0 0.0 0.0
⑥	2014.10.21	イワナ	10°C	21.1(95/450)	45.1±1.51(30)(50.0/24.0)	37.2±1.97(30)(50.0/17.0)	0.0 0.0 0.0 0.0
⑦	2015.3.16	ニジマス	10°C	74.1(169/228)	13.8±0.59(50)(25.8/7.3)	14.7±0.87(50)(26.5/0.0)	4.0 10.0 0.0 8.0
⑧	2015.3.30	ニジマス	10°C	79.9(179/224)	11.8±0.75(30)(19.5/2.3)	16.7±0.61(30)(24.0/8.8)	20.0 0.0 0.0 0.0
⑨	2015.3.30	ニジマス	10°C	42.9(129/301)	12.5±0.73(30)(22.0/6.7)	14.9±0.73(30)(24.6/7.4)	13.3 3.3 0.0 0.0
⑩	2015.3.30	ニジマス	10°C	78.8(256/325)	12.6±0.61(30)(20.0/7.6)	15.4±0.67(30)(26.2/9.5)	13.3 0.0 0.0 0.0
⑪	2015.4.13	ニジマス	10°C	55.9(219/392)	10.5±0.45(50)(22.1/4.3)	15.9±0.96(30)(27.3/6.7)	20.0 10.0 0.0 0.0

第3表 体腔液1%と5%を飼育水に添加した場合のニジマス卵の発眼率および卵膜破断強度

実験番号	実験区	飼育水温	発眼率(%)	卵膜破断強度(kg·m/s <sup>2</sup> )		卵比率(%)
				平均値土標準偏差(標本数)(最大値/最小値)	発眼卵 受精卵	
1%	体腔液添加区	10°C	78.5(161/205) <sup>b</sup>	4.2 <sup>a</sup> ±0.64(50)(16.3/0.0)	78.0	44.0
5%	体腔液添加区	10°C	25.5(40/157) <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup> ±0.00(40)(0.0/0.0)	4.0 100.0	100.0
⑦	対照区	74.1(169/228)		14.7±0.87(50)(26.5/0.0)	10.0	8.0

\*:発眼率 a:対照区との間に統計学的有意差あり( $\chi^2$ 検定  $p < 0.01$ ) b:対照区との間に統計学的有意差なし( $\chi^2$ 検定  $p > 0.05$ )\*:卵膜破断強度 a:対照区との間に統計学的有意差あり(Dunnettの方法  $p < 0.05$ )

第4表 体腔液を飼育水に添加した場合のイワナ卵の発眼率および卵膜破断強度(飼育水温の影響)

実験番号	魚種	実験区	飼育水温	発眼率(%)		卵膜破断強度(kg·m/s <sup>2</sup> ) 平均値±標準偏差(標本数)(最小値)	卵比率(%)
				受精卵	発眼卵		
(6)	イワナ	1%体腔液添加区	10°C	20.2 <sup>b</sup> (95/470)	45.1±1.51(30)(50.0/24.0)	22.0 <sup>a</sup> ±1.97(30)(50.0/0.0) 37.2±1.97(30)(50.0/17.0)	26.7 0.0
		対照区	21.1(95/450)	22.7 <sup>a</sup> (107/472)	14.9 <sup>a</sup> ±2.83(30)(50.0/0.0) 30.9±2.18(30)(49.4/11.0)	46.7 0.0	0.0 0.0
(6)	イワナ	1%体腔液添加区	13°C	31.3(169/540)			3.3 0.0
		対照区					

\*: 発眼率 a: 対照区との間に統計学的有意差あり( $\chi^2$ 検定  $p > 0.05$ ) b: 対照区との間に統計学的有意差なし( $\chi^2$ 検定  $p < 0.05$ )

\*: 発眼卵の卵膜破断強度 a: 対照区との間に統計学的有意差あり(スチュードントのt検定  $p < 0.01$ )

第5表 死卵を飼育水に添加した場合のニジマス卵の発眼率および卵膜破断強度

実験番号	実験区	飼育水温	発眼率(%)		卵膜破断強度(kg·m/s <sup>2</sup> ) 平均値±標準偏差(標本数)(最小値)	卵比率(%)
			受精卵	発眼卵		
(11)	死卵添加区	10°C	55.8 <sup>b</sup> (193/346)	10.5±0.45(50)(22.1/4.3)	16.6 <sup>b</sup> ±0.80(30)(24.8/7.6) 15.9±0.96(30)(27.3/6.7)	3.3 10.0
	対照区		55.9(219/392)			0.0 0.0

\*: 発眼率 a: 対照区との間に統計学的有意差あり( $\chi^2$ 検定  $p < 0.01$ ) b: 対照区との間に統計学的有意差なし(スチュードントのt検定  $p = 0.25$ )

\*: 発眼卵の卵膜破断強度 a: 対照区との間に統計学的有意差なし(スチュードントのt検定  $p < 0.05$ )

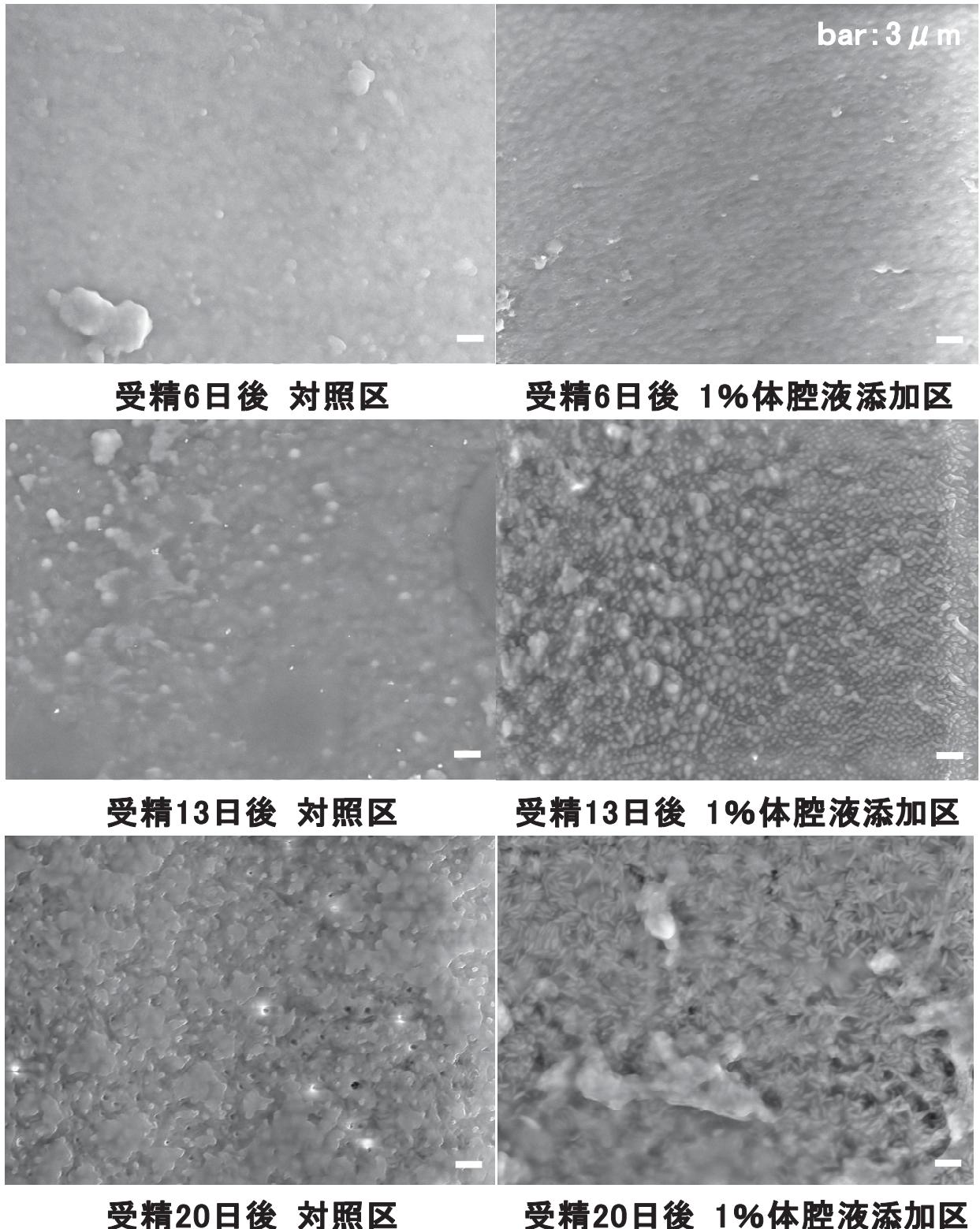
第6表 飼育途中で飼育水に人工海水を用いた場合のイワナ卵の生卵率および卵膜破断強度

実験番号	魚種	飼育水温	受精後日数	卵膜破断強度( $\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$ )			卵比率(%)
				生卵率 <sup>1</sup> (%)	平均値±標準偏差(標本数)	最大値/最小値	
(6)	イワナ	10°C	0	—	—	—	0.0 0.0
			35(発眼期)	井戸水	—	45.1±1.51(30)(50.0/24.0)	0.0 0.0
実験3			42	井戸水	100.0(0/34)	37.2±1.97(30)(50.0/17.0)	0.0 0.0
			42	0~35日:井戸水 36~42日:人工海水	80.6 <sup>a1</sup> (25/31)	30.5±2.95(31)(50.0/0.0)	12.9 12.9
			0	—	—	29.9 <sup>b1</sup> ±3.33(25)(50.0/0.0)	16.0 8.0
			35(発眼期)	1%体腔液添加	—	45.1±1.51(30)(50.0/24.0)	0.0 0.0
			42	0~35日:1%体腔液添加 36~42日:井戸水	87.1(27/31)	22.0±1.97(30)(50.0/0.0)	26.7 13.3
			42	0~35日:1%体腔液添加 36~42日:人工海水	61.8 <sup>a2</sup> (21/34)	21.6±2.58(27)(46.7/0.0)	11.1 7.4
						23.1 <sup>b2</sup> ±3.73(21)(50.0/0.0)	28.6 14.3

1:受精後36日目の生卵率を100%とした値

\*:生卵率 a1:36日後井戸水区(生卵率100%)との間に統計学的有意差あり(フイシャーの直接確率計算法  $p < 0.05$ )a2:36日後井戸水区(生卵率87.1%)との間に統計学的有意差あり(フイシャーの直接確率計算法  $p < 0.01$ )\*:卵膜破断強度 b1:対照区(平均卵膜強度:30.5 $\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$ )との間に統計学的有意差なし(スチューデントのt検定  $p = 0.90$ )b2:対照区(平均卵膜強度:21.6 $\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$ )との間に統計学的有意差なし(スチューデントのt検定  $p = 0.73$ )第7表 実験飼育におけるニジマス・アマゴ・イワナ各卵の発眼率、平均卵膜破断強度(8 $\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$ 未満の受精卵を除く)と卵膜軟化症発病状況

実験番号	魚種	飼育水温	発眼率(%) (発眼卵/供試卵)	平均卵膜破断強度( $\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$ )		卵膜軟化症 発病の有無
				受精卵(8 $\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$ 以上)	発眼卵	
①	アマゴ	15°C	10.1(14/138)	12.9	19.5	
②	アマゴ	15°C	7.8(12/153)	12.7	17.3	
③	アマゴ	13°C	86.4(191/221)	14.8	22.9	
④	ヤマメ	15°C	51.5(169/328)	16.7	17.4	発病
⑤	イワナ	10°C	68.8(286/413)	33.3	36.6	
⑥	イワナ	10°C	21.1(95/450)	45.1	37.2	発病
⑦	ニジマス	10°C	74.1(169/228)	14.1	30.9	発病
⑧	ニジマス	10°C	79.9(179/224)	12.8	14.7	発病
⑨	ニジマス	10°C	42.9(129/301)	13.3	14.9	
⑩	ニジマス	10°C	78.8(256/325)	13.4	15.4	
⑪	ニジマス	10°C	55.9(219/392)	11.5	15.9	



第2図 体腔液を1%添加した飼育水中におけるヤマメ卵表面の推移

妥当性については、以下のことと考えられた。

事業用飼育群との発眼率の比較が可能であった実験区(実験番号⑤⑥⑦⑨)では、実験番号⑥(10°C)を除いて、事業用飼育群より止水飼育の方が発眼率は高かった(第2表:実験番号⑤⑦⑨で統計学的有意差あり、 $\chi^2$ 検定  $p < 0.01$ )。なお、一例(実験番号⑥(10°C))の例外でも、その差は2.9%であり、統計学的有意差は認められなかった( $\chi^2$ 検定  $p > 0.05$ )。以上のことから、止水におけるマス類卵の飼育に、実験結果を左右するような飼育上の不都合は無いものと考えられた。

中村(1962)、宇野(1997)は、マス類卵を止水で飼育している。その方法は、ビーカーに少量の卵を収容し、外水槽で水温保持を行うものであった。中村(1962)は通気なし、宇野(1962)は通気を行っているが、いずれも飼育成績は良好と報告している。本研究では、前記研究の10倍程度の規模で実験を行ったが、通気により飼育水を流動させることにより、酸素供給が円滑に行われたことが、飼育上の不都合が無かつた大きな要因かもしれない。

卵膜破断強度における受精卵と発眼卵との関係は以下のことが考えられた。

発眼卵の平均卵膜破断強度は、実験番号⑥を除いて、受精卵よりも高かった(第1表)。このことから、供試4魚種すべてで、発眼卵の卵膜破断強度は受精卵よりも高いものと考えられた。ただし、卵膜破断強度は同一採卵群においてもばらつきが非常に大きいことは第1表に示したとおりである。新谷(1998)は、個体別に採卵したサクラマスの卵膜破断強度を測定し、親魚により個体差が大きいとしている。本研究では、供試卵は複数の親由来の混合卵を用いたことから、同一採卵群における大きなばらつきは、このことの反映であると考えられる。

しかし、例えば、実験番号⑧の受精卵における卵膜破断強度の最小値は $2.3\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$ である。このような卵膜破断強度の小さい受精卵が発眼まで生存できずに、発眼卵の平均卵膜破断強度を押し上げている可能性が考えられた。その可能性を除去するためには、そのような受精卵を除いた平均卵膜破断強度で比較する必要がある。しかし、そこで問題となるのは、平均値算出から除外卵膜破断強度の最小値の設定である。卵膜破断強度の小さい受精卵が発眼期までに死亡するという仮定から、平均値算出から除外卵の率は、発眼しなかった卵の率を上回ることがないことになる。第1表の実験結果の中で、その条件を満たす最も低い卵膜破断強度を示したのが実験番号⑧の $8\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$ であったため、それ未満の受精卵を除いて比較したのが第7表である。結果は $8\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$ を除かない場合と同じであったため、供試4魚種すべてで、発眼卵の卵膜破

断強度は受精卵よりも高いものと考えられた。

野村(2005)は、発眼まで卵膜破断強度は上昇し、その後、孵化まで一定としている。西川ら(2015)はシロサケ卵で、積算温度 $100^\circ\text{C}$ まで卵膜破断強度は上昇し、その後は大きな変化は見られなかつたとしている。本研究結果は前記研究結果と矛盾するところはない。したがって、本研究成果およびこれまでの知見から、供試したニジマス・アマゴ・ヤマメ・イワナの卵膜破断強度は、受精卵より発眼卵の方が強くなると考えられた。なお、実験番号⑥における発眼卵の平均卵膜破断強度が受精卵より弱かった理由は、本症発病によるものと考えられた。この点の詳細については後述する。

マス類の本症は、卵膜を犯し、卵膜の軟化、び爛、卵の発生経過如何によっては早期孵化等を起こさしめ、卵を致死させる(川本:1975)こととされる。しかし、発病とはその病気の症状が現れることで、死亡することは発病を認定するための必須条件ではない。このことから、本症の定義に「卵を致死させる」ことを含んでいることは、本症の発病の定義を狭めていると考える。したがって、川本(1975)の定義は「マス類の卵膜軟化症は、何らかの原因で卵膜が犯され、その結果として、卵膜の軟化、び爛等が起こることをいう。」と修正するのが妥当と考えられる。

卵膜破断強度が低下する直接的な要因として考えられるのは、卵膜の損傷であることは容易に推定できる。逆に言うと、受精後、卵膜が何らかの原因で損傷したら、卵膜破断強度は受精時に比べて低下することになる。したがって、果実の硬度計等で受精卵と発眼卵の卵膜破断強度を測定し、両者を比較することで、間接的に卵膜の損傷を推定できるものと考えられる。

したがって、視認による発病確認が困難な本症の発病を推定するためには、以下の手順が考えられる。まず、受精卵数十粒の卵膜破断強度を測定し、発眼卵も同様に測定する。両者の平均卵膜破断強度を比較して、発眼卵の平均卵膜破断強度が受精卵のそれに比べて横ばいあるいは低下している場合に本症の発病が疑われることとなる。

その観点で、第1表を見ると、唯一、受精卵に比べ、発眼卵の平均卵膜破断強度に明らかな低下が見られた実験番号⑥のイワナ卵は、本症の発病が疑われることとなる。

この卵は、実験4において、発眼後も7日間(受精42日後)観察しているが、その時に、明らかに本症を発病していると考えられる $0\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$ の卵が出現している(第5表)ことから、実験番号⑥のイワナ卵は、発眼時には本症を発病していると考えられた。

また、受精卵より発眼卵の平均卵膜破断強度が上昇した他の実験区においても、その上昇が小さい実験区(実験番号④)

(⑦)を見てみると、 $8\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$  未満卵の比率が受精卵より発眼卵の方が高いという共通点がある(第1表)。しかもそれら2例(実験番号④⑦)は、明らかに本症を発病していると考えられる $0\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$  の卵が出現していた。したがって、実験番号④⑦も、少なくとも卵の一部に本症が発病しているものと思われた(第7表)。

以上のことから、本症の発病を推定する方法は以下のとおりと思われる。まず、受精卵数十粒の卵膜破断強度を測定し、発眼卵も同様に測定する。両者の平均卵膜破断強度を比較して、発眼卵の平均卵膜破断強度が受精卵のそれに比べて横ばいあるいは低下している場合、あるいは $8\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$  未満卵の比率が受精卵より発眼卵の方が高い場合、明らかに本症を発病していると考えられる $0\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$  あるいはそれに近い数値の卵が出現している場合のいずれかに該当する場合に、本症の発病が疑われると考えられた。

第1表の11の実験中、3例(実験番号④⑥⑦)で本症が発病していることとなるが、そのうち2例(実験番号⑥⑦)の事業用飼育群では本症は確認されていない。この理由として、以下のことが考えられた。

実験番号⑥( $10^\circ\text{C}$ )は実験4において、発眼後も7日間(受精42日後)観察しているが、受精後35日(発眼時)から42日後の7日間で急速に卵膜破断強度が低下している(第6表)。本実験と事業用飼育群との飼育環境の大きな違いの一つは、流水と止水での飼育の相違である。事業用飼育群では症状が軽微であったために本症の確認が視認できなかった可能性も考慮しても、実験番号⑦では $0\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$  卵が8%含まれていることを考えると、事業用飼育群では本症の進行が遅かったことが考えられる。飼育水温が実験区と大きくは変わらない( $7\sim 9^\circ\text{C}$ )ことを考慮すると、流水飼育が本症の進行を遅らせていることが考えられた。本症は、発病している養殖場においても継続的でない場合が多数である(当研究所のアンケート調査による)が、その発病要因の一つに卵飼育における飼育水の流速があるのかもしれない。

実験2からは、以下のことが考えられた。

第3表に示した結果の対照区は、前述の理由で本症を発病しているものと考えられた。体腔液添加区は、対照区に比べ、明らかに本症が進行した。特に5%体腔液添加区は、発眼卵すべての卵膜破断強度が $0\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$  であったことから、飼育水中への体腔液添加は、本症の進行を助長し、その助長は濃度依存性であることが考えられた。5%体腔液添加区における発眼率の著しい低下は、本症の重度の進行により、発眼までに多くの卵で卵膜が破損することにより死亡したことが原因と考えられた。なお、体腔液の存在が本症の進行を助長するという知見は、これまでに報告されていない。

本症の進行と飼育水温の関係を示したのが第4表である。

実験3の対照区(実験番号⑥)は、前述のとおり本症を発病しているものと考えられた。 $10^\circ\text{C}$ 区における平均卵膜破断強度は $10^\circ\text{C}$ 区においては対照区と1%体腔液添加区とは差が認められなかつたのに対し、 $13^\circ\text{C}$ 区においては差が認められたこと、受精時に比べて卵膜破断強度が大きく低下し、卵膜破断の危険が大きくなっていると考えられる $8\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$  卵の1%体腔液添加区の比率が $13^\circ\text{C}$ では $10^\circ\text{C}$ の約2倍となっていることから、本症の症状の進行は、 $10^\circ\text{C}$ より $13^\circ\text{C}$ のほうが早くなることが考えられた。Cousins and Jensen(1994)は $8^\circ\text{C}$ より $14^\circ\text{C}$ で本症が発病しやすいことを見ている。また、養殖現場では、高水温で本症が起りやすいと言われていることは、この結果と符合するものと考えられた。

本症を発病した卵表面の観察からは、以下のことが考えられた。

受精20日後の卵表面のみから、多数の短桿菌様の物体が観察された(第2図)。梅原ら(1985)が観察した、当研究所下呂支所で生産されたアマゴ卵の発病卵の電顕観察像と比較すると、大きさおよび形態が類似していることから、本研究で観察された物体は、細菌である可能性が高いと推察された。このことと体腔液添加の影響を重ねると以下のことが考えられた。

Matsubara *et al.*(1985)は、シロサケの体腔液は血清タンパクと共に抗原性を持つ多種のたんぱく質が含まれているとしている。血清が細菌の増殖を助長することは、細菌学では広く知られていることであり、細菌増殖用培地にも血清を添加することは日常的に行われている。卵表面に見られた多数の短桿菌様の物体が細菌とすると、体腔液成分により増殖が助長され、その助長は濃度依存性であるという説明に矛盾はないことになる。

しかし、梅原ら(1985)は、孵化腺機能の異常が認められないことから、環境水との係わりを疑っている。本研究で本症の発症およびその進行促進に関して明らかとなったことは、(1)流水飼育より止水飼育で発病しやすい(2)飼育水温が $10^\circ\text{C}$ より $13^\circ\text{C}$ で病状が進行する(3)飼育水に体腔液を1%添加すると病状が進行する、である。(1)~(3)の状況が起こることと、細菌原因説と矛盾しないことは前に述べたとおりである。それに対して飼育水(環境水)水質原因説は、(2)が起こることに矛盾はない(3)の状況は、体内では卵の周りが体腔液で満たされているが、飼育水(水質)との相乗効果で本症が促進される可能性は否定できない。しかし(1)の流水飼育より止水飼育で発病しやすいことは、むしろ流水飼育の方が水質が保持されやすいことを考えるとその原因では説明しづらいと思われる。ただし、仮に、細菌説に立脚しても水質が本症の発病およびその進行

に補助的な役割を担っている可能性は、本研究結果からは否定できない。

仮に、本症の原因が細菌とした場合、由来は、体腔液か飼育水のどちらかが考えられる。以前主流であったマス類卵の発眼卵消毒では本症が発病したが、吸水前消毒に切替後は発病しなくなったとの状況から、本症原因菌の由来は体腔液ではないかとの考えがある(小原私信)。しかし、本研究では、吸水前消毒卵でも発病したこと、および前述の理由で本症の軽微な症状は肉眼的には困難なことから、吸水前消毒に切替後は発病しなくなったとの状況だけで、体腔液由来と断定することはできない。次に河川水由来であるが、西川ら(2015)は、中空糸ろ過水( $0.2\mu\text{m}$ )で本症が発病しなかったことから、本症の原因是飼育水由來の細菌としている。本研究では、IHN対策として紫外線を照射した井戸水を約 2L 使用して止水飼育を行ったが、本症が発病している。

本研究では、細菌が原因として、その由来が特定されるような実験条件とはしていない。ただし、体腔液由来の場合、ヨード剤消毒を、河川水由来の場合、紫外線殺菌を、原因細菌は潜り抜けたことになる。以上の状況は、本症の予防を考える上で必要な知見と考えられた。

なお、本研究で示した電子顕微鏡像と、梅原ら(1985)、西川・笠井(2015)が示した電子顕微鏡像の異同は、当然ながら明らかではない。また、本研究においても、細菌原因説が有利とは考えるものの、水質説を完全に否定する知見とはなっていない。伊澤ら(1998)は、本症の再現実験で、硫酸イオンの過剰およびカルシウムイオンの過少が本症の主な原因としていることを勘案すると、細菌原因説の場合でも、原因細菌が複数ある可能性、病状の進行に水質が関与している可能性は依然として残されていると考えられる。

実験 6 では、細菌が原因として、淡水中に生存する細菌は塩分耐性が低いとの想定で、飼育水を人工海水とした。飼育水を人工海水に変更して本症に対する効果を探ったが、平均卵膜破断強度は井戸水飼育と差は認められなかった。人工海水切替時には、本症の発症により卵膜の損傷が進んでいたこと、および対照区(井戸水区)の平均卵膜破断強度が、人工海水切替区と同様の推移を示していることから、病状の進行も阻止できなかったと考えられた。

なお、人工海水に切り替えてからの生卵率は、井戸水飼育区に比べて有意に低下した。宇野(1997)は、イワナ卵の塩分耐性について検討し、4‰Sまでは生卵率に影響はなく、5‰Sで若干の生卵率の低下を見ている。本研究の飼育水の塩分は 3‰S であったが、本症の発病により卵膜が損傷していたため、3‰S の塩分でも生卵率に影響した可能性が考えられた。

なお、死卵を飼育水に添加した場合(実験 4)は、本症の誘

発および進行の助長は観察されなかつた(第 5 表)。本実験による死卵添加量は 5 粒で、重量にして 0.4~0.5g である。平尾ら(1955)はニジマス卵の全窒素は概ね 4%としている。また、須山(1958)は、ニジマス卵の窒素分のうちほとんどがタンパク由来としている。これらのことを勘案すると、飼育水 2L に含まれる死卵由来タンパク質濃度は約 0.001%となる。松原ら(1994)はサクラマスの体腔液のタンパク質濃度は  $4.5 \pm 0.3\text{ mg/mL}$  としている。この数値を本実験条件に当てはめると、体腔液 1%飼育水中の体腔液由来タンパク質濃度は 0.0045%となり、死卵 5 粒を添加した飼育水中のタンパク質濃度は、1%体腔液添加の場合の約 22%となる。このことから、死卵 5 粒の添加により、本症の誘発および進行の助長は観察されなかつた理由が、添加量の不足であることは否定できない。しかし、第 7 表を見ると、低発眼率群が必ずしも本症発病とはなっていない。発眼率が 10%程度以下の事例(実験番号①②)で本症が発病していない(第 7 表)ことを勘案すると、死卵の存在は、本症の発病には関与していないことを示唆するものと考えられた。ただし、実験 4 では、対照区に本症が発病しなかつたので、その進行の助長の有無については、今後検討する必要がある。

本研究の結果、本症の発病履歴のある養殖場で採卵されたマス類卵を止水飼育することで、本症を発症させる可能性が高まる、飼育水に体腔液 1%を添加することでその病状を進行させることができることを明らかにした。この方法により、今まで困難であった、実験室内での本症の再現が可能となり、本症の対策研究に利用できることが明らかとなつた。また、本方法の実験条件の設定次第では、本症の原因究明に資する研究も可能と考えられることから、本方法の利用により、本症の対策および原因究明の両面の進展が期待される。

## 要 約

1. マス類の卵膜軟化症の対策研究に資するため、本症の再現方法を検討した。
2. 本症は、止水飼育により発病しやすいこと、飼育水に体腔液を少なくとも 1%添加することによりその病状が進行すること、飼育水温が  $10^{\circ}\text{C}$  より  $13^{\circ}\text{C}$  の方が病状の進行が速いことが明らかとなった。
3. 本症を発病した卵表面の観察からは、多数の短桿菌様の物体が観察されたため、本症の原因の一つは細菌による可能性が示唆された。

## 謝 辞

低真空走査型電子顕微鏡の使用に際して便宜をお図り下

さった、岐阜県産業技術センター食品部 今泉茂巳主任専門研究員に感謝いたします。

## 文 献

- 新谷康二. 1998. 森支場で池産サクラマス卵に発症した卵膜軟化症について. 魚と水, 35:13-18.
- Cousins, K. L., and J. O.T. Jensen. 1994. The effects of temperature on external egg membranes in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and the occurrence of soft-shell disease. Can. J. Zool., 72:1854-1857.
- 平尾秀一・山田充阿彌・菊池嶺(1955). ニジマス卵の成分と発眼率. 日水誌, 21(4):240-243.
- 伊澤敏穂・新谷康二・村上 豊・北村隆也・坂井勝信. 1998. 卵膜軟化症の発症原因. 魚と水, 35:19-28.
- 川本信之. 1975. 養魚学総論. 恒星社厚生閣, 東京. 270-272.
- Matsubara,T., A.Hara and K.Takano(1985). Immunochemical identification and purification of coelomic fluid-specific protein in chum salmon(*Oncorhynchus keta*). Comp. Biochem.Physiol.,81B,309-314.
- 松原孝博・原 彰彦・高野和則(1994). サクラマス (*Oncorhynchus masou*)の体腔液產生に伴う血漿タンパク成分の体腔への移動について. 日水誌, 60(4):479-483.
- 名倉 盾. 2011. カテキンによる卵膜軟化症対策について。平成 21 年度山梨県水産技術センター事業報告書, 38:10-14.
- 中村一雄. 1962. 淡水魚の養殖増殖に関する研究. 水産庁淡水研報,11(3):1-226.
- 西川啓介・笠井久会. 2015. サケ卵の卵膜軟化症に関する研究—電子顕微鏡観察による発症機序の検討—. 平成 27 年度日本水産学会春季大会講演要旨集.
- 西川啓介・笠井久会・伴真俊. 2015. サケ卵の卵膜軟化症に関する研究—発症原因の検討—. 平成 27 年度日本水産学会春季大会講演要旨集.
- 野村哲一. 2005. サケ・マス類の病気—水カビ病と卵膜軟化症—. さけ・ます資源管理センター技術情報, 171:29-43.
- 佐々木系・吉光昇二. 2008. 緑茶抽出物浸漬法によるサケ卵の卵膜軟化症抑制効果. 水産技術, 1(1): 43-47.
- 水産庁. 1982. 水産庁北海道さけますふ化場事業成績書. 217-218.
- 須山三千三(1958). ニジマス卵成熟中の一般成分の変化. 日水誌, 24(8):656-659.
- 高安三次・武田志麻之輔・大野義吉. 1934. 西別鮭鱈孵化場鮭卵被害調査. 水産調査報告, 37:1-140.
- Toney, D. P. 1971. Soft-egg disease and acriflavine. Prog. Fish-Cult., 33:159.
- 梅原光夫・隆島史夫・立川 亘. 1985. アマゴの卵膜軟化症. 水産増殖, 32:230-232.
- 宇野將義. 1997. サケマス類の海水増殖に関する基礎的研究. 東京大学学位(博士)論文. 191pp.
- Wolf, K. 1971. Soft-egg disease of fishes. U. S. Fish. Wildl. Serv. Fish Dis. Leafl., No. 34. 12p.

