

## ニシキゴイ受精卵のポビドンヨード剤による消毒効果の検討

小林健一郎・佐藤 将・樋口正仁・下条義信・兵藤則行

Disinfection of Fertilized Eggs of Koi Carp (*Cyprinus carpio*) with Povidone-IodineKenichiro KOBAYASHI, Shoh SATO, Masahito HIGUCHI, Yoshinobu SHIMOJO  
and Noriyuki HYODO

キーワード：ニシキゴイ，卵消毒，ヨード剤，KHV

コイヘルペスウイルス（以下KHV）病はコイの増養殖に大きな被害を与えている。この疾病は国内では2003年に初めて発生し<sup>1)</sup>、以後全国各地に伝播し被害が拡大した。

KHVに感染・発症し治癒した魚（以下KHV感染耐過魚）は、外観的には健全に見える。しかしながら、KHVゲノムは、23℃で飼育した場合、ウイルス暴露後長期間にわたり、脳に残存することが明らかにされている<sup>2)</sup>。このことからKHVが垂直感染する可能性は否定できないが、これまでのところ知見は得られていない。

魚類の増養殖における垂直感染の防除対策としては、サケ・マス類でポビドンヨード剤（以下ヨード剤）を用いた卵消毒が実施されており<sup>3)</sup>、マゴイでも卵消毒条件に関する報告がある<sup>4)</sup>。しかし、マゴイでは発眼期以外の時期における卵消毒に関する知見はなく、またKHVおよびニシキゴイ卵を対象とした消毒条件に関する知見はない。

以上のことから本研究では、KHV感染耐過魚を作出し、垂直感染の可能性を検討するとともに、卵消毒を行うことによりウイルスフリーな稚魚が得られるかどうか検討した。さらに、ニシキゴイ卵の安全で簡便な消毒方法を確立するため、消毒効果の検討に加え、消毒処理に対する耐性、卵密度の違いが有効ヨウ素濃度の減衰におよぼす影響を調べた。

## 材 料 と 方 法

## 1. KHV感染耐過魚から得られた生殖産物のウ

イルスの存在および受精卵の消毒効果

**感染耐過親魚の作出** 感染はニシキゴイ親魚の腹腔内にKHV（独立行政法人 水産総合研究センター養殖研究所より分与）を $10^{2.1}$ TCID<sub>50</sub>/fish接種することにより行い、接種後20℃にて飼育した。その後1尾以上の死亡を確認した時点でKHV病が発症したものとし、30または32℃に昇温し5日間飼育を行った。その後、20℃に下げて3日間飼育し、再び30または32℃に昇温して7または10日間飼育を行いKHV病を治癒させた。

**生殖産物からのウイルス検出** 垂直感染の可能性を検討するため、感染耐過魚から得られた卵巣液、未受精卵、精液および受精卵におけるウイルス存在の有無を検査した。ウイルス検査に供したサンプルはニシキゴイの繁殖期にあたる5月～7月にかけて採取した。受精卵は感染耐過した親魚より得た未受精卵および精液を用いて作出した。なお、卵付着基質にはアクリル板（約14cm×約11cm）を用いた。

**ウイルス検査** ウイルス検査は、PCRと細胞培養の2つの方法によって行った。PCRは、Gilad *et. al.* (2002)<sup>5)</sup>およびYuasa *et. al.* (2005)<sup>6)</sup>に準じて行った。また、細胞培養は以下の手順で行った。未受精卵および受精卵については、9倍量のMEM（イーグル最小必須培地，日水製薬）を加えホモジナイズした後、遠心分離（3,000または15,000rpmで15分間）を行い、分離後に得た上澄みを回収した。また、卵巣液については、未受精卵を遠心分離後得られた上澄みを、精液は希釈せずそのまま用いた。これらを、1,000I. U. /mlのペニシ

リンおよび1,000  $\mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシンを添加したMEMと等量混合し、4°Cにて一晩静置した。翌日24wellプレートに培養したKF-1細胞に接種後、20°Cで3週間培養し、細胞変性効果(CPE)の観察を行った。

**消毒試験区の設定および消毒効果の評価** 消毒の効果を評価するため、消毒の時期、ヨード剤の濃度および浸漬時間が異なる5つの設定で試験を行った(表1)。

消毒には水産用イソジン液10%(明治製菓)を用いた。その後、通常の飼育方法でこれらの卵をふ化させ、仔魚あるいは稚魚になるまで飼育した。飼育後、仔魚については個体すべてを、稚魚は鰓を摘出して、ウイルス検査に供した。

なお、稚魚については、抗炎症性ステロイドであるデキサメタゾンを投与し、10日間経過した個体をウイルス検査に供した。デキサメタゾンの投与は、ごま油に溶解させた後、40または400  $\mu\text{g/g}$ 魚体重で腹腔内に注射することにより行った。

表1 消毒試験区の設定

消毒時期		①	②	③	④	⑤
受精14時間後	濃度(mg/L)	50	50	200	200	0
	時間(min)	15	30	15	30	30
受精62時間後*	濃度(mg/L)	50	50	200	200	0
	時間(min)	15	30	15	30	30

\*発眼期

## 2. 卵と精液をKHV液で攻撃した後、得られた受精卵の消毒効果

未受精卵への攻撃は、20gの卵に $10^{2.8}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ のKHV液20mlを混合することにより行った。また、精液については、コイ用の人工精漿<sup>7)</sup>で100倍に希釈した精液と、KC1を加えて人工精漿の塩濃度と等しくなるように調整したKHV液を等量混合することにより攻撃を行った。その後受精を行い、得られた受精卵は受精1、14および62時間後に水産用イソジン液10%を用いて消毒を行った。また濃度および浸漬時間の設定は表1のとおりとした。消毒後、通常の方法で仔魚および稚魚に成長するまで飼育し、ウイルス検査には受精卵、仔魚、稚魚の鰓の一部を供した。

さらに、消毒前後に受精卵の生菌数を比較することによって消毒効果を評価した。

生菌数の測定にはアクリル板または人工産卵藻(商品名: きんらん)に付着した受精卵0.1gを供した。ヨード剤の反応停止は滅菌2%ペプトン水により行った。採取した卵は、9倍量の滅菌PBSを加えて磨砕した。この磨砕液を原液として10倍希釈列を作製し、普通寒天培地表面に塗抹後、25°Cにて5~7日間培養してコロニー数を測定した。得られた生菌数から消毒区ごとに消毒率を(1-各消毒区の生菌数/未消毒区の生菌数) $\times 100$ で算出し、比率データを逆正弦変換した値を用いて統計学的な解析を行った。

## 3. 卵に対する消毒の影響

受精卵をアクリル板1枚あたり155~1,060粒付着させた後、井戸水2Lを満たした広口ポリビーカーにアクリル板を1枚入れた。アクリル板の入ったポリビーカーは、20°Cのインキュベーターに収容し、エアレーションを行いながら培養した。培養水は1日1~2回、半分程度交換した。消毒試験の設定は表1のとおりとした。

卵に対するヨード剤消毒の有害性の評価は、発眼率およびふ化率の比較により行った。

なお、各試験区と未消毒区間の発眼率およびふ化率の統計学的検定については、まず比率データを逆正弦変換し、算出された値をDunnetの方法を用いて多重比較の検定を行った。

## 4. 浸漬卵量と有効ヨウ素濃度の関係

浸漬する卵量が多くなると、消毒時の有効ヨウ素濃度が減少するか否かを調査した。浸漬する受精卵量は、1g、3gおよび5gとした。まず、有効ヨウ素濃度が50mg/Lとなるように調整したヨード液を2.6L作製し、作製直後に卵浸漬前の有効ヨウ素濃度測定用のサンプル液を600ml採取した。測定用のサンプル液は3等分し、それぞれの濃度を測定した。受精卵をそれぞれポリビーカーに採取し、直ちに残りのヨード液2Lを注ぎ、15分間静置した。静置後、ポリビーカーから卵浸漬後の濃度を測定するためのサンプル液を600ml採取し、

ヨウ素濃度の測定に供した。これらの作業は各試験区で3回繰り返し行った。

有効ヨウ素濃度は、三村らの方法<sup>8)</sup>を改変した滴定法で測定した。有効ヨウ素濃度 $I_2$ (mg/L)は、 $1/40N$ チオ硫酸ナトリウムによる滴定値(ml)× $f$ × $1/40/V$ × $126.9 \times 1,000$ の計算式で求めた。 $f$ は、 $1/40N$ チオ硫酸ナトリウムのファクター( $f=1.015$ )、 $V$ は、滴定に使用したサンプル液の量(200ml)とした。得られた開始時の有効ヨウ素濃度と減衰量(=開始時の濃度-15分後の濃度)を基に、一元配置分散分析を行い、Tukey法による多重比較を行った。

## 結果

### 1. KHV感染耐過魚から得られた生殖産物のウイルスの存在および受精卵の消毒効果

本試験に用いた感染耐過魚から得た未受精卵、精液、受精卵および卵巣液は、全てKHV陰性であった。また、感染耐過魚から得た卵を異なる濃度および時間で消毒し、ふ化後の仔魚および稚魚のウイルス保有状況を調査したところPCRと細胞培養いずれにおいても、未消毒区を含め全ての試験区でKHV陰性であった(表2)。

表2 感染耐過魚から得られたサンプルの検査結果

目的	KHV検査結果			
	未受精卵	精液	受精卵	卵巣液
垂直感染の有無	— <sup>*1</sup>	— <sup>*2</sup>	— <sup>*3</sup>	— <sup>*3</sup>
消毒効果の評価	消毒区	未消毒	消毒区	未消毒
	仔魚	区仔魚	稚魚	区稚魚
	— <sup>*4</sup>	— <sup>*4</sup>	— <sup>*4</sup>	— <sup>*4</sup>

\*1: 3尾の結果を示す

\*2: 7尾の結果を示す

\*3: 2尾の結果を示す

\*4: 1ペアより得られた各区5尾ずつの結果を示す

### 2. 卵と精液をKHV液で攻撃した後、得られた受精卵の消毒効果

受精卵についてウイルス検査を行った結果、受精1時間後に消毒した場合のみ、未消毒区、50mg/L・15分消毒区および50mg/L・30分消毒区からPC

RでのみKHVが検出された。なお、細胞培養では陰性であった。一方、他の消毒条件においては、KHVは検出されなかった(表3)。卵付着基質にきん

表3 受精卵のウイルス検査結果

	Lot1	Lot2	Lot3
ウイルス感染価 (TCID50/ml)	$10^{2.6}$	$10^{3.1 \sim 3.3}$	$10^{2.1 \sim 2.3}$
消毒時期	受精1 時間後	受精14 時間後	受精62 時間後
mg/L-min	PCR 培養	PCR 培養	PCR 培養
50-15	+ —	— —	— —
50-30	+ —	— —	— —
200-15	— —	— —	— —
200-30	— —	— —	— —
未消毒区	+ —	— —	— —

らんを用いた場合も同じ結果であった。上述のKHVが検出された3つの区については、受精卵に存在するKHVが感染力を有するか否かを調査した。感染力の有無は、卵のホモジネート液をウイルスフリーゴイに接種し、3週間後にウイルス検査を行うことによって調査した。その結果、接種を行ったいずれの個体からもKHVは検出されなかった。

また、消毒試験を行った受精卵からふ化した仔魚および稚魚については、受精卵でKHVが検出された区を含め、いずれの試験区からもKHVは検出されなかった。

さらに、生菌数の減少状況から消毒率を算出した結果、全ての試験区において消毒率の値が100%未満となり、消毒により卵に付着している生菌数は減少すると推定された。一方、処理の違いによって消毒率に差異が存在するか、アクリル板、きんらんのそれぞれで二元配置分散分析を行った結果、ヨウ素濃度および浸漬時間の違いによる差は認められなかった(表4)。

### 3. 卵に対する消毒の影響

各試験における発眼率およびふ化率を表5に示した。ヨウ素濃度および浸漬時間の違いによって差異が存在するか、未消毒区を除いて二元配置分散分析を行った。発眼前消毒処理群では、発眼率、ふ化率のいずれにおいても、ヨウ素濃度および浸漬時間の違いによって有意差が存在した(表6)。

また、発眼率において2つの要因間に交互作用が認められた(表6)。一方、発眼後に処理した群では、ヨウ素濃度および浸漬時間で発眼率やふ化率に有意差は認められなかった。

発眼前消毒処理群の発眼率において、要因間に交互作用が認められたことから、2つの処理条件を個別に扱わず、それぞれの試験区として一元配置分散分析を行った。

未消毒区を含めた一元配置分析の結果、発眼前消毒処理試験では、発眼率およびふ化率のいずれにおいても試験区間に有意差が存在した(表7)。一方、発眼後の消毒処理試験では、試験区間に有意な差は認められなかった(表7)。

試験区間に有意差が存在した発眼前消毒処理試験において、未消毒区と消毒区の間有意差が存在するかDunnett法で多重比較を行った結果(表5)、発眼率では、200mg/L・30分間消毒区の値(平均値:24.9%)が未消毒区(平均値:91.7%)より有意に小さかった( $p<0.05$ )。ふ化率については、200mg/L・15分間(平均値:52.5%)および30分間区の値(平均値:13.5%)が、未消毒区の

ふ化率(平均値:80.6%)より有意に小さかった( $p<0.05$ )。

#### 4. 浸漬卵量と有効ヨウ素濃度の関係

卵消毒時における有効ヨウ素濃度の減衰試験の結果を表8および表9に示した。減少量は、開始時の有効ヨウ素濃度から15分経過後の測定値を引いた値である。

開始時、15分後、減少量それぞれ試験区間で、一元配置分散分析を行った結果、いずれの比較においても、試験区の母平均に有意な差異が存在した(表8)。Tukey法で多重比較を行った結果、ヨード液作製直後にもかかわらず、有効ヨウ素濃度に試験区間で有意差が認められた(表9)、そのため、減衰状況の評価は、減少量を比較することによって行った。比較の結果、1g/2L区の減少量の平均値(1.9mg/L)が統計学的に最も小さく、5g/2L区の減少量(7.8mg/L)が最も大きかった(表8、表9)。

表4 消毒率(%)および処理条件間の比較結果

ヨウ素濃度 (mg/L)	浸漬時間 (分)	アクリル板		きんらん	
		N	平均(範囲)	N	平均(範囲)
50	15	3	93.6(81.2~99.6)	3	88.6(71.3~99.4)
50	30	3	98.7(96.7~99.8)	3	95.7(93.7~99.4)
200	15	3	97.9(96.7~99.1)	3	94.9(90.0~99.7)
200	30	3	98.3(96.0~99.6)	3	93.2(90.3~98.6)
二元配置分散分析			ヨウ素濃度		浸漬時間
p値			0.341		0.729

消毒率(%)=(1-各消毒区の生菌数/未消毒区の生菌数)×100

表5 発眼率およびふ化率の結果

消毒時期 (mg/L-min)	発眼前 (受精14~15時間後)		発眼後 (受精62時間後)	
	発眼率*1(%) 平均値(範囲)	ふ化率*2(%) 平均値(範囲)	発眼率(%) 平均値(範囲)	ふ化率(%) 平均値(範囲)
50-15	92.3(85.5~97.3)	82.0(70.4~94.7)	91.7(88.2~95.7)	69.9(59.3~77.9)
50-30	89.5(83.8~96.0)	74.1(68.5~79.6)	89.3(78.9~96.7)	72.8(50.8~92.7)
200-15	74.5(43.0~88.0)	52.5(21.9~79.2)**	87.8(78.6~97.3)	69.2(44.7~81.9)
200-30	24.9(7.5~82.2)**	13.5(2.8~47.2)**	90.6(84.7~93.4)	72.5(48.6~86.7)
未消毒区	91.7(85.0~94.9)	80.6(73.3~88.2)	90.3(84.6~98.4)	74.3(57.6~83.2)

\*1:発眼率=(発眼卵数/供試卵数)×100 \*2:ふ化率=(ふ化尾数/供試卵数)×100

各試験区の繰返し数: N=5 \*\*: Dunnettの多重比較  $p<0.05$

表6 発眼前消毒処理（受精14～15時間後）における二元配置分散分析の結果

要因	発眼率				ふ化率			
	自由度	平均平方	F値	P値	自由度	平均平方	F値	P値
ヨウ素濃度	1	1.705	27.280	<0.001	1	1.538	45.393	<0.001
浸漬時間	1	0.542	8.668	0.009	1	0.412	12.173	0.003
ヨウ素濃度×浸漬時間	1	0.344	5.499	0.032	1	0.100	2.951	0.105
残 差	16	0.063			16	0.034		

表7 消毒処理試験における一元配置分散分析の結果

		発眼率				ふ化率			
		自由度	平均平方	F値	P値	自由度	平均平方	F値	P値
発眼前消毒	試験区	4	0.740	14.338	<0.001	4	0.611	20.746	<0.001
	残 差	20	0.052			20	0.029		
発眼後消毒	試験区	4	0.004	0.180	0.946	4	0.006	0.170	0.951
	残 差	20	0.020			20	0.034		

表8 有効ヨウ素濃度減衰試験の結果（平均値±標準偏差）

卵密度 (g/2L)	N	開始時 (mg/L)	15分後 (mg/L)	減少量 (mg/L)
1	3	46.8±1.3	44.9±0.4	1.9±1.1
3	3	44.5±1.2	40.6±0.6	3.9±1.4
5	3	43.9±0.8	36.1±0.6	7.8±1.4
一元配置分散分析		p=0.043	p<0.001	p=0.004

表9 有効ヨウ素濃度減衰試験における試験区間の比較結果

対 比	開始時	15分後	減少量
1g/2L区 vs 3g/2L区	n. s.	p<0.01	n. s.
1g/2L区 vs 5g/2L区	p<0.05	p<0.01	p<0.05
3g/2L区 vs 5g/2L区	n. s.	p<0.01	p<0.01

n. s. : not-significant

## 考 察

### 1. KHV感染耐過魚から得られた生殖産物のウイルスの存在および受精卵の消毒効果

KHVは、塩基配列の解析から、魚類のヘルペスウイルス3型(CyHV-3)に分類され、遺伝的に近縁なウイルスとしてキンギョヘルペスウイルス性造血器壊死症ウイルス（以下GFHNV）が存在する<sup>9)</sup>。キンギョでは、GFHNV感染耐過魚の卵巣液や精液からウイルスゲノムが検出される事例が報告されている。また、ヨード剤による卵消毒試験では、

消毒を行わなかった群のふ化仔魚にはウイルスが検出される個体が存在したが、卵消毒を行った群のふ化稚魚からはGFHNVは検出されなかった<sup>10)</sup>。これらのことから、GFHNVについては、垂直感染が起きると推測されたが、ヨード剤を用いた卵消毒により垂直感染を防止できると考えられた。

一方、ニシキゴイでも垂直感染が起きるか否かを調査した結果、本試験では繁殖期のKHV感染耐過ニシキゴイの卵巣液、精液および未受精卵から、ウイルスゲノムは検出されなかった（表2）。しかし、福田らは、一般的な方法ではKHVが検出さ

れない感染耐過魚に対し、デキサメタゾンを投与することによりウイルスが検出される場合があることを報告している<sup>11)</sup>。そこで、本試験では、感染耐過魚から作出したふ化稚魚全てに対しデキサメタゾンを投与したが、未消毒区の個体からもKHVは検出されなかった。これらの結果から、KHV感染耐過魚であっても垂直感染が成立しないケースも存在すると考えられた。

しかし、本研究で分析した感染耐過魚数が少なかったことから、垂直感染が成立しないと判断するには至らなかった。従って、感染耐過親魚の数を増やし、今後も事例を重ね、垂直感染の有無を検証する必要があると考えられた。

## 2. 卵と精液をKHV液で攻撃した後、得られた受精卵の消毒効果

卵消毒によるKHVの垂直感染防止効果の解明を目的として試験を行った。未消毒区の卵のホモジネート液からはKHVゲノムが検出されると予想して試験を行ったが、試験の結果、KHVゲノムが検出されない未消毒卵が認められた(表3)。検出されなかった原因として、受精1~14時間後の間にウイルスゲノムが物理的に卵から流失したため受精14時間後には検出されなくなった、もしくは感染は成立したがKHVゲノムの量が検出限界以下であったことが考えられた。しかし、未消毒区の仔魚および稚魚からもKHVが検出されなかったことから、本実験では感染が成立しなかったと推測された。

このことから、KHVに対するヨード剤の消毒効果を明らかにできなかった。しかし、培養実験から、KHVは有効ヨウ素濃度200mg/Lで30秒以内に不活化されることが明らかにされている<sup>12)</sup>。さらに福田らは有機物が存在しない条件下では、12mg/Lの有効ヨウ素濃度でも30秒以上の消毒により不活化されると報告している<sup>13)</sup>。

一方、卵に付着している生菌数を指標に消毒効果を調べたところ、いずれの条件においてもヨード剤の浸漬後の生菌数が浸漬前より減少していた(表4)。これらの結果から、本試験の浸漬条件でもヨード剤は、卵表面の細菌に対して消毒効果

を発揮していると推測された。

以上のことから、仮に卵表面にKHVが付着したとしても、ヨード剤と50mg/L、15分間接触すれば、消毒効果は期待できるものと考えられた。

## 3. 卵に対する消毒の影響

ヨード剤を用いた卵消毒によって、生存性の低下や奇形の誘発が懸念される。そのため、卵や仔稚魚の成長に影響を及ぼさない消毒条件の把握が必要となる。

ニシキゴイの発眼期(受精62時間後)では、今回試験を行ったいずれの消毒条件においても、発眼率およびふ化率の低下は確認されず、通常のニシキゴイ生産で得られる値の範囲内であった。

一方、マゴイの発眼卵の卵消毒時における影響については、これまでいくつかの報告がなされている。佐野らは、有効ヨウ素濃度50mg/L・30分間の消毒処理のふ化率が85.5%で、無処理対照区と有意差がないこと明らかにし<sup>4)</sup>、福田ら<sup>13)</sup>および熊丸・柳田は200mg/L・15分間の処理でも影響がなかったことを報告している<sup>4)</sup>。これらの報告は、いずれも本試験の結果と一致していると考えられた。

さらに、養殖業者の作業を想定した補足試験も行った。試験は、きんらん(ニシキゴイ)の受精卵を付着させ、発眼期に50mg/L・15分間の消毒を行い、水量100Lの注水飼育条件で行った。重量換算(60粒/0.1g)による受精卵数とふ化仔魚数からふ化率を算出した結果、3回の試験の平均ふ化率は89.2%という高い値であった。

以上のことから、本試験で行った条件による発眼卵の消毒によって、発眼率およびふ化率が低下する可能性は極めて少ないと考えられた。

一方、発眼前(受精14~15時間後)の卵消毒試験では、200mg/L濃度のふ化率の平均値が、未消毒区に比べ有意に低かった。さらに、200mg/L・30分の処理群では発眼率も大きく低下した。それに対し、50mg/L濃度の処理群と無処理対照区の発眼率、ふ化率には有意差は認められなかった。発眼卵では、200mg/Lの消毒でも発眼率・ふ化率の低下が認められなかったことから、高濃度のヨード

剤に対しては、卵発生段階により感受性が異なると推定された。特に、受精14～15時間後に200mg/L濃度の卵消毒を行うと、卵発生に影響を与え、生存性の低下を招くと考えられた。

#### 4. 浸漬卵量と有効ヨウ素濃度の関係

ヨード剤で卵消毒を行うと、消毒時に卵や水に含まれる有機物にヨードが付着し、消毒処理時間中に有効ヨウ素濃度が低下する可能性が考えられた。そこで、本試験では、消毒卵量を増やし、消毒処理後の有効ヨウ素濃度を測定することにより、消毒処理の有効性を検証した。

本試験の結果から、消毒処理中に減少するヨウ素濃度は、消毒する卵量が増えると多くなる傾向が認められた。一方、平成21年に当試験場のニシキゴイ生産において、卵消毒を行った最大卵密度は1,500g/tであった。これは、本試験での3g/2Lで浸漬した場合に相当し、3g/2L区における15分後の有効ヨウ素濃度の平均値は40.6mg/Lであった(表8)。有機物が存在しない条件下では、12mg/Lの有効ヨウ素濃度、30秒以上の消毒によって、KHVは不活化される<sup>1)</sup>。本試験におけるヨード剤の希釈は、蒸留水で行っており、有機物は卵由来のものだけとみなすことができる。従って、消毒時の卵密度が1,500g/t以下であれば、KHVを不活化できる12mg/L・30秒以上の消毒条件を15分間維持できると考えられた。

しかし、ニシキゴイ生産者が行う卵消毒では、ヨード剤の希釈に蒸留水以外の水を用いることから、卵由来以外の有機物の混入が想定される。そのため、ヨード剤の希釈に用いる水、容器およびきんらんなどは清浄なものを可能な限り使用し、ヨウ素の減衰を防ぐ必要があるものと考えられた。

本研究の結果から、発眼期および受精14～15時間後の卵を用いて、有効ヨード濃度50mg/Lのヨード剤に15分間浸漬することにより、ニシキゴイ受精卵を安全に消毒できるものと考えられた。

#### 要約

KHV感染耐過魚の垂直感染に関する知見を得るとともに、ヨード剤を用いたニシキゴイ卵の安全で簡便な消毒方法を確立するため、消毒条件に関する試験を行った。

本試験に用いた感染耐過魚から得た未受精卵、精液、受精卵および卵巣液は、全てKHV陰性であった。

卵に付着している生菌数を指標に消毒効果を調べた結果、50mg/L・15分、50mg/L・30分、200mg/L・15分、200mg/L・30分のいずれの条件においてもヨード剤の浸漬後の生菌数が浸漬前より減少した。

発眼期(受精62時間後)に消毒(50mg/L・15分間、50mg/L・30分間、200mg/L・15分間、200mg/L・30分間)を行った卵の発眼率およびふ化率は、通常のニシキゴイ生産で得られる値の範囲内であり、未消毒区の発眼率およびふ化率との間に有意な差は認められなかった。

受精14～15時間後の卵では、50mg/L・15分間、50mg/L・30分間の消毒処理区と、未消毒区の発眼率およびふ化率との間に有意な差は認められなかった。

消毒処理中に減少するヨウ素濃度は、消毒する卵量が増えると多くなる傾向が認められたが、3g/2Lの卵密度で50mg/L・15分間消毒処理後の有効ヨウ素濃度の平均値は40.6mg/Lであり、KHVを不活化可能な濃度であった。

発眼期および受精14～15時間後の卵を用いて、有効ヨード濃度50mg/Lのヨード剤に15分間浸漬することにより、ニシキゴイ受精卵を安全に消毒できるものと考えられた。

#### 謝辞

本研究は、農林水産省「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業コイヘルペスウイルス病のまん延防止技術の開発」により行われた。本研究を実施するにあたり有益なご助言を頂いた北海道大学大学院水産科学研究院教授・吉水守博士並びに同助教・笠井久会博士に深謝致します。

また、有益なご助言を頂いた水産総合研究センター養殖研究所三輪理博士並びに渡辺研一博士に感謝致します。

#### 文 献

- 1) Sano, M., T. Ito, J. Kurita, T. Yanai, N. Watanabe, S. Miwa and T. Iida : First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus Carpio* in Japan. *Fish Pathol.*, 39, 165-167 (2004)
- 2) Yuasa, K., M. Kawana, T. Ito, M. Sano : A potential risk of fish surviving koi herpesvirus (KHV) disease as a source of viral infection. In 5th Fish International Symposium of The Japanese Society for Fish Pathology., 65 (2008)
- 3) 野村哲一・笠井久会 : さけ・ます増殖事業における防疫対策. さけ・ます資源管理センター技術情報. 169, 1-12 (2003)
- 4) 茨城県内水面水産試験場 : コイ乳頭腫ならびに稚魚期の不明病に関する研究. 茨城県内水面水産試験場研究報告 第28号 魚病委託研究報告 (昭和63年度～平成2年度) 総括集. 69-109 (1992)
- 5) Gilad O., S. Yun, K.B. Andree, M.A. Adkison, A. Zlotkin, H. Bercovier, A. Eldar and R.P. Hedrick : Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*. *Dis. Aquat. Org.*, 48, 101-108 (2002)
- 6) Yuasa K., M. Sano, J. Kurita, T. Ito and T. Iida : Improvement of a PCR method with the Sph I-5 primer set for the detection of Koi herpesvirus (KHV), *Fish Pathol.*, 40, 37-39 (2005)
- 7) 隆島史夫・村井衛編 : 水産増養殖システム 2 淡水魚. 137 (2005)
- 8) 三村元 : 海水中の残留オキシダントのオトリジン法による簡易測定. *水産増殖*. 47(1), 103-110 (1999)
- 9) Waltzek, B.T., G.O. Kelly, D.M. Stone, K. Way, L. Hanson, H. Fukuda, I. Hirono, T. Aoki, A.J. Davison and R.P. Hedrick : Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae. *J. Gen. Virol.*, 86, 1659-1667 (2005)
- 10) 田中深貴男・梅沢一弘 : 埼玉県におけるキンギョヘルペスウイルス性造血器壊死症の発生状況と防疫事例について. 埼玉県農業総合研究所研究報告. (2), 103-106 (2002)
- 11) 福田穎穂 : コイヘルペスウイルス病の昇温治療とその問題点. *魚病研究*. 42(4), 234 (2007)
- 12) Kasai, H., Y. Muto and M. Yoshimizu : Virucidal effects of ultraviolet, heat treatment and disinfectants against koi herpes-virus (KHV). *Fish Pathol.*, 40, 137-138 (2005)
- 13) 福田穎穂 : KHVとの共存のみち. *魚病研究*. 40(4), 204 (2005)