

茶葉抽出物と銅イオンを利用したニジマス卵管理

畑山 誠*・小出 展久

北海道立水産孵化場

Incubation of rainbow trout egg using green tea extract and copper fiber

MAKOTO HATAKEYAMA* AND NOBUHISA KOIDE

Hokkaido Fish Hatchery, Kitakashiwagi 3-373, Eniwa, Hokkaido 061-1433, Japan

Abstract The prevention of soft egg shell disease by treatment with green tea extract was demonstrated in rainbow trout fertilized eggs. The eggs were dipped in 0.2 % green tea extract for 30 min a maximum of six times and the hardness of the egg was evaluated using a fruit penetrometer. At 264 temperature units (degree · days), figures for the average hardness of the eggs treated once, twice, four times, six times and without treatment were 1.4, 1.6, 1.7, 1.7 and 0.9 kg, respectively. The eyed rate of the eggs without treatment was relatively low value (67.7%) when compared with those treated with green tea extract (77.8 to 80.2%). The hatching rate of the untreated eggs was 59.3%, while the rates for eggs treated once, twice, four times and six times were 76.8, 79.7, 53.7 and 44.4%, respectively. The cause of the low value observed in the hatching rates of the eggs treated four and six times respectively was considered to be the abnormal hatching due to over treatment. The joint usage of green tea extract to prevent soft egg shell disease and the copper ion used to control the water fungi infection was used to evaluate the effectiveness in rainbow trout fertilized eggs. The eggs were dipped in a green tea extract solution at 0.2 or 0.4% strength for 30 or 60 min. Following the green tea extract treatment, the eggs were incubated under running water containing $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of copper ion supplemented from the copper fiber until the eyed stage. During the test treatment, the dipping in the solution of green tea extract at 0.4% for 30 min followed by the incubation supplemented with copper ions successfully inhibited the occurrence of soft egg shell disease and the invasion of water fungi.

Key words : ニジマス, 茶葉抽出物, 銅イオン, 卵膜軟化症, ミズカビ

サケマス類の種卵を管理する上で起こる問題として、死卵に寄生するミズカビの繁茂と卵膜軟化症がある(野村, 2005)。卵膜軟化症は何らかの原因で卵の内圧が低下し、同時に卵膜はびらんし、潰れや早期孵化を引き起こす現象として知られている(川本, 1975)。新谷(1998)は北海道内のある孵化場において、卵管理に利用している三つの水源、すなわち河川水、湧水系河川水、湧水のうち、卵膜軟化症が発生する水源を湧水と特定している。伊澤ら(1998)は人工的にいくつかのイオンを孵化用水に添加する手法を用い卵膜軟化症の再現実験を行い、硫酸イオンの過剰が卵膜軟化症の原因と推測している。古くは高安ら(1934)が卵

膜軟化症の発生原因として微生物の関与を示唆しているが、新谷(1998)は前述の調査の中で三つの水源の細菌数をDAPI染色を用いた直接法により計数し、むしろ湧水は他の二つの用水と比較し細菌数が少ないことを報告している。

卵膜軟化症の発症原因に関しては不明な点があるものの、種卵を安全に管理する上では、ミズカビと卵膜軟化症の双方を、状況によっては同時に抑制する手法が必要である。平成15年度の薬事法改正を契機にこれまでいくつかの卵管理手法が開発された。三浦ら(2005)はニジマス *Oncorhynchus mykiss* の種卵に発生するミズカビの防除に銅イオンが有効であることを報

* E-mail: hatakeyamam@fishexp.pref.hokkaido.jp. Tel: 0123-32-2135. Fax: 0123-34-7233

告している。社団法人北海道さけ・ます増殖事業協会(2005)はシロサケ *Oncorhynchus keta* の卵管理試験を北海道立水産孵化場に委託し、ミズカビに対しては銅イオンの利用が、また卵膜軟化症に対して茶葉抽出物の利用が有効であることを報告している。佐々木ら(2008)もシロサケ卵を茶葉抽出物に浸漬すると卵膜軟化症を予防する効果を確認している。

本研究では、内水面養殖業の主体であるニジマスの種卵に対して茶葉抽出物を利用した卵膜軟化症抑制効果の確認を行い、また、ミズカビと卵膜軟化症を同時に抑制する手法として茶葉抽出物と銅イオンの併用試験を行った。

方 法

茶葉抽出物による卵膜軟化症予防試験

北海道内のニジマス養殖場にて2005年5月10日に採卵された受精直後卵を北海道立水産孵化場道東支場(北海道中標津町)に収容(水温9.1°Cの地下水)し、試験を行った。試験卵には、用水に溶解した濃度0.2%の茶葉抽出物(商品名:カメリアエキスAM; 太陽化学株式会社)への30分間の浸漬処理を、受精翌日に行い、以降約3~4日間隔で複数回繰り返した。茶葉抽出物処理の試験区は回数1, 2, 4, 6回のもものとコントロール(無処理)区を加え合計5区とした。茶葉抽出物処理は連続処理に基づき、積算水温18, 46, 82, 109, 146, 173度の各時点で行った。また、積算水温82, 146, 200, 264度の時点で新谷(1998)の方法を参考に、各区25粒の卵の断裂強度を、加重部面積0.5 cm²の果実硬度計(株式会社木屋製作所)により測定した。この方法は果実硬度計の加重部を卵にあって手で徐々に加重し、卵膜が断裂する時点での加重量を卵膜の強度として評価するものである。加重は卵膜の内側全体に分散され、加重が一定量を超過した時点で卵膜は断裂する。そのため、断裂強度の表記単位について、本来は(加重量)・(卵膜の表面積)⁻¹等の単位で表記されるべきところであるが、本試験では各区とも同じロットの卵を用いているため、単純に加重量(kg)のみの表記とした。各区の平均断裂強度は積算水温ごとにANOVA(One-way factorial analysis of variance)により平均値の比較を行い、差がみられた場合 Bonferroni Inequality test により無処理区と各処理区の差を検定した。統計計算には ystat2000.xls (医学図書出版株式会社)を用いた。積算水温264度の時

点では6回の茶葉抽出物処理を行った卵および無処理の卵について卵表面の構造を定法に従い走査型電子顕微鏡(S-510, 株式会社日立製作所)で観察した。なお、卵の茶葉抽出物処理と断裂強度の測定を同日に行う場合は断裂強度の測定を先に行うこととした。各区の卵は孵化まで管理し、それぞれ発眼率、孵化率を算出した。

茶葉抽出物と銅イオンの併用試験

上川漁業生産組合(北海道上川町)で試験卵の管理を行った。試験には2007年4月9日に、この養殖場で養成された複数のニジマス親魚より採卵された受精卵を使用した。試験卵は施設内の孵化室に導水されている水温7.5°Cの湧水で管理した。一定濃度の銅イオンを常時、用水に添加する手法として、市販の銅ファイバー(Fig. 1, 日本スチールウール株式会社)を孵化器の卵収容部上手に投入した。銅ファイバーの投入量は毎分10 Lの孵化用水に対して80gとし、投入前後の用水の銅イオン濃度は偏光式ゼーマン原子吸光度計Z-6000(株式会社日立製作所)を用い、常法に従い測定した。銅ファイバーは投入後3週間が経過した時点で交換した。前述の茶葉抽出物は濃度を0.2%および0.4%、浸漬時間を30分および60分として受精直後卵を処理した。試験区はカテキンの濃度について0.2%および0.4%処理、浸漬時間について30分および60分処理、更に銅ファイバーの併用、非併用があり、これらの組み合わせで8区、更にコントロール(無処理)区と銅ファイバーのみ使用した区を加え合計10区とした。積算水温210度の時点で全ての試験区の発眼率、ミズカビ寄生率(ミズカビ寄生卵数・全



Fig. 1 Copper fiber used in this study as the source of copper ions.

Table 1 Hardness of the egg treated with green tea extract at several temperature unit

Times of the treatment with green tea extract ^{†1}	Egg hardness (kg) at each temperature unit (degree · days) ^{†2}			
	82 unit	146 unit	200 unit	264 unit
No treatment	1.0 ± 0.3	1.2 ± 0.4	1.1 ± 0.4	0.9 ± 0.5
1	1.6 ± 0.4**	1.6 ± 0.4**	1.6 ± 0.4**	1.4 ± 0.3**
2	1.6 ± 0.3**	1.5 ± 0.3**	1.7 ± 0.3**	1.6 ± 0.2**
4	-	1.7 ± 0.3**	1.8 ± 0.3**	1.7 ± 0.2**
6	-	-	1.8 ± 0.4**	1.7 ± 0.6**

Values indicate mean ± standard deviation

^{†1} : The treatment of eggs was dipping in the solution of green tea extract at 0.2 % for 30 min.

^{†2} : Egg hardness was measured by a fruit penetrometer .

** : Significant difference with no treatment egg at the same temperature unit ($p < 0.01$)

死卵数¹⁾を算出するとともに果実硬度計により卵の断裂強度を前述と同様に測定した。各区の平均断裂強度の比較は前述と同様に行った。また、全試験区について銅ファイバー処理区と非処理区の2群に分け、発眼率及びミズカビ寄生率の差を Mann-Whitney U-test により比較した。統計計算には ystat2000.xls を用いた。

結 果

茶葉抽出物による卵膜軟化症予防試験

各試験卵の積算水温ごとの断裂強度の平均値を Table 1 に示す。茶葉抽出物で処理した各区は、全ての処理回数において同時期の無処理区よりも有意に断裂強度が高かった ($p < 0.01$)。各試験区が発眼率、孵化率を Table 2 に示す。発眼率は無処理区で 67.7%であったが、茶葉抽出物の処理を行ったものは、77.8 から 80.2%であり、無処理区と比較するとそれぞれ約 10 ポイント高かった。孵化率は無処理が 59.3%であったのに対し、1 回処理が 76.8%、2 回処理が 79.7%と約 20 ポイント高かった。しかし、4 回処理、6 回処理では孵化時に卵膜が完全に溶解せず、魚体の一部のみが卵膜外に露出し、やがて死亡する現象が見られたため孵化率は低く、4 回処理で 53.7%、6 回処理では 44.4%となった。合計 6 回の茶葉抽出物処理を行った卵および無処理の卵の表面の走査型電子顕微鏡像を Fig. 2 に示す。6 回の茶葉抽出物処理を行った卵表面は無処理の卵とは異なり、全面に滑らかな隆起が連続する構造を示していた。

茶葉抽出物と銅イオンの併用試験

銅ファイバーを投入しない孵化用水に含まれる銅イオン濃度は $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ であったが、投入した孵化用

Table 2 Eyed rate and hatching rate of the egg treated with green tea extract

Times of the treatment with green tea extract	Eyed rate (%)	Hatching Rate (%)
0	67.7	59.3
1	77.8	76.8
2	80.1	79.7
4	78.7	53.7
6	80.2	44.4

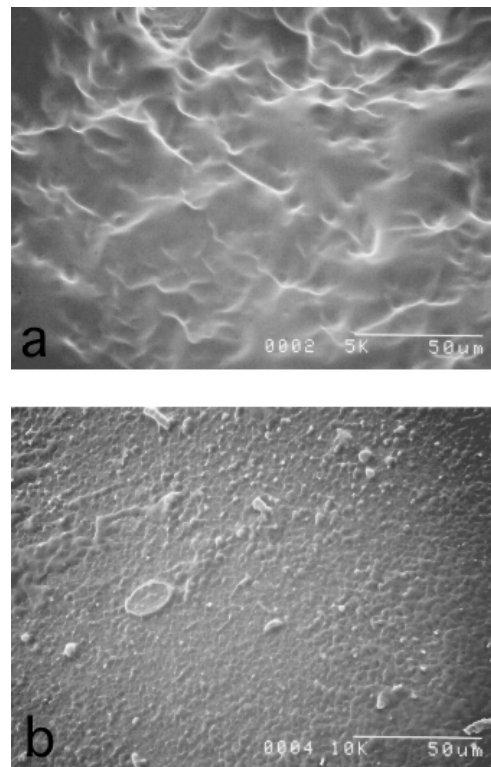


Fig. 2 Surface of the egg treated with green tea extract (SEM). The letters of a and b indicate the egg surface treated with green tea extract six times and the surface of the egg without treatment, respectively.

水の銅イオン濃度は $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ であった。各試験区の発眼率、ミズカビ寄生率、平均断裂強度を Table 3 に示す。全ての試験区で発眼率は 95% 以上であった。ミズカビ寄生率は銅イオン非併用の各区で 48.1 から 70.6% であったのに対し、銅イオン併用各区では 26.2 から 40.5% であった。銅イオン併用各区と非併用各区を比較した結果、発眼率に統計的な有意差はなく、ミズカビ寄生率には有意差があった ($p < 0.01$)。銅イオンを添加していない茶葉抽出物処理各区の平均断裂強度をコントロール区と比較した場合、濃度 0.2% で 30 分の処理区 ($p < 0.05$)、および 60 分の処理区 ($p < 0.01$)、濃度 0.4% で 30 分および 60 分の処理区 ($p < 0.01$) のすべてで有意に高くなっていた。一方、銅イオンを併用した区内では、コントロール区よりも有意に断裂強度が高かったのは、茶葉抽出物 0.4% で 30 分の処理区のみであった ($p < 0.05$)。

考 察

川本 (1975) は卵膜軟化症について卵の内圧低下と卵膜の脆弱化を特徴とする現象と記載している。Alderdice *et al.* (1983) は卵膜軟化症を診断する指標として、ヒトの眼球の内圧を測定する方法を応用し、天秤の片側にスライドグラス等を取り付けた装置を用い、卵に一定重量を加重し、スライドグラスと卵の接触面積により卵の内圧を測定する手法を開発している。

本試験では卵膜の脆弱さ、潰れ易さを測定する手法として、果実硬度計を用い、卵膜が断裂するときの加重量を卵膜軟化症の指標とした。果実硬度計は小型で電源も必要としないため、孵化場等の飼育現場で使用するには簡便な機器と言える。

茶葉抽出物による卵膜軟化症予防試験において、断裂強度は茶葉抽出物処理を行った全ての区の各積算水温でコントロール区と有意な差があり、卵膜軟化症の予防効果が確認された。茶葉抽出物の何らかの成分が卵膜に影響を与え、表面を保護あるいは強化することが、卵膜軟化症を予防する主たる働きと考えられるが、過度に処理した場合は孵化時に卵膜が完全に溶解せず、孵化に障害がでることが分かった。孵化に障害がでた 6 回の茶葉抽出物処理を行った卵の表面は滑らかな隆起が連続する構造を示していた。この構造の成因は不明であるが、卵表面を覆っている隆起が茶葉抽出物の何らかの成分であったと仮定するならば、過度な処理が卵膜に厚い皮膜を形成し孵化障害を起こしたと考えられることができる。発眼率は茶葉抽出物処理を行ったものでは 77.8 から 80.2% であったのに対し、コントロール区が 67.7% であった。孵化率は茶葉抽出物 1, 2 回処理でコントロール区に比べ約 10 ポイント高かった。これら発眼率や孵化率の成績の向上については、必ずしも卵の断裂強度が上昇したためとは断定できないものの、各試験区は同じ卵群を使用したものであることから、少なくとも茶葉抽出物処理が何らかの良い影響

Table 3 The joint use of copper ion and green tea extract for rainbow trout eggs

Treatment		Eyed rate (%)	Infection rate of water fungi (%) ^{†2}	Egg hardness (kg) ^{†3}
Copper fiber ^{†1}	Green tea extract			
none	none	95.7	70.6	1.4 ± 0.7
	0.2 %, 30 min	96.6	59.6	1.7 ± 0.6*
	0.2 %, 60 min	96.1	57.9	1.8 ± 0.4**
	0.4 %, 30 min	97.0	69.2	1.8 ± 0.6**
	0.4 %, 60 min	97.2	48.1	1.9 ± 0.3**
80 g	none	96.3	26.2	1.2 ± 0.7
	0.2 %, 30 min	96.2	32.6	1.6 ± 0.5
	0.2 %, 60 min	97.2	39.2	1.5 ± 0.6
	0.4 %, 30 min	97.1	40.5	1.7 ± 0.5*
	0.4 %, 60 min	96.8	34.8	1.6 ± 0.5

^{†1} : Weight of copper fiber dipped into the running water at $10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$

^{†2} : Infected eggs · Dead eggs⁻¹ (in percentage)

^{†3} : Mean ± Standard deviation

* : Significant difference with none-treatment egg ($p < 0.05$)

** : Significant difference with none-treatment egg ($p < 0.01$)

を与えた結果と考えられる。

茶葉抽出物と銅イオンの併用試験において、使用した用水の銅イオン濃度は $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ で、三浦ら (2005) が効果があるとする 5.0 から $20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ の範囲内であった。ミズカビ寄生率は銅イオン非併用区に比べ、銅イオン併用区が有意に低く、銅イオンのミズカビ抑制効果が確認された。銅イオンを添加しない条件での卵の断裂強度は、全茶葉抽出物処理区がコントロール区よりも有意に高く、有意水準は茶葉抽出物濃度 0.2% で 30 分の処理区では $p < 0.05$ 、濃度 0.2% で 60 分の処理区、濃度 0.4% で 30 分および 60 分の処理区で $p < 0.01$ だったことから、処理時間は長時間の方が、処理濃度は高濃度の方が断裂強度を高くすると考えられた。銅イオンを併用した場合は、茶葉抽出物処理の時間や濃度と断裂強度の関係性はみられず、コントロール区より有意に断裂強度が高かったのは、濃度 0.4% で 30 分の処理区のみで ($p < 0.05$)、銅イオンを併用した場合、茶葉抽出物による卵膜強化効果が薄れる可能性のあることが示唆された。

従って、断裂強度については、茶葉抽出物のみでの処理の方が良好な結果が得られると考えられるものの、茶葉抽出物処理と銅イオン処理を併用しても、発眼率等が低下するような危険性は無く、少なくとも受精吸水後に 0.4% の濃度で 30 分間の茶葉抽出物処理を行い、その後、孵化用水に銅イオンを $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ となるよう添加し管理した場合、ミズカビを抑制しながら、断裂強度を高くすることが可能で、実用的レベルでの両効果は失われないものと考えられた。

卵膜軟化症は、発眼率・孵化率の低下あるいは軽微な加重による潰卵などの実害が発生しない場合は問題とはならないため、対処の必要性に関しては症状の程度により判断するしかない。また、他の疾病のように異常と正常の境界がないため、断裂強度等を測定しても明確な診断基準を設定する事は困難であるが、卵成績の低下等の問題が発生した孵化場において、卵膜軟化症が関与しているか否かを判断する材料として、今後、何らかの数値的基準は示されるべきものと考えられる。

要 約

1. 卵膜軟化症を茶葉抽出物により予防する効果をニジマス卵で確認した。
2. ニジマス卵を茶葉抽出物水溶液に浸漬処理 (0.2

$\%$, 30 分) した場合、卵の断裂強度は高くなり、また発眼率も改善された。

3. 茶葉抽出物の処理回数が 4 から 6 回では孵化異常が起こった。
4. ニジマス受精直後卵に対し茶葉抽出物を 0.4% で 30 分間の浸漬処理を行い、 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ となるよう銅イオンを孵化用水に添加することで、卵膜軟化症とミズカビの繁茂を同時に抑制することができた。

謝 辞

本研究のために試験スペースならびに試験卵をご提供頂き、更には、より実用的な卵管理方法について貴重なご意見を頂いた上川漁業生産組合明石頼幸組合長に深謝申し上げます。

文 献

- 新谷康二 (1998). 森支場で池産サクラマス卵に発生した卵膜軟化症について. 魚と水, **35**,13-18.
- Alderdice, D. F., Jensen, J. O. and Velsen, F. P. J. (1983). Measurement of hydrostatic pressure in salmonid eggs. *Canadian journal of zoology*, **62**, 1977-1987.
- 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**,13-18.
- 川本信之 (1975). 水産学全集 22 養魚学総論, 恒星社厚生閣, 270-272.
- 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**, 43-47.
- 社団法人北海道さけ・ます増殖事業協会 (2005). 水カビ病・卵膜軟化症および原虫病対策の代替法マニュアル. 3-12.
- 高安三次・武田志摩之輔・大野磯吉 (1934). 西別鮭鱒孵化場鮭卵被害調査. 水産調査報告, 1-140.
- 野村哲一 (2005). さけ・ます卵の病気. さけます資源管理センター技術情報, 29-43.
- 三浦正之・大野平祐・土田奈々・畑井喜司雄・桐生透 (2005). 銅ファイバー浸漬によるニジマス卵のミズカビ病の防除. 魚病研究, **40**, 81-86.