

静岡水技研研報(43) : 29-34, 2008  
Bull. Shizuoka Pref. Res. Inst. Fish. (43):29-34, 2008

## ニジマス種卵管理における抗菌めっきを利用した 水カビ病の防除

中村永介<sup>\*1</sup>・青島秀治<sup>\*2</sup>・渡辺清<sup>\*1</sup>・中山武典<sup>\*3</sup>・田中俊夫<sup>\*4</sup>

Control of Fungal Infection in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Eggs  
by Using Antimicrobial Coating

Eisuke Nakamura, Shuji Aoshima, Kiyoshi Watanabe,  
Takenori Nakayama and Toshio Tanaka

キーワード：水カビ病, ニジマス, 抗菌めっき, 発眼率, ふ化率

### Abstract

We examined the antifungal efficacy of antibacterial coating against fungal infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* eggs. KENIFINE is a specialty electroplating technology, which produces antibacterial properties on stainless. Results of antifungal laboratory test showed that metal plate coating with prevented growth of fungal filament *Saprolegnia diclina*. Antibacterial coating plated stainless wire netting of hatching tray were used to store fertilized eggs. Effects of antibacterial coated netting were examined including prevention of fungal growth on the surface of dead eggs, infection to nearby lived eggs and enlargement of fungal damage. Fungal infection ratio in dead eggs of non-coated stainless was 91.9%, while in antibacterial coated stainless, the ratio was 52.2%. Hatching rate of antibacterial coated was 59.9%, twice as non-coated stainless. Antibacterial coating was observed to be not toxic to development of eggs.

### はじめに

水カビは、魚類の飼育用水中に常在している卵菌綱 Oomycetes ミズカビ目 Saprolegniales ミズカビ科 Saprolegniaceae のミズカビ属 *Saprolegnia*, ワタカビ属 *Achlya*, 及びアファノマイセス属 *Aphanomyces* の水生菌であり、水カビ病はこれらを原因とする真菌性疾病の総

称である。このうち *Saprolegnia* 属の水生菌をミズカビと呼ぶ。サケ科魚類の種苗生産時に受精卵に発生するのは、主に本菌によるものであるため、ミズカビ病とも呼ばれる<sup>1,2)</sup>。サケ科魚類の卵は受精からふ化までに数週間を要するが、この期間に水カビ病が発生することが多い。そのため、サケ科魚類の種苗生産施設では、受精卵管理時における水カビ病対策が卵の生産に大きく影響する<sup>3,4)</sup>。

---

2008年1月9日受理

静岡県水産技術研究所富士土養鱒場業績第39号

\*<sup>1</sup>静岡県水産技術研究所富士養鱒場

\*<sup>2</sup>静岡県水産技術研究所富士養鱒場、現静岡県産業部管理局企画監付企画スタッフ

\*<sup>3</sup>株式会社 神戸製鋼所

\*<sup>4</sup>富士養鱒漁業協同組合虹の里事業所

水カビ病は、環境水中に存在する水カビの遊走子が卵表面を基質として付着し、菌糸を発育させることで発生する。特に管理する受精卵の中に死卵が混在していた場合、まず、死卵が水カビ病に感染し、死卵から菌糸を繁茂させることで外観的には綿毛状になる。一度発生した水カビ病は、死卵だけでなく周辺の活卵にも容易に感染し、菌糸を伸長させて卵を包み込み窒息させてしまう。さらに、卵管理用ふ化盆の金網に付着すると金網の目詰まりにより通水が滞るために受精卵の大量死の原因となる。

従来、水カビ病対策には、アリルメタン系の弱塩基性色素であるマラカイトグリーンが使用されていた<sup>5,6)</sup>。しかし、薬事法関係省令の改正に伴って2005年8月以降その使用は全面的に禁止された。

銅などの金属はイオン化すると、殺菌力を有することが一般的に知られており、その抗菌性は様々な分野で活用されている。サケ科魚類の受精卵管理においても銅纖維を利用することで、水カビ病の防除効果が得られることが報告されている<sup>7,8)</sup>。しかし、毒性が強いことから適正な濃度で使用しないと卵の死亡が起こるなど問題点も指摘されている。一方、強い抗菌性を特長とするニッケル系合金めっき技術（株式会社神戸製鋼「ケニファイン<sup>\*</sup>」）は、従来の抗菌技術に比べ抗菌、防カビに優れ<sup>9)</sup>、高い安全性が確認されており、受精卵管理時における新たな水カビ病防除策としてこの抗菌性めっき（以降「Ni 抗菌めっき」と称する）を利用することを試みたので報告する。

## 材 料 と 方 法

### 1 ミズカビに対する Ni 抗菌めっきの影響

供試菌には静岡県水産技術研究所富士養鱒場でニジマス *Onchorhynchus mykiss* の死卵から分離されたミズカビ *Saprolegrina diclina* SFR0601 株を用いた。

#### (1) ミズカビ菌糸の発育に与える影響

Ni 抗菌めっきした 5×5cm (1mm 厚) 角のステンレス金属板 (Ni 抗菌めっき区)、及び同型のめっきしていないステンレス金属板 (ステンレス区) をエタノールで消毒して、それぞれ滅菌シャーレに入れ、GY 液体培地<sup>10)</sup>を約 15ml 加えた。また、金属板を入れずに GY 液体培地のみを入れたものを対照区とした。別の GY 液体培地に菌糸体を接種し、3 日間 25°Cで前培養した。発育が良好な周辺部を切り出し、水分を軽く切った約 0.1g を Ni 抗菌めっき区及びステンレス区の金属板上、並びに対照区のシャーレ中

に接種した。25°Cで 6 日間培養した後に菌糸体の湿重量を測定した。

続いて、各区より菌糸体約 0.1g を切り出して、新しく用意した GY 液体培地を約 15ml ずつ入れた 3 枚のシャーレに接種した。25°Cで更に 6 日間培養した後に菌糸体の湿重量を測定した。

#### (2) 遊走子に与える影響

Ni 抗菌めっきしたステンレス金属板 (Ni 抗菌めっき区)、及びめっきしていないステンレス金属板 (ステンレス区) をエタノールで消毒して、それぞれ滅菌シャーレに入れ、滅菌水道水を約 15ml 加えた。対照区として金属板を入れずに滅菌水道水のみを入れたものを用いた。(1)と同様の方法で前培養したミズカビ菌糸体から周辺部を切り出し、水分を軽く切った 0.1g を各区のシャーレに接種し、25°Cで一晩培養した。菌糸体及び金属板を取り除いた後に各シャーレに GY 液体培地を 1ml 加え、更に 3 日間 25°Cで培養して菌糸体の発育を目視で確認した。

## 2 消毒剤による Ni 抗菌めっきへの影響

#### (1) 消毒剤が Ni 抗菌めっきへ与える影響

5×5cm 角 (1mm 厚) Ni 抗菌めっきしたステンレス金属板をシャーレに入れ、通常使用濃度の 10 倍に調整した消毒剤溶液(第 1 表)を加えて 24 時間静置した。消毒剤には、養鱒業で使用頻度の高い塩素剤、有機ヨウ素剤、陽イオン界面活性剤を用い、対照区は滅菌水道水とした。その後、金属板の表面を肉眼観察して影響を調べた。

第 1 表 試験区と消毒剤濃度

試験区	消毒剤名	濃度(mg/l)
塩素区	次亜塩素酸カルシウム	10
有機ヨウ素区	ポビドンヨード	500
陽イオン界面活性剤区	塩化ベンザルコニウム	1,000
対照区	水道水	—

#### (2) 消毒後の Ni 抗菌めっきのミズカビ静菌効果

試験 2 - (1)の消毒終了後に 3 試験区 (塩素区、有機ヨウ素区、対照区) の Ni 抗菌めっき金属板をそれぞれ滅菌シャーレに入れ、GY 液体培地を約 15ml 加えた。あらかじめ GY 液体培地で 3 日間前培養したミズカビ菌糸体から発育が良好な周辺部約を切り出し、水分を軽く切った 0.05g を各シャーレに接種した。25°Cで 6 日間培養した後に菌糸体の湿重量を測定した。

\* 「ケニファイン」：2004 年「第 27 回日本金属学会技術開発賞受賞」

## 結 果

### 3 Ni 抗菌めっきを用いたニジマス卵の管理

供試卵には静岡県水産技術研究所富士養鱒場で飼育中のニジマス3年魚から採卵・受精させたものを用いた。受精卵は1時間以上吸水させた後、水産用有機ヨウ素剤(0.05%ポビドンヨード)で定法により消毒し、死卵を取り除いたものを用いた。

#### (1) Ni 抗菌めっきが受精卵に与える影響

Ni 抗菌めっきが環境水中に存在することにより、受精卵の発生に何らかの影響を与えるかについて検討した。Ni 抗菌めっきしたステンレス金属板(Ni 抗菌めっき区)、試験2-(1)のNi 抗菌めっきしたステンレス金属板を塩素溶液中に一晩浸透させたもの(塩素消毒 Ni 抗菌めっき区)及びステンレス金属板(ステンレス区)の各金属板とニジマス受精卵50g(約635粒)ずつを500ml容のポリエチレン製容器に入れ、対照区は受精卵のみを入れた。この容器に試験場内の10°Cの地下水を通水し0.2ℓ/分の流水で管理した。収容20日後に発眼卵数を計数し、35日後に正常ふ化仔魚数を計数した。

#### (2) 水カビ病防除試験

種苗生産施設内でNi 抗菌めっき金網をふ化盆に使用した場合の効果を調べた。

檜材で作製した外枠(39cm×25cm、高さ3cm)に、Ni 抗菌めっきしたステンレス網(2mm目)を張り付け、ふ化盆を作製した(Ni 抗菌めっき区)。同様に、めっきしていないステンレス網を取り付けた対照用のふ化盆も作製した(ステンレス区)。

供試卵数は1区当たり1,500gとし、供試卵を上記ふ化盆5枚に300gずつ入れ、5枚重ねて収容槽に収容した。通水は収容槽の下部から行い、下段から上段に各ふ化盆を通過する仕組みとした。4ℓ/分の流水で管理し、換水率は12回転/時間とした。

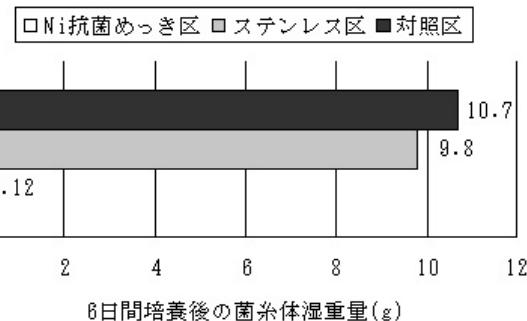
供試卵の発生が発眼まで進行した20日目に供試卵を発眼卵と死卵に分けて発眼率(発眼卵数/供試卵数×100)を求めた。また、死卵の水カビの付着を肉眼で判断し、水カビ寄生率(水カビ寄生死卵数/死卵数×100)も求めた。検卵後にふ化盆、収容槽、及び発眼卵を水産用有機ヨウ素剤(0.05%ポビドンヨード)で定法により消毒した後、引き続きそれぞれのふ化盆に発眼卵を収容し、ふ化仔魚が得られるまで管理した。得られた正常ふ化仔魚を計数し、孵化率(正常ふ化仔魚数/供試卵数×100)を求めた。

### 1 ミズカビに対する Ni 抗菌めっきの影響

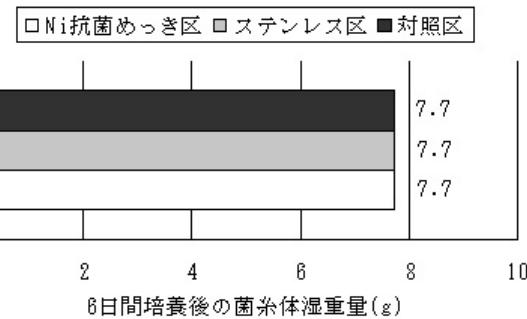
#### (1) ミズカビ菌糸の発育に与える影響

3試験区における試験開始から6日後の菌糸体湿重量は、ステンレス区と対照区において開始時重量の約100倍となつたが、Ni 抗菌めっき区においては開始時重量からほとんど変化がなく、菌糸の発育はほとんどみられなかった(第1図)。ステンレス区と対照区には有意差はなく、Ni 抗菌めっき区はそれぞれに対して有意となった(t検定、p>0.05)。

再接種後の3試験区における6日後の菌糸体湿重量は、ステンレス区、Ni 抗菌めっき区、対照区のどの区においても開始時の菌糸体重量の約80倍となり、3試験区において有意な差はみられなかった(第2図、t検定、p>0.05)。



第1図 金属板存在下において6日間培養後のミズカビ菌糸体湿重量



第2図 金属板存在下にあったミズカビ菌糸体を非存在下において6日間培養後の湿重量

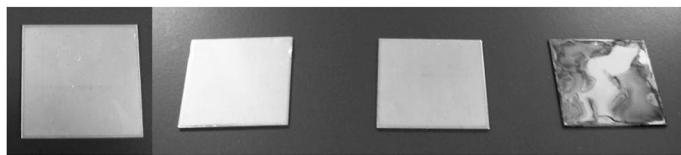
#### (2) 遊走子に与える影響

試験開始3日後には全ての試験区において菌糸の発育が肉眼で確認された。

### 2 消毒剤による Ni 抗菌めっきへの影響

#### (1) 消毒剤が Ni 抗菌めっきに与える影響

消毒剤溶液中にNi 抗菌めっきしたステンレス板を24時間静置したところ、有機ヨウ素区、陽イオン界面活性剤

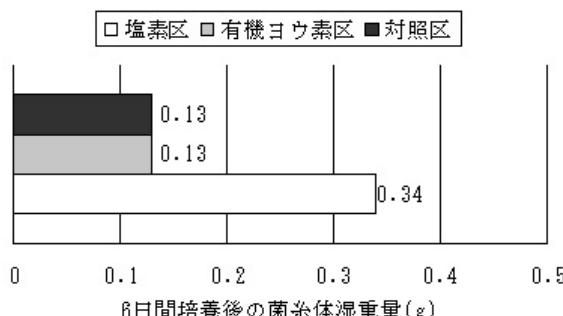


第3図 消毒剤中に24時間浸したケニファイン金属片  
(左:対照区 中左:有機ヨウ素区 中右:陽イオン界面活性剤区 右:塩素区)

区では変化がなかったが、塩素区では表面が黒変し、金属の酸化様の現象がみられた（第3図）。

## (2) 消毒後の Ni 抗菌めっきのミズカビ静菌効果

3試験区における6日後の菌糸の湿重量は、有機ヨウ素区と対照区間において有意な差がみられなかった（二標本t検定,  $p>0.05$ ）。塩素区においては菌糸が増加し、対照区に比べ有意に増加した（第4図, t検定,  $p<0.01$ ）。

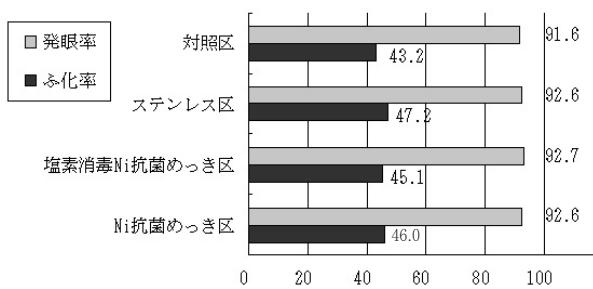


第4図 消毒剤溶液に浸透した金属板存在下において  
6日間培養後のミズカビ菌糸体湿重量

## 3 Ni 抗菌めっきを用いたニジマス卵の管理

### (1) Ni 抗菌めっきが受精卵に与える影響

いずれの区においても発眼率は90%以上、ふ化率は45%前後となった（第5図）。発眼率、ふ化率ともに対照区がわずかに低くなったが、試験区ごとで有意差はみられなかった（ $\chi^2$ 検定,  $p>0.05$ ）。なお、水カビ病の発生はすべての区において確認できなかった。

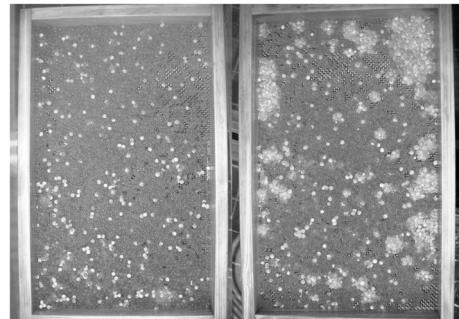


第5図 Ni 抗菌めっき金属板が受精卵の発眼率・  
ふ化率に与える影響(%)

### (2) 水カビ病防除試験

20日目のNi抗菌めっき区、ステンレス区のふ化盆の様

子を示した。Ni 抗菌めっき区では白化した死卵が散在していたが、ステンレス区においては水カビの寄生した死卵がかたまって菌塊を形成していた（第6図）。



第6図 20日目の受精卵の様子  
(左:Ni 抗菌めっき区 右:ステンレス区)

### ① 発眼率・水カビ寄生率

5枚のふ化盆の個々の値を比較すると、発眼率ではNi 抗菌めっき区が84.5~88.5%，ステンレス区が28.5~80.4%となり、平均値ではNi 抗菌めっき区が86.4%，ステンレス区が63.0%となった（第2表）。

第2表 発眼率及び水カビ寄生率(%)

試験区	発眼率(%)		死亡率(%)		水カビ寄生率(%)
	カビなし	カビあり	カビなし	カビあり	
ステンレス区	上	28.5	4.9	66.7	93.2
	中上	63.2	3.9	32.9	89.4
	中	66.2	1.9	32.0	94.4
	中下	76.9	2.1	21.0	90.9
	下	80.4	2.4	17.2	87.8
Ni 抗菌めっき区	上	88.5	5.4	6.1	53.0
	中上	84.5	6.6	8.9	57.4
	中	85.4	6.6	8.0	54.8
	中下	86.7	7.2	6.1	45.9
	下	87.0	6.8	6.2	47.7
ステンレス区	平均	63.0	3.0	34.0	91.8
Ni 抗菌めっき区	平均	86.4	6.5	7.1	52.0

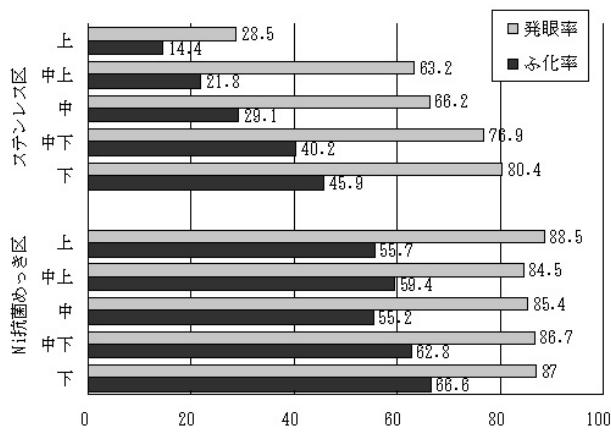
※各区5枚のふ化盆の個別結果、下段が上流側

さらに、全供試卵の中で水カビの寄生していた死卵の割合（カビあり死亡率）ではNi 抗菌めっき区が6.1~8.9%，平均7.1%，ステンレス区が17.2~66.7%，平均34.0%となった（第2表）。

水カビ寄生率（第2表）の平均は、ステンレス区では91.8%とほとんどの死卵に水カビがみられたが、Ni 抗菌めっき区では52.0%であり、水カビの寄生した割合が有意に低かった（ $\chi^2$ 検定,  $p<0.01$ ）。

## ② ふ化率

ふ化率は Ni 抗菌めっき区が 55.2~66.6%，ステンレス区が 14.4~45.9%で、平均値では Ni 抗菌めっき区が 59.9%と、ステンレス区 30.3%の約 2 倍となり、発眼率・ふ化率ともに Ni 抗菌めっき区が有意に上回っていた（第 7 図、 $\chi^2$  検定、 $p<0.01$ ）。また、ステンレス区においては、ふ化盆の収容位置により発眼率・ふ化率に差が見られ、通水の上流である下段が最も良好で、上の段にいくほど低下していた。Ni 抗菌めっき区ではこの傾向はみられず、ふ化盆による発眼率・ふ化率の差は少なかった。ふ化仔魚計数時には試験区、対照区ともに全ての死卵に水カビが寄生していた。



第 7 図 発眼率及び正常魚ふ化率(%)

## 考 察

### 1 ミズカビに対する Ni 抗菌めっきの影響

本試験において Ni 抗菌めっき区で菌糸の発育がみられなかっことから、Ni 抗菌めっきのミズカビに対する抑制効果が明らかとなった。しかし、Ni 抗菌めっき存在下で 6 日間発育しなかったミズカビが Ni 抗菌めっきを除去したところ、再び発育したことから、殺菌はされていないと考えられる。また、Ni 抗菌めっきとミズカビを除去した液を培養したところミズカビが確認できたことから、Ni 抗菌めっき存在下においても遊走子の産出が行われていることがわかった。

Ni 抗菌めっき技術は、給食施設内器材へのめっきによる付着細菌数の減少効果や、コロナウィルスへの消長効果があると報告されている<sup>11)</sup>。今回のミズカビに対しては、殺菌性は確認できなかったものの静菌作用が明らかとなった。通常の卵管理においては、死卵に発生した水カビが正常卵に拡大するのを防ぐことが重要であり、菌糸の発育が抑制できれば実用的に十分と考えられる。

## 2 消毒剤による Ni 抗菌めっきへの影響

塩素系消毒剤により Ni 抗菌めっき表面が黒変し、酸化様の変化がみられたことや、ミズカビを抑制する能力の低下がみられたことから、塩素系消毒剤は Ni 抗菌めっきを使用した器具の消毒には適さないことが明らかとなった。一方、有機ヨウ素系消毒剤または陽イオン界面活性剤は Ni 抗菌めっきに影響を示さなかったことから、Ni 抗菌めっきした器具や設備の消毒に適していると考えられる。

## 3 Ni 抗菌めっきを用いたニジマス卵の管理

魚類の発生段階では外部環境の影響を受けやすい。今回の結果から、Ni 抗菌めっきや塩素消毒後の Ni 抗菌めっき存在下においても発眼率やふ化率は低下せず、卵の発生への明らかな障害はみられなかった。Ni 抗菌めっきの安全性としては、ラットでの急性経口毒性試験（日本食品分析センター：第 598070191-001 号）、刺激症状発症率の皮膚貼付試験（生活科学研究所：第 01-XII-0501 号）に合格していることから、ニジマス等の魚類に対しても安全性は高いものと考えられる。

Ni 抗菌めっきの金網を用いたニジマス卵管理試験では、ステンレス区に比べて Ni 抗菌めっき区で水カビ病の発生が抑えられていた。水カビ寄生率はステンレス区では 91.8%と、ほぼ全ての死卵に水カビの菌糸が確認されたのに対し、Ni 抗菌めっき区では約半分の 52.0%となった。このように死卵への水カビ寄生を有意に抑制していた（ $\chi^2$  検定、 $p<0.01$ ）。一般的にニジマスを始めとするサケ科魚類の卵管理では、発生が進んで発眼した時期に活卵と死卵を選別する検卵を行う。このとき、水カビ病が発生した死卵が多いと作業が煩雑になることからも有効であるといえる。発眼率の平均値は Ni 抗菌めっき区 86.4%，ステンレス区 63.0%，ふ化率の平均値は Ni 抗菌めっき区 59.9%，ステンレス区 30.3%となり、発眼率・ふ化率ともに Ni 抗菌めっき区が有意に上回っており、卵管理に有効といえる（ $\chi^2$  検定、 $p<0.01$ ）。また、発眼卵を 100 とした場合のふ化率は、Ni 抗菌めっき区 69.3%，ステンレス区 48.0%となり、ふ化率の向上においても有効であった。ただし今回の試験では、検卵後の死卵にはすべて水カビが付着していたように、発眼卵に対しての水カビ抑制効果はあまりみられなかっただ。このことについては原因が不明であるため、今後検討する必要がある。

ステンレス区においては、ふ化盆の収容位置において発眼率及びふ化率に差がみられ、下段が最も良好で上の段にいくほど低下していた。この原因としては、通水の最上流部である下段のふ化盆で発生した水カビが、水流により下流のふ化盆へと流出し、下流の卵に感染し死亡させた可能

性が考えられる。また、ふ化盆を取り上げた時に金網に水カビが付着していたことから、通水の悪化により卵の死亡を引き起こしたことも考えられる。

このように、Ni抗菌めっきを行ったステンレス網で作製したふ化盆には、死卵からの水カビ病の拡大を抑え、正常卵への水カビ寄生を抑制し、発眼率及びふ化率を向上させる効果がみられた。

以上の結果から、ニジマス種卵管理における水カビ病の防除対策として、Ni抗菌めっき金網をふ化盆の金網へ使用することが有効であると判断された。本手法では、従来のふ化盆の金網を取替えるのみで効果が得られ、管理に特別な手間を必要としない。また、金網自体に水カビが付着し難いことから、大量死の原因となる通水の悪化が起こり難いことも推測される。ただし、Ni抗菌めっき区のふ化盆木枠には水カビが付着していたことなどから、水カビ防除効果を得るには、抗菌めっき部分と卵が接触していることが必要であると考えられる。したがって、堅型の収容槽のように卵が幾重にも重なって収容されている場合においては、全体へ効果を得ることは難しいと考えられる。今後は、耐用年数やふ化盆以外の器具への利用について更に検討していく必要があると思われる。

## 要 約

Ni抗菌めっき技術のサケ科魚類種卵管理器具への導入について検討を行い、以下の結果を得た。

- 1) Ni抗菌めっきの存在下において、ミズカビは菌糸の発育を抑制されるが、死滅することではなく、Ni抗菌めっき除去後に再び発育した。また、Ni抗菌めっき存在下においても遊走子の産出は行われていた。
- 2) 塩素系の消毒剤は、Ni抗菌めっきのミズカビ発育抑制効果を低下させることから、Ni抗菌めっきを用いた器具を消毒するには有機ヨウ素系消毒剤または陽イオン界面活性剤が適していた。
- 3) ステンレス金網にNi抗菌めっきしたふ化盆を用いて受精卵を管理したところ、無処理のステンレス金網と比べ、水カビ病の拡大を抑制した。この結果、発眼率、ふ化率ともに有意に向上した。
- 4) 受精よりふ化までの発生段階において、Ni抗菌めっき金属はニジマス受精卵に対して毒性がみられなかった。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、資材の提供に協力していただいた株式会社神鋼鋼線ステンレスの豊田考営業部長に深く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 畑井喜司雄(2004)：魚介類の感染症・寄生虫病（若林久嗣・室賀清邦編），恒星社厚生閣，263～268.
- 2) 山本淳(2006)：新魚病図鑑（畠井喜司雄・小川和夫編），緑書房，29.
- 3) Kitancharoen, N., and Hatai, K. (1996) : Experimental Infection of Saprolegnia spp. In Rainbow Trout Eggs. Fish Path., 31(1),49～50.
- 4) Kitancharoen, N., Yamamoto, A. and Hatai, K. (1997) : Fungicidal effect of hydrogen peroxide on fungal infection of rainbow trout eggs. Mycoscience, 38,375－378.
- 5) Cline,T.F. and Post, G.(1972) : Therapy for trout eggs infected with Saprolegnia. Prog. Fish-Cult.,34,148～151.
- 6) Alderman,D.J.(1985) : Malachite green:a review. J. Fish DIS., 8,289～298.
- 7) 三浦正之(2004)：銅ファイバーを用いたニジマス卵の水カビ病防除、養殖, 11, 80～83.
- 8) 三浦正之・大野平祐・土田奈々・畠井喜司雄・桐生透(2005)：銅ファイバー浸透によるニジマス卵のミズカビ病の防除、魚病研究, 40, 81～86.
- 9) 山田貞子・漆原亘・中山武典(2001)：給食施設内での抗菌材適用による付着細菌数減少効果、防菌防黴誌, 12, 763～768.
- 10) 畠井喜司雄・江草周三(1979)：真菌性肉芽腫症起病真菌に関する研究－Ⅲ. MG-fungus 用人工培地の開発、魚病研究, 13, 147～152.
- 11) Hirano, N. and Nakayama, T. (2006) : Virucidal effect of newly developed nickel alloy on mouse coronavirus. Adv. Exp. Med. Biol., 3,581～601.