原著論文

緑茶抽出物浸漬法によるサケ卵の卵膜軟化症抑制効果

佐々木　系[*1]・吉光昇二[*2]

Control of Soft Egg Disease of Chum Salmon by Green Tea Extract

Kei SASAKI, and Syouji YOSHIMITSU

Soft egg disease (SED) is often observed during the incubation of salmonid eggs at hatcheries in Hokkaido, Japan. The SED causes softening of the egg membrane and reduces the internal hydrostatic pressure of the eggs. Thus, the mortality of diseased eggs is increased by unusual premature hatching and by the handling required for egg picking and transportation at hatcheries. The efficacy of immersing in green tea extract (GTE) including 43% tannin was examined for the control of SED of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). The internal pressure of the eggs was significantly higher in egg groups immersed in GTE solutions (tannin concentration: 700-2,800 ppm) for 30 or 60 min just after fertilization than that of untreated controls. Those GTE treatments also improved the survival rate of eggs during incubation. The present results suggest that GTE is effective to prevent SED in chum salmon eggs.

2008 年 5 月 23 日受付，2008 年 9 月 8 日受理

サケ科魚類の卵に発生する卵膜軟化症は，卵膜が溶解して窪みや小穴が形成され，ふ化前に卵膜が破れやすくなる障害である[1)]。サケ科魚類の卵は，強固な卵膜に囲まれているため物理的な衝撃に対して強い耐性を有している。しかし，卵膜軟化症が発生すると卵の物理的な耐性が低下し，僅かな衝撃でも卵膜が損傷するために，しばしば大量の減耗が起こる。卵膜軟化症の存在は 1929 年に高安ら[1)]により報告されたのを初め，大野[2)]，武田[3)]によって相次いで報告されている。江草・中島[4)]は，その後新たな報告がみられなかったことから，卵膜軟化症は限定された時期と地域において発症する疾病と考えた。しかし，1970 年代以後，国内ではアマゴ（*Oncorhynchus masou ishikawae*）[5)]，サクラマス（*O. masou*）[6)]での症例が，国外ではギンザケ（*O. kisutch*）[7)]，マスノスケ（*O. tshawytscha*）[8)]での発生が報告され，現在でも北海道内を中心として広い地域で本障害が発生しており，卵膜軟化症の予防が重要な課題となっている。

卵膜軟化症は様々な要因が関与する疾病とされているが，その予防には過マンガン酸カリウムによる卵の薬浴が有効であり[9)]，卵膜軟化症の発生が見られるふ化場では，採卵直後に過マンガン酸カリウムの薬浴による予防処置が行われてきた。しかし，2003 年の薬事法の改正にともない，過マンガン酸カリウムの使用が認められなくなったことから，新たな卵膜軟化症予防法の確立が求められている。

コリガエフ[10)]は本疾病の予防方法として，タンニン溶液への一定時間の浸漬法が有効であることを報告している。タンニンはタンパク質と結合して変性させる収れん作用をもつポリフェノール化合物で，緑茶等に多く含まれている[11)]。

本研究では，タンニンの含有量が高い緑茶抽出物溶液へのサケ受精卵の浸漬法が卵膜軟化症の発生抑制に有効であることを実験的手法により明らかにするとともに，その効果的な使用方法について検討した。

材料と方法

供試卵　2005 年 10 月 26 日に釧路川，2004 年 10 月 18

[*1] 独立行政法人水産総合研究センター　さけますセンター　斜里事業所　〒 099–4404　斜里郡清里町字江南 807-17
Shari Station, National Salmon Center, FRA 807-17 Konan, Kiyosato, Shari, 099–4404 Japan
keis@affrc.go.jp
[*2] 独立行政法人水産総合研究センター　さけますセンター

日に天塩川，2005 年 11 月 8 日に斜里川に遡上したサケ親魚から採卵し受精させた卵を用いた（図 1）。受精卵は，約 1 時間流水中に置いて吸水させ，卵膜の硬化を確認後，輸送用の卵箱に収容し，それぞれさけますセンター鶴居，中川および斜里の各事業所へ輸送し，ボックス型ふ化槽（縦 790 mm，横 625 mm，高さ 540 mm）に約 400,000 粒ずつ収容した。

供試緑茶抽出物　本研究では卵膜軟化症に対する効果判定のために，緑茶抽出物；ポリフェノン CH30（㈱三井農林，東京。以下，PP CH30）を使用した。PP CH30 は緑茶からの温水による抽出物を乾燥したもので，100 g 中にタンニン 42.3 g を含有している。この緑茶抽出物である PP CH30 を事業所のふ化用水に溶解して所定のタンニン濃度の溶液を作成した。PP CH30 に含有されるタンニンは水に全溶解することから，タンニン濃度は次式により算出した。

タンニン濃度 (ppm)
$= \text{PP CH30(g)} \times 0.423 / \text{溶媒量 (m}\ell) \times 10^6$

なお，緑茶抽出物溶液への浸漬は，供試卵をボックスふ化槽に収容後直ちに行った。また，積算温度（℃）は受精当日を 0℃とし，次式により求めた。

積算温度（℃）= 水温×日数

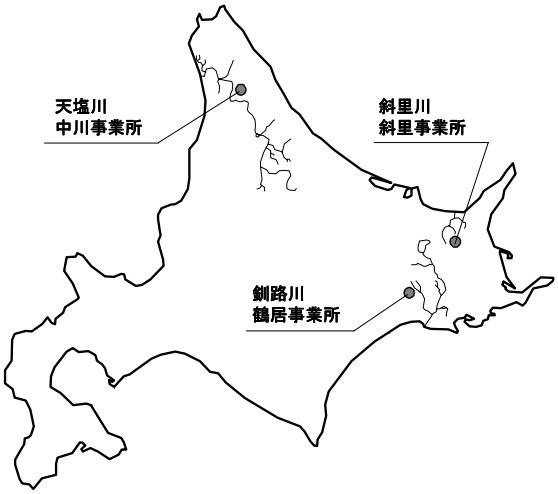

図 1. 調査河川および事業所の位置

緑茶抽出物浸漬法による卵膜軟化症発症抑制効果の検討

抑制効果を検討するため，釧路川に遡上したサケ親魚から採卵した受精卵を用い，ふ化槽に収容直後から 60 分間にわたりタンニン濃度 700，1,000，1,400 ppm の緑茶抽出物溶液 160 ℓに浸漬した 3 試験区と，緑茶抽出物溶液に浸漬せず，ふ化用水に 60 分間浸漬した対照区を設定した。いずれの試験区も供試卵を浸漬している間，15 分毎に人の手による攪拌を計 3 回行った。その後，各試験区のふ化槽に湧水を毎分 40 ℓ注水し，40 日後に収容卵の発眼率と卵内圧を測定した。卵管理期間中のふ化用水の平均水温は 7.4℃であった。

緑茶抽出物浸漬法の異なる卵および環境条件での効果

異なる卵および環境条件での効果を検討するため，天塩川に遡上したサケ親魚から採卵した受精卵を用い，ふ化槽に収容直後から 60 分間にわたりタンニン濃度 1,400，および 2,800 ppm の緑茶抽出物溶液 200 ℓに浸漬した 2 試験区と，緑茶抽出物溶液に浸浸せず，ふ化用水に 60 分間浸漬した対照区の 3 試験区を設定した。いずれも共試卵を浸漬している間，溶液はポンプを使用して循環させた。その後，各試験区のふ化槽に地下水を毎分 40 ℓ注水し，42 日後に収容卵の発眼率と卵内圧を測定した。また，51 日後にはふ化率も調査した。卵管理期間中のふ化用水の平均水温は 9.4℃であった。

浸漬時間の検討　浸漬時間の違いによる有効性を検討するため，斜里川に遡上したサケ親魚から採卵した受精卵をふ化槽に収容直後，タンニン濃度 700 ppm の緑茶抽出物溶液 160 ℓにそれぞれ 30，および 60 分間浸漬した 2 試験区と，緑茶抽出物溶液に浸漬せず，ふ化用水に 60 分間浸漬した対照区の 3 試験区を設定した。いずれも共試卵を浸漬している間，溶液はポンプを使用して循環させた。その後，各試験区のふ化槽に湧水を毎分 40 ℓ注水し，38 日後に収容卵の発眼率と卵内圧を測定した。卵管理期間中のふ化用水の平均水温は 7.7℃であった。

緑茶抽出物浸漬法による卵膜軟化症発症抑制効果の判定は，本疾病がひき起こされる対照区との発眼率，および卵内圧の比較により行った。

発眼率・ふ化率の測定　発眼率は，それぞれの試験区について，発眼後の積算温度 320 ～ 340℃時点で，ふ化槽内の供試卵から白濁した死卵を取り除いて発眼卵を計数し，次式により求めた。

発眼率（%）=（発眼卵数 / 供試卵数）× 100

天塩川由来の卵を使用した試験では，発眼率に加え，ふ化率を比較した。ふ化率は次式により求めた。

ふ化率（%）=（ふ化尾数 / 発眼卵数）× 100

卵内圧の測定法　それぞれの試験区の供試卵 30 ～ 60 粒について，積算温度 300 ～ 400℃時点での卵内圧を測定した。卵内圧を測定するために，ALDERDICE *et al.* [12] が人の眼球内圧力を測定する原理を応用してサケ卵の内圧を測定するために開発した計測装置を参考にし，図 2 に示した計測装置を作成した。作成した計測装置は，レコードプレーヤーのトーンアームを利用し，アームの先端に任意の重量が負荷されるように調整することが可能である。本研究では，アーム先端の荷重が 3 g となるように調整し，卵の上部に負荷をかけたときに形成される卵の扁平部の円の直径（以下，扁平部直径とする）を，実体顕微鏡下（40 倍）で接眼ミクロメーターを用いて測定した（図 3）。卵内圧が高い場合は負荷に対する反発が大きいため扁平部直径が小さくなり，卵内圧が低い場合

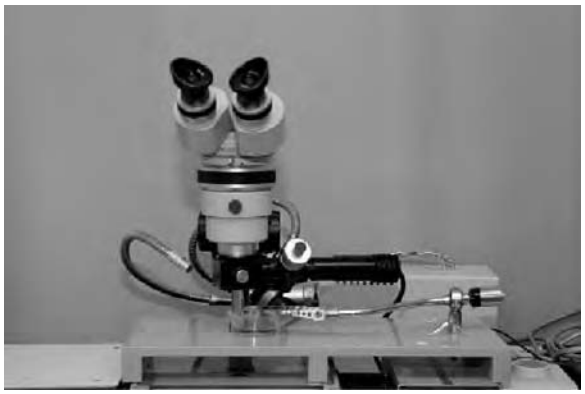

図 2. 卵に一定の荷重をかけたときの扁平部直径を測定するために作成した装置

は反発が小さいため扁平直径が大きくなる。そのため，扁平部直径の大小は卵内圧の高低を反映することになり，卵膜軟化症を発症した卵では卵の硬度が低下するため，扁平部直径は大きくなる。なお，正常卵の扁平部直径は積算温度 300 ～ 400℃時点で 3.10 ～ 3.40 mm 程度の値となる。

結　　果

緑茶抽出物浸漬方による卵膜軟化症抑制効果　緑茶抽出物中のタンニンの濃度を 700，1,000，1,400 ppm のとして，60 分間の浸漬を行った 3 試験区の扁平部直径を図 4 に示した。直径は 2.28 ～ 2.36 mm で，各濃度の試験区間での有意差は認められなかったが，いずれの濃度においても対照区（3.57 mm）より有意に小さい値を示した（*t-test, p*<0.05）。発眼率は，試験区で 88.6 ～ 92.2% と高い値を示し，いずれの濃度においても対照区の発眼率（84.7%）を上回った。また，試験区では，タンニン濃度が高いほど発眼率も高くなった（表 1）。

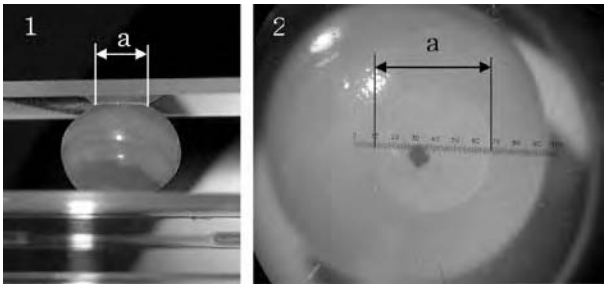

図 3. 接眼ミクロメータによる卵の扁平部直径 (a) 測定法。写真 1 は側面，写真 2 は上面を示す。卵の硬度が低いほど a は大きくなる。

緑茶抽出物浸漬法の異なる卵および環境条件での効果
天塩川に遡上したサケ由来の卵の扁平部直径の結果を図 5 に示した。タンニン濃度 1,400，および 2,800 ppm の緑茶抽出物浸漬を行った 2 試験区での卵の扁平部直径は 2.94 および 3.31 mm で，斜里川のサケ由来卵にくらべて高い値を示したが，両濃度共に対照区（4.58 mm）より有意に小さい値を示した（*t-test, p*<0.05）。発眼率は，試験区で 82.9 および 84.6% で，いずれの濃度においても対照区の発眼率（81.8%）を上回った（表 2）。しかし，濃度が高くなるに従い，発眼率は高くなる傾向を示したものの，対照区とほぼ同様の値を示した。一方，ふ化率では試験区で 97.9 および 97.8% と高い値を示し，対照区のふ化率（89.4%）よりも 8.4 ～ 8.5% 高くなった（表 2）。

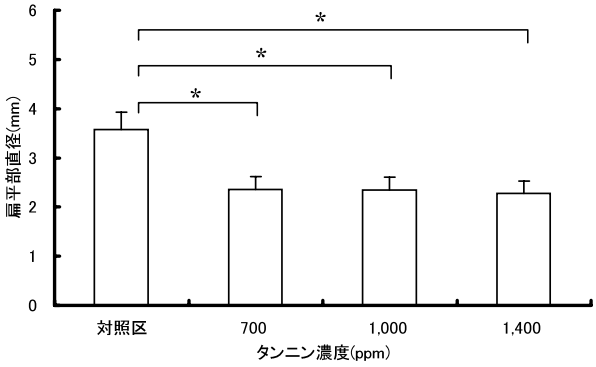

図 4. 緑茶抽出物溶液に 60 分間浸漬後，積算温度 300℃時の卵の扁平部直径の比較
*は $p < 0.05$ で有意であることを示す。バーは標準偏差を示す

表 1. タンニン濃度 700，1,000，1,400 ppm の緑茶抽出物溶液に浸漬した釧路川卵の発眼率 (%)

区	タンニン濃度(ppm)	浸漬時間（分）	発眼率（%）
対照区	0	60	84.7
試験区	700	60	88.6
試験区	1,000	60	90.5
試験区	1,400	60	92.2

浸漬時間の検討　タンニン濃度 700 ppm の緑茶抽出物溶液に 30，および 60 分間の浸漬を行った 2 試験区の扁平部直径は 2.59 および 2.78 mm で（図 6），両浸漬時間共に対照区（3.51 mm）より有意に小さい値を示した（*t-test, p*<0.05）。発眼率は，試験区で 92.8 および 93.7% と高い値を示し，両浸漬時間共に対照区の発眼率（87.7%）を上回った（表 3）。

考　　察

卵膜軟化症の発症に関与する因子として細菌 [1,5]，卵が接触する水の硫酸イオン濃度 [6]，高水温 [7] の影響等が報告されている。このため，日本魚病学会の定めた病名一覧においても，卵膜軟化症は，細菌が主な原因とされるが様々の要因が関与する疾病とされている。これまでは，卵膜軟化症の予防法として，過マンガン酸カリウムの 20 ppm 水溶液をふ化槽に 60 分間滴下する方法が広

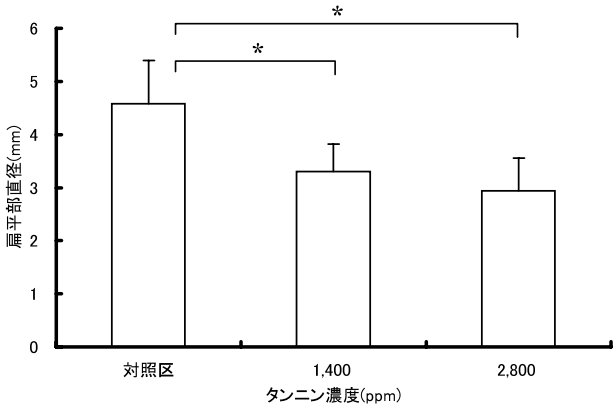

図 5. 緑茶抽出物溶液に 60 分間浸漬後，積算温度 400℃時の卵の扁平部直径の比較
＊は $p < 0.05$ で有意であることを示す。バーは標準偏差を示す。

表 2. タンニン濃度 1,400，2,800 ppm の緑茶抽出物溶液に浸漬した天塩川卵の発眼率およびふ化率

区	タンニン濃度(ppm)	浸漬時間（分）	発眼率（%）	ふ化率（%）
対照区	0	60	81.8	89.4
試験区	1,400	60	82.9	97.9
試験区	2,800	60	84.6	97.8

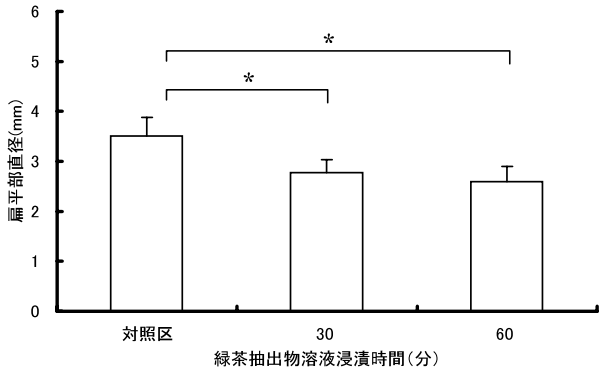

図 6. タンニン濃度 700 ppm の緑茶抽出物容器に浸漬後，積算温度 300 ℃時の卵の扁平部直径
＊は $p < 0.05$ で有意であることを示す。バーは標準偏差を示す。

表 3. タンニン濃度 700 ppm の緑茶抽出物溶液に 30，60 分間浸漬した斜里川卵の発眼率 (%)

区	タンニン濃度(ppm)	浸漬時間（分）	発眼率（%）
対照区	0	60	87.7
試験区	700	60	92.8
試験区	700	30	93.7

く用いられてきた。しかし，その作用機序については卵膜軟化症の原因や発症のメカニズムが未解明であることもあり，明らかになっていない。

本研究で行った一連の実験で，サケ受精卵を積算温度 0℃時に緑茶抽出物溶液へ浸漬した試験区では，対照区と比較して扁平部直径は有意に小さくなり，発眼率やふ化率は高くなる傾向が認められた。このことから，緑茶抽出物溶液は卵内圧および発眼率の低下をもたらす卵膜軟化症の抑制方法として有効であると考えられる。タンニン濃度 700，1,000，1,400，および 2,800 ppm の緑茶抽出物溶液に浸漬した卵の場合，浸漬を行わなかった卵と比較して，いずれの濃度においても卵内圧が有意に高く，各濃度区間では扁平部直径の値に有意な差が認められなかった。また，700 ppm のタンニン濃度に浸漬した結果では浸漬時間が 30 分で発眼率が 93％と高かったことから，タンニン濃度が 700 ppm，あるいはこれ以上の緑茶抽出物溶液で 30 分以上浸漬することにより，卵膜軟化症抑制効果が期待される。結果には示さなかったが，斜里事業所では 350 ppm でも同様の効果が認められている。今後，実用化に備え，より低濃度での効果についても検討したいと考える。

サケ科魚類の卵膜は水に接すると，卵膜内のカルシウムイオンの働きによりトランスグルタミナーゼが活性化し，卵膜を構成しているタンパク質の分子量が 50 kda から 120 kda へと増大し，強固な膜が形成される[13, 14]。この一旦高分子化した卵膜は，プロテアーゼなどのタンパク質分解酵素に影響を受けない物理的にも化学的にも安定した強固な膜となるとされている。卵膜軟化症はこの強固な卵膜をも溶解する症状を示すが，予め緑茶抽出物溶液への浸漬することにより，主成分であるタンニンが何らかの化学的な作用を卵膜に起こし，卵膜の溶解を防止すると推測される。

本研究において，サケ卵の卵膜軟化症の抑制に緑茶抽出物が有効である結果が得られたが，緑茶抽出物は過マンガン酸カリウムに比べて高価である。このため，卵膜軟化症が一部の採卵群の卵のみに発症するふ化場では，より効果的な使用方法を含め実用化に向けた検討が求められる。そのためには，卵膜軟化症発症後の緑茶抽出物浸漬法の有効性を調べるとともに，より安価で卵膜軟化症に有効な成分の検索を行い，簡便かつ安全な防止法の開発を図る必要がある。

謝　辞

本稿をまとめるにあたり，養殖研究所札幌魚病診断研修センターの野村哲一博士には有益なご助言をいただきました。深く感謝いたします。鶴居，斜里，中川事業所の職員の皆様にはデータの収集に多大なるご協力をいただきました。ここに記して感謝の意を表します。

文　献

1) 高安三次・武田志麻之輔・大野礒吉（1934）西別鮭鱒孵化場鮭卵被害調査。水産調査報告，**37**，1-140。

2) 大野磯吉（1929）西別孵化場鮭被害卵消毒試験経過。鮭鱒彙報，**1**，3-6。
3) 武田志麻之輔（1930）最近本道孵化場に起れる鮭卵の病害の原因に就いて。鮭鱒彙報，**2**，1-7。
4) 江草周三・中島健次（1973）魚病に関する文献集　第1集　寄生体性疾病と寄生体。魚病研究，**7**，137-229。
5) 梅原光夫・隆島史夫・立川　亙（1985）アマゴの卵膜軟化症。水産増殖，**32**，230-232。
6) 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。
7) 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.
8) BARNES, M. E., R. J. CORDES, and W. A. SAYLER (2003) Soft-Egg Disease in Landlocked Chinook Salmon Eggs: Possible Cause and Therapeutic Treatments. *North. Am. J. Apuacult*., **65**, 126-133.
9) 半田芳男（1932）鮭鱒人工蕃殖論。北海道鮭鱒孵化事業協会，北海道，190 pp。
10) コリガエフ（1962）秋鮭卵膜崩壊予防剤としてのタンニン。（大屋善延　訳）。魚と卵，**120**，8-11。
11) 金沢和樹（2004）ポリフェノールとは何か。養殖，**7**，14-16。
12) ALDERDICE, D. F., J. O. T. JENSEN., and F. P. J. VELSEN (1983) Measurement of hydrostatic pressure in salmonid eggs. *Can. J. Zool*., **62**, 1977-1987.
13) 井内一郎（1997）魚類の卵膜硬化酵素。上智大学生命科学研究所紀要，**16**，13-26。
14) IUCHI, I. (2001) Further analysis of egg envelope (Chorion) hardening in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Sophia Life Science Bulletin*, **20**, 43-52.