

魚類由来培養細胞の魚類 ノダウイルス感受性

渡辺研一^{1*}・吉水 守²

(1999年 5月31日受付)

Susceptibility of Fish Cell Lines Against Fish Nodavirus

Ken-ichi Watanabe^{1*} and Mamoru Yoshimizu²

^{1*} Akkeshi Station of Japan Sea-Farming Association
Chikushikoi, Akkeshi, Hokkaido 088-1108, Japan

² Laboratory of Biochemical Process Technology, Faculty of
Fisheries, Hokkaido University, Minato,
Hokkaido, 041-0821, Japan

(Received May 31, 1999)

Susceptibility of 32 fish cell lines against fish nodaviruses from moribund barfin flounder (*Verasper moseri*, BFNNV), greasy grouper (*Epinephelus tauvina*, GGNNV) and striped jack (*Pseudocaranx dentex*, SJNNV) was investigated. Cytopathic effects were observed on SSN-1 cells inoculated with the 3 viruses at 15 or 20°C, and on SBK-2 and SK, both derived from sea bass (*Lates calcarifer*), inoculated with GGNNV. Viral infectivity of homogenized brain and eye of moribund barfin flounder and Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) juveniles were $10^{7.55-8.55}$ and $10^{6.05-6.55}$, respectively and whole bodies of striped jack larvae were $10^{8.80-9.80}$ TCID₅₀/g.

Key words: fish nodavirus, SSN-1, susceptibility, viral nervous necrosis, fish cell line

海産魚類の放流を目的とした種苗生産が行われているが、その成否に疾病発生の有無が多大な影響を与えている¹⁾。ウイルス性神経壊死症 (viral nervous necrosis; VNN) は宿主範囲が広く、大きな問題となっている²⁾。VNN ウイルスは長い間培養することができなかったが、Frerichs *et al.*³⁾ および Lim *et al.*⁴⁾ が、それぞれストライプドスネークヘッド (*Channa striatus*) 由来の SSN-1 細胞およびシーバス (*Lates calcarifer*) 由来の SB 細胞を用いて原因ウイルスの分離を報告している。

本研究では SSN-1、および SB と同一魚種由来である

SBK-2, SK 細胞を含む温水性淡水魚 11 種、海産魚 8 種ならびにサケ科魚類 6 種、計 25 魚種由来の 32 種類の魚類培養細胞を供試し、シマアジ (*Pseudocaranx dentex*)、ヒトミハタ (*Epinephelus tauvina*) およびマツカワ (*Verasper moseri*) 病魚由来ノダウイルスに対する感受性を検討した。また、SSN-1 細胞を用いて VNN 罹病魚のウイルス感染価の測定を試みた。

魚類培養細胞の魚類ノダウイルスに対する感受性の検討は、供試ウイルスとして 1991 年のシマアジ仔魚由来 SJNNV 1991 株⁵⁾、1993 年のマツカワ稚魚由来 BFNNV 1993 株⁶⁾、1991 年のヒトミハタ由来 GGNNV 1991 株⁴⁾ を用いて行った。SJNNV および BFNNV は SSN-1 細胞で、GGNNV は SB 細胞で培養した。いずれのウイルス株も SJNNV 特異 PCR⁷⁾ で反応陽性を示し、抗 SJNNV 家兎血清で中和されたものを用いた。

細胞と使用した培地を Table 1 に示した。培地は 10% 牛胎児血清 (FBS; Gibco)、100 IU/mL のペニシリン G (Sigma)、100 µg/mL の硫酸ストレプトマイシン (Sigma) を含む 16 mM トリス緩衝 MEM (MEM₁₀Tris) あるいは同量の FBS および抗生物質添加 L-15 培地を用いた。細胞は細胞培養用 24 well プレート (Falcon) に 2.0×10^5 cells/mL/well となるように播き、20°C で 3 日間培養した。細胞が 80~100% confluent になった時、供試ウイルス液を M. O. I. が約 0.1 となるように 100 µL ずつ 2 well に接種し、BFNNV を接種した細胞は 15°C で、SJNNV および GGNNV を接種した細胞は 20°C で培養した。2 週間後に同種細胞に継代し、10 日間観察した。

供試した 32 種類の細胞の BFNNV, GGNNV および SJNNV に対する感受性を Table 1 に示した。初回接種時に細胞に変化が見られた細胞は供試した 32 種類のうち 10 種類であった。Fig. 1 に SSN-1 細胞に見られた細胞の膨化と顆粒様物質を含む球形細胞の出現を特徴とする変化を示した。

同種細胞に継代後も細胞に変化が見られ、CPE と判定された細胞は SSN-1 と GGNNV を接種した SBK-2 および SK のみであった (Table 1)。したがって、今回調査した細胞の中では SSN-1 細胞が魚類ノダウイルスを分離するのに最も適していると考えられた。

罹病魚体中のウイルス感染価測定には、-80°C に保存してあった 1991 年の罹病シマアジ仔魚 (全長 3.7~3.8 mm)、1993 年の罹病マツカワ稚魚 (全長 45~63 mm) および 1998 年の罹病ヒラメ稚魚 (全長 18~20 mm) を供試した。マツカワおよびヒラメでは病魚 5 尾の脳および眼を個体別に、シマアジでは 5 尾プールの全魚体 3 検体を Hanks' BSS (Gibco) でホモジナイズし、0.45 µm フィルター (ミリポア, HA) で濾過除菌した。ホモジナイズ濾液を 10^8 倍まで希釈して、ウイルス感染価を SSN-1 細胞を用いて測定し、検体 1 g あたりの感染価

¹ (社)日本栽培漁業協会厚岸事業場

² 北海道大学水産学部生物化学工学講座

* Corresponding author

E-mail: kenichi@marimo.or.jp

Table 1. Susceptibility of fish cell lines against fish nodavirus

Cell line* ¹	Species (Tissue)	Medium	Change of cell morphology					
			BFNNV		GGNNV		SJNNV	
			1st* ²	2nd* ³	1st	2nd	1st	2nd
GSE	Gizzardshad (embryo)	MEM* ⁴	-	-	-	-	-	-
JSKG	Japanese striped knife jaw (gonad)	L-15* ⁵	-	-	-	-	-	-
PAS	Purplish amber jack (embryo)	L-15	-	-	-	-	-	-
SBK	Red sea bream (kidney)	MEM	+	-	+	-	+	-
SBK-2	Sea bass (kidney)	L-15	+	-	+	+* ⁶	+	-
SK	Sea bass (kidney)	L-15	+	-	+	+* ⁶	+	-
SF-2	Smelt (Fin)	L-15	+	-	+	-	+	-
KRE	Kelp & red spotted grouper (embryo)	MEM	+	-	+	-	+	-
ASE	Atlantic salmon (embryo)	MEM	-	-	-	-	-	-
CHH-1	Chum salmon (heart)	MEM	-	-	-	-	-	-
SE	Chum salmon (embryo)	MEM	-	-	-	-	-	-
CHSE-214	Chinook salmon (embryo)	MEM	+	-	+	-	+	-
KO-6	Kokanee salmon (ovary)	MEM	-	-	-	-	-	-
MSE	Masu salmon (embryo)	MEM	-	-	-	-	-	-
YNK	Masu salmon (kidney)	MEM	-	-	-	-	-	-
RTE-2	Rainbow trout (embryo)	MEM	-	-	-	-	-	-
RTH	Rainbow trout (hepatoma)	MEM	-	-	-	-	-	-
RTG-2	Rainbow trout (gonad)	MEM	-	-	-	-	-	-
RTT	Rainbow trout (tail)	MEM	-	-	-	-	-	-
STE-137	Steelhead trout (embryo)	MEM	+	-	+	-	+	-
BB	Brown bullhead (caudal trunk)	MEM	-	-	-	-	-	-
BF-2	Blue gil (fin)	MEM	-	-	-	-	-	-
CCO	Channel catfish (ovary)	L-15	-	-	-	-	-	-
EK-1	Eel (kidney)	MEM	-	-	-	-	-	-
EO-2	Eel (ovary)	MEM	-	-	-	-	-	-
EPC	Carp (epithelioma)	MEM	-	-	-	-	-	-
EPG	Goldfish (epithelioma)	L-15	-	-	-	-	-	-
FHM	Fathead minnow (caudal trunk)	L-15	-	-	-	-	-	-
SHH	Snake head fish (heart)	MEM	-	-	-	-	-	-
SSN-1	Striped snake head (whole fry)	L-15	+	+* ⁶	+	+* ⁶	+	+* ⁶
AF-29	Ayu (fin)	L-15	+	-	+	-	+	-
WF-1	Smelt (fin)	MEM	+	-	+	-	+	-

*¹ Fish cell lines were cultured at 15°C (BFNNV) or 20°C (GPNNV and SJNNV)

*² Observe the CPE-like changes at first inoculation

*³ Observe the CPE at second inoculation

*⁴ Minimum essential medium (w/16 mM Tris buffer, 10% FBS and P/S)

*⁵ Leibovitz L-15 (W/10% FBS and P/S)

*⁶ Cytopathic effect (CPE)

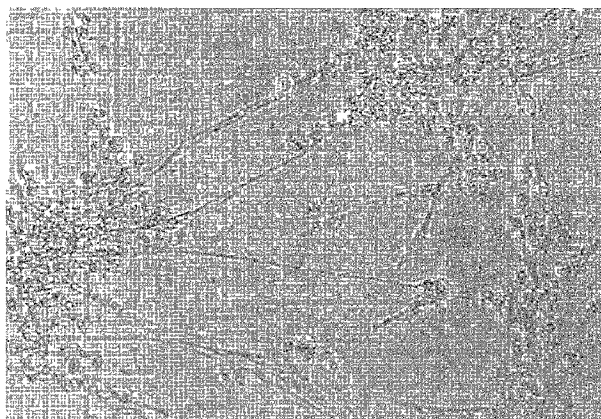


Fig. 1. Photograph showing inoculated SSN-1 cells. Inoculated with the brain and eye tissue of affected barfin flounder juvenile.

を算出した。マツカワで $10^{7.55\sim 8.55}$, ヒラメで $10^{6.05\sim 6.55}$, シマアジでは $10^{8.80\sim 9.80}$ TCID₅₀/g であった。

SSN-1 細胞はシーバス (*Dicentrarchus labrax*) 由来のノダウイルスを分離できることが報告されており³⁾,

本研究でヒラメを含む 4 魚種由来のノダウイルスが分離可能であったことを考えあわせると, 本細胞は魚類ノダウイルスを広く分離できる可能性が示唆される。

謝 辞

本研究にあたり, 試料を分与いただいた日本栽培漁業協会宮古事業場の太田健吾技術員および同上浦事業場の森広一郎博士に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 西岡豊弘・古澤 徹・水田洋之介 (1997): 水産増殖, **45**, 285-290.
- 2) 室賀清邦・古澤 徹・古澤 巖 (1998): 水産増殖, **46**, 473-480.
- 3) Frerichs, G. N., H. D. Rodger and Z. Peric (1996): *J. Gen. Virol.*, **77**, 2067-2071.
- 4) Lim, C. M., S. Y. Chong and M. Yoshimizu (1998): *Fish Pathol.*, **33**, 447-448.
- 5) Mori, K., T. Nakai, K. Muroga, M. Arimoto, K. Mushiaki and I. Furusawa (1992): *Virology*, **187**, 368-371.
- 6) 渡辺研一・石間正浩・川真田憲治・吉水 守・絵面良男 (1999): 北大水産彙報, **50**, 101-113.
- 7) Nishizawa, T., K. Mori, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga (1994): *Dis. Aquat. Org.*, **18**, 103-107.