



Title	ヒラメ胚由来細胞2株の樹立
Author(s)	笠井, 久会; KASAI, Hisae; 吉水, 守 他
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 52(2), 67-70
Issue Date	2001-09
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/21946">https://hdl.handle.net/2115/21946</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	52(2)_P67-70.pdf



## ヒラメ胚由来細胞2株の樹立

笠井 久会<sup>1)</sup>・吉水 守<sup>1)</sup>

### Establishment of Two Japanese Flounder Embryo Cell Lines

Hisae KASAI<sup>1)</sup> and Mamoru YOSHIMIZU<sup>1)</sup>

#### Abstract

Two flounder cell lines; hirame natural embryo cells (HINAE) and clone hirame embryo cells (CHIE) were established from hirame (Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*) embryos. Both cells were cultured using a Leibovitz's L-15 medium at 20°C. HINAE and CHIE cells consisted of fibroblastic cells. Doubling time of HINAE and CHIE cells were 9 and 12 days, respectively. HINAE and CHIE cells showed cytopathic effects (CPE) when infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and hirame rhabdovirus (HIRRV) were inoculated. Both cells did not show a susceptibility to flounder herpesvirus (FHV), causative agent of viral epithelial hyperplasia and Japanese flounder nervous necrosis virus (JF-NNV). HINAE cells showed a susceptibility to Japanese flounder lymphocystis disease virus (JF-LCDV) and produced enlarged rounded cells. Infectivity of culture grown JF-LCDV using the HINAE cells reached  $10^{5.30}$ TCID<sub>50</sub>/ml. HINAE is a first cell line to support a growth of JF-LCDV.

**Key words:** Fish cell line, Hirame, Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, HINAE, CHIE

#### 緒 言

ヒラメはわが国各地で飼育されている産業的に重要な魚種である。種苗生産および陸上養殖が進む過程で多くの疾病が発生し、その予防・治療あるいは疾病防除対策確立が急務となっている。ヒラメの病気の中でウイルス病としては、イリドウイルスによるリンホシスチス病をはじめラブドウイルスによるヒラメラブドウイルス病、ビルナウイルスによるウイルス性腹水症、ヘルペスウイルスによるウイルス性表皮増生症、ノダウイルスによるウイルス性神経壊死症などが知られている (Kimura and Yoshimizu, 1991)。このうちリンホシスチス病とウイルス性表皮増生症は原因ウイルス分離ができず、ウイルスの詳しい性状は不明のまま、電子顕微鏡による観察により研究が進められている。

魚類のウイルス病研究の基礎として、原因ウイルスの分離・同定、性状試験等に宿主由来培養細胞は不可欠である。1960年以降、サケ科魚類を中心に魚類由来培養細胞が樹立され、1994年の総説では34科74魚種から137株の魚類由来細胞が樹立されている (Fryer and Lannan, 1994)。ヒラメの細胞としてはHF, HE, FF-11およびHL-8細胞が報告されているが (Yoshimizu et al., 1988; 吉水ら, 2000)、いずれの細胞を供試してもヒラメリンホシスチス病ウイルス (JF-LCDV) とウイルス性表皮増生症原因ウイルス

(FHV) を分離するに至っていない (吉水, 1997; 吉水ら, 2000)。今回、従来のトリプシン消化法に代わり、直播き法を採用し、ヒラメの胚を対象に再度、細胞樹立を試み、現在まで培養ができないとされてきたヒラメのLCDV (JF-LCDV) を培養できる細胞株を樹立し得た。ここではその樹立の経過と培養細胞内でのJF-LCDVの形態を報告する。

#### 材 料 と 方 法

##### 供試ヒラメ受精卵

鳥取県水産試験場の山本栄一博士から分与を受けた通常ヒラメおよびクローンヒラメ孵化直前の胚体を本試験に供試した。供試卵は受精の翌日に海水を入れたビニール袋に収め、酸素を充填し、5~10°Cで函館まで空輸した。

##### 直播き法による細胞培養法

受精卵と共に送られてきた飼育海水で作成した有効ヨード濃度50 ppmのポピドンヨード液 (明治製菓) に、5粒の受精卵を15分間浸漬し、卵表面を消毒した。0.22 μmのミリポアフィルター (HA) で濾過除菌した海水で卵表面を3回洗浄し、滅菌メスとハサミで卵膜を切り、胚を取り出した。2本のメスで胚を細切し、パスツールピペットで牛胎児血清 (FBS: Gibco) を20%、ペニシリンG (Sigma)

<sup>1)</sup> 北海道大学大学院水産科学研究科応用生物科学講座

(Laboratory of Biochemistry and Biotechnology, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

を 1,000 IU/ml, 硫酸ストレプトマイシン (Sigma) を 1,000  $\mu$ g/ml 含む Leibovitz の L-15 培地 (Gibco) を 1 ml 加え, 組織片を懸濁した。

L-15 培地をさらに 1 ml 加え, 組織片を初代培養用フラスコ (Primaria; Falcon) に移し, フラスコ底面に均一に播いた。培地を抜き取り, 15°C で 24 時間培養した。翌日, 抗生物質濃度を通常濃度とした培地を加え, 組織片から細胞が伸長するまで 20°C で数日間培養した。

細胞片の周囲に細胞が伸長してコロニー状になったとき, 常法の Versen/Trypsin 分散媒を加えて組織片のみを除去し, 新たな培地を加え, さらに数日培養を継続した。単層細胞がフラスコ底面を覆ったときに, 常法に従い継代を行った。初代から 5 代までは細胞を 2 倍に希釈した。継代 10 代目からは L-15 培地の血清濃度を 10% に, 細胞数を  $2.0 \times 10^5$  cells/ml に, フラスコも通常の組織培養用フラスコ (Greiner) に変更した。

### 培養細胞の性状およびウイルス感受性試験

細胞の継代数が HINAE 細胞が 50 代, CHIE 細胞が 30 代になった時点で, 細胞の形態と倍化時間の観察を行うと共に, ヒラメの鰭由来の HF 細胞 (Yoshimizu et al., 1988) および京都大学の青海忠久教授から分与を受けたヒラメ胚由来の HE 細胞を対象に, 伝染性膵臓壊死症ウイルス (IPNV; VR-299 株), 伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV; ChAb 株), ヒラメラブドウイルス (HIRRV; HV7601H 株), ウイルス性表皮増生症原因ウイルス (FHV), ウイルス性神経壊死症ウイルス (JF-NNV; MY 株), ヒラメリンホシスチスウイルス (JF-LCDV; KU 株) に対する感受性を観察した。

細胞形態は位相差顕微鏡による観察と May-Grünwald Gimusa 染色によった。細胞の倍化時間は 25 cm<sup>2</sup> 容組織培養用フラスコ 5 個に  $2.0 \times 10^5$  cells/ml となるように細胞を播き, 3 日毎に細胞数を測定し, 細胞数が倍になる時間を求めた。

細胞のウイルス感受性は IPNV と IHNV, HIRRV, JF-NNV は m.o.i. を 0.1 として接種し, FHV と JF-LCDV は組織ホモジナイズ濾液の 100 倍希釈液を 0.1 ml 宛接種した。

なお JF-LCDV に対しては細胞変性効果 (CPE) を観察すると共に, ヒラメ胚由来培養細胞を用いて継代を 3 回繰り返した分離株を対象に, その増殖量および感染細胞内での形態を超薄切片を作成して観察した。超薄切片には酢酸ウランと燐タングステンによる二重染色を施した。

## 結 果

### 培養経過

両細胞共に培養開始翌日に, ヒラメ胚組織片から細胞が伸長し, 培地を添加しても組織片は浮上しなくなった。培養開始 1 週間後には組織片周囲の細胞はコロニー状となっ

た。分散媒を添加して組織片を除去した後も, 細胞は順調に増殖を続け, 約 3 週間後には単層細胞ができあがった。継代数 10 代頃から 30 代にかけて細胞の増殖率が低下した。これらの細胞を hirame natural embryo cell (HINAE) および clone hirame embryo cell (CHIE) と仮称した。HINAE および CHIE 細胞は共に繊維芽細胞で構成されていた。

### 細胞の倍化時間

HINAE 細胞および CHIE 細胞について細胞数が倍になるに要する時間を測定した。 $2.0 \times 10^5$  cells/ml で培養を開始した HINAE 細胞は, 3 日目に  $2.8 \times 10^5$  cells/ml に, 6 日目に  $3.2 \times 10^5$  cells/ml, 9 日目に  $4.4 \times 10^5$  cells/ml, 12 日目に  $8.0 \times 10^5$  cells/ml となり, CHIE 細胞は 3 日目に  $2.0 \times 10^5$  cells/ml, 6 日目に  $2.6 \times 10^5$  cells/ml, 9 日目に  $3.0 \times 10^5$  cells/ml, 12 日目に  $4.2 \times 10^5$  cells/ml となり, 細胞数が倍になるのにそれぞれ 9 日と 12 日を要した。

### HINAE 細胞の魚類ウイルス感受性

ヒラメの鰭由来の HF 細胞, 胚由来 HE, HINAE および CHIE 細胞の IPNV, IHNV, HIRRV, FHV, JF-NNV および JF-LCDV に対する感受性を Table 1 に示した。

供試した 4 種の細胞は IPNV, IHNV, HIRRV に感受性を示し, HINAE 細胞は JF-LCDV にも CPE を示した。

### JF-LCDV の HINAE 細胞での CPE とウイルス感染価

JF-LCDV KU 株を接種した HINAE 細胞における CPE を Fig. 1 に示した。繊維芽細胞はやや膨潤して大型球形化した。培養 JF-LCDV の HINAE 細胞での感染価は  $10^{5.30}$  TCID<sub>50</sub>/ml であった。

### HINAE 細胞内での JF-LCDV の形態

培養 JF-LCDV を接種した HINAE 細胞の超薄切片像を

Table 1. Susceptibility of HINAE, CHIE, HF and HE cell lines against JF-LCDV and several fish viruses

Cell lines	Fish viruses*1					
	IPNV	IHNV	HIRRV	FHV	JF-NNV	JF-LCDV
HINAE	+*2	+	+	-*3	-	+
CHIE	+	+	+	-	-	-
HF	+	+	+	-	-	-
HE	+	+	+	-	-	-

\*1: IPNV; infectious pancreatic necrosis virus, IHNV; infectious hematopoietic necrosis virus, HIRRV; hirame rhabdovirus, FHV; flounder herpesvirus, JF-NNV; japanese flounder nervous necrosis virus, JF-LCDV; japanese flounder lymphocystis disease virus.

\*2: CPE positive.

\*3: CPE negative.

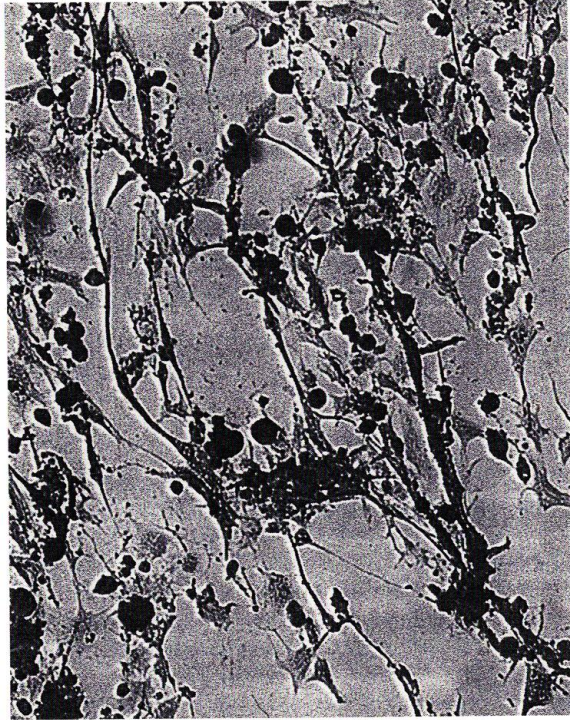


Fig. 1. CPE of Japanese flounder lymphocystis disease virus on HINAE cells.

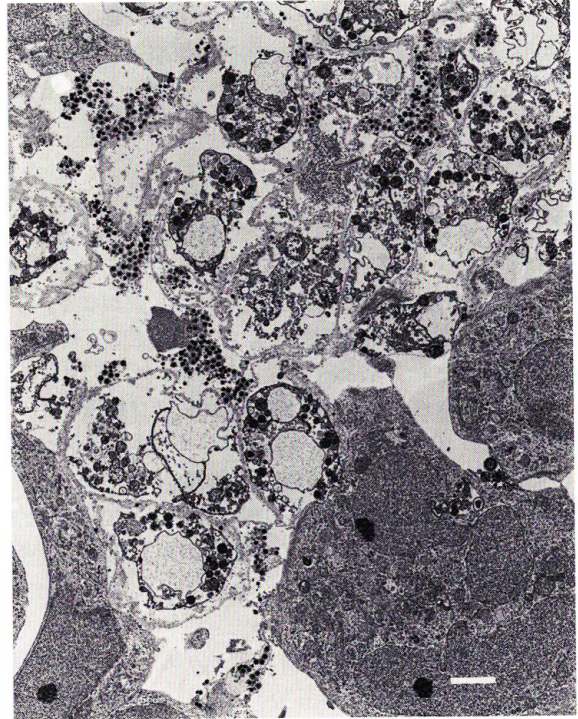


Fig. 2. Japanese flounder lymphocystis disease virus (JF-LCDV) in a section of infected HINAE cells (— : 2,500 nm).

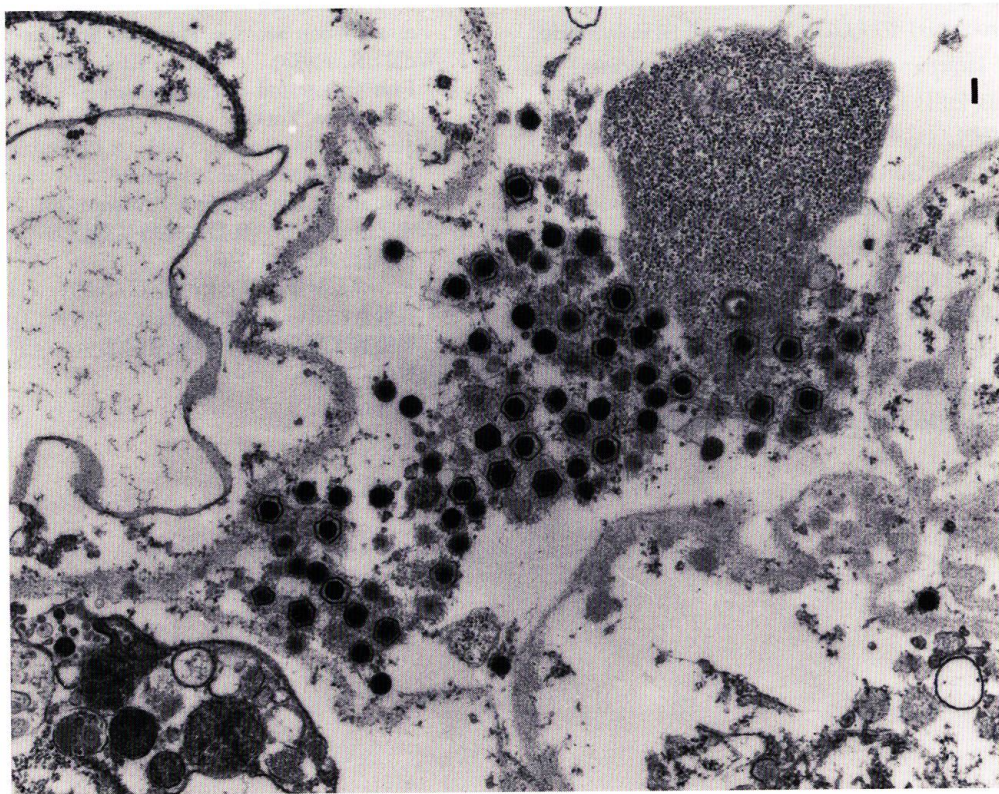


Fig. 3. Japanese flounder lymphocystis disease virus (JF-LCDV) in HINAE cells (— : 250 nm).

Fig. 2 および 3 に示した。ウイルスは壊死細胞の細胞崩壊部分あるいは一部細胞質内の空胞内に観察された。正六角形で大きさは 245~250 nm であった。

## 考 察

今回、直播き法を用いてヒラメの胚由来細胞の樹立を試みた。従来のトリプシン消化法のようにトリプシン濃度、消化時間、消化温度等の予備実験を行う必要がなく、少量の試料から効率よく培養細胞を立ち上げることができ、貴重な試料に適した方法と考える。

HINAE 細胞および CHIE 細胞共に当初は順調であったが、継代数が 10 に達したときに、フラスコをプライマリアから通常のフラスコへ、継代時の細胞数を  $2.0 \times 10^5$  cells/ml へ、さらに培地の血清濃度を 10% に変更したことにより、CHIE 細胞の発育速度が遅くなった。今後は、これら培養条件変更時期をより慎重に決定しなければならないと考える。

LCDV は古くから欧州と南北アメリカの沿岸や内陸の魚で報告され、わが国をはじめ、アフリカ、オーストラリアなどでも見られ地球上に分布するものと考えられている (Wolf, 1988)。原因ウイルスはイリドウイルス科リンホシチスウイルス属に分類されているが、大きさは魚種によって異なっている。LCDV は 1966 年に米国の bluegill (*Lepomis macrochirus*) の LCDV が bluegill 由来の培養細胞 BF-2 および largemouth bass (*Micropterus salmoides*) 由来の LBF-1 細胞を用いて Wolf (1962) により分離されたが、種特異性が厳しく、その後、分離報告は認められなかった。1999 年になって Garcia-Rosado et al. (1999) がスペインの gilt-head seabream (*Sparus aurata*) の LCDV を同魚種由来の SAF-1 細胞で分離し報告している。わが国のヒラメおよびマダイの LCDV について、HF 細胞を用いて分離を試みたが不成功に終わっている。今回、ヒラメ由来の HINAE 細胞によりヒラメの LCDV を分離することができた。今後は分離ウイルスの性状を検討すると共に、ワクチン源としての利用等、本病の防除対策への応用を計って

行きたいと考える。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、貴重な試料の提供を頂いた鳥取県水産試験場の山本栄一博士、ヒラメ胚由来細胞の分与を頂いた京都大学大学院農学研究科附属水産実験所教授青海忠久博士、HINAE 細胞の電顕観察にご協力いただいた(株)田辺 P&D サービスの小野沢正人氏に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- Fryer, J.L. and C.N. Lannan (1994). Three decades of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fishes. *J. Tissue Culture Methods*, **16**, 87-94.
- Garcia-Rosado, E., D. Castro, S. Rodriguez, S.I. Perez-Prieto, and J.J. Borrego (1999). Isolation and characterization of lymphocystis virus (FLDV) from gilt-head sea bream (*Sparus aurata*, L.) using a new homologous cell line. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **19**, 53-56.
- Kimura, T. and M. Yoshimizu (1991). Viral diseases of fish in Japan. *Annual Rev. Fish Diseases*, **1**, 67-82.
- Yoshimizu, M., K. Kamei, S. Direkbusarakom, and T. Kimura (1988). (Fish cell lines: Susceptibility to salmonid viruses. pp. 207-210, Kuroda, Y., E. Kurstak, and K. Maramorosch (eds)) *Invertebrate and fish tissue culture*. Japan Sci. Soc. Press and Springer-Verlag, Tokyo.
- Wolf, K. (1988). (Lymphocystis disease. pp. 268-291.) *Fish viruses and fish viral diseases*. Cornell University Press, New York.
- Wolf, K., M. Gravell, and R.G. Malsberger (1966). Lymphocystis virus: isolation and propagation in centrarchid fish cell lines. *Science*, **151**, 1004-1005.
- 吉水 守 (1997). 魚類由来培養細胞のウイルス感受性, 日水誌, **63**, 245-246.
- 吉水 守・西澤豊彦・木村喬久 (2000). (日本国内で管理保管されている魚類由来株化細胞. pp. 319-334, 日本動物細胞工学会 (編)) *動物細胞工学ハンドブック*. 朝倉書店, 東京.