



Title	魚類病原ウイルスの保存法
Author(s)	木村, 喬久; 吉水, 守
Citation	日本微生物株保存連盟会誌, 4(1), 1-8
Issue Date	1988
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39589
Type	journal article
File Information	yoshimizu-52.pdf



魚類病原ウイルスの保存法

北海道大学水産学部微生物学講座, 〒041 北海道函館市港町3-1-1

木村 喬久・吉水 守

Preservation of Fish Pathogenic Viruses

Takahisa Kimura and Mamoru Yoshimizu

Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University,

3-1-1, Minato, Hakodate, Hokkaido 041 Japan

SUMMARY

Preservation of fish pathogenic viruses under the freezing or freeze-dry conditions was studied. The viability of viruses after freezing or freeze-dry was estimated. On the freezing method, effects of freezing speed, storage temperatures and cryoprotectants on infectivity of viruses were compared.

Fish pathogenic viruses, infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), infectious hematopoietic necrosis virus (IHN), *Oncorhynchus masou* virus (OMV), *Herpesvirus salmonis* (*H. salmonis*) suspended in culture medium supplemented with 10 % DMSO or glycerol were preserved retaining their viability under -80°C or liquid nitrogen. DMSO was more effective than glycerol to keep infectivity of virus. Although effect of freezing speed on virus infectivity was not so significant, rapid freezing was more effective than slow freezing.

On the freeze-dry method, 2% cryoprotectants, namely lactose and sorbitol, were suitable for IPNV and IHN. Skimmilk, albumin and sodium glutamate were effective for OMV to avoid the loss of virus infectivity. Storage at -20°C or 0°C for the freeze-dried specimens was more effective than at room temperature.

Fish pathogenic viruses; IPNV, IHN, OMV and *H. salmonis* were preserved at -80°C or in liquid nitrogen and were also preserved by the freeze-dry method.

緒 言

魚類は変温動物であり、魚類病原ウイルスの至適発育温度は宿主魚類の生息環境水の温度に依存する。たとえばサケ科魚類の病原ヘルペスウイルス *Herpesvirus salmonis* のように至適発育温度が 10°C のものや(26)、アメリカナマズのヘルペスウイルス channel catfish virus (CCV) のように 30°C のものも存在する(17)。

温度安定性もサケ科魚類の伝染性膵臓壊死症 (infectious pancreatic necrosis virus: IPNV) ウイルスのように低温下 (0°C) で数年間も感染性が保持されるものもあれば(12)、サケ科魚類のヘルペスウイルス *Oncorhynchus masou* virus (OMV) のように 0°C でも2週間程度で感染性を消失するものもある(6)。魚類病原ウイルスの研究を進めるにあたり、ウイルスの性状や病原性を変化させることなく長期間保存することが必要である。しかし、魚類病原ウイルスの保存法についての研究は少ない。

本報では魚類病原ウイルスの保存法の開発を目的に、まず低温下における魚類病原ウイルスの温度安定性

を検討した。さらに低温保存法における凍害防御剤の種類と濃度、凍結速度および保存温度などのウイルスの安定性に及ぼす影響について検討した。また凍結乾燥保存法における凍害防御剤の種類および保存温度の検討も行ったので、これらの結果を報告する。

実験材料および方法

供試ウイルス：凍結保存における保存温度および凍害防御剤の添加効果の検討には、魚類病原ウイルスとして infectious pancreatic necrosis (IPN) virus (22) (VR-299, Buhl, Ab, Sp 株), infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus (1) (CHAB, SRCV, RTTO, HV-1 株) および *Oncorhynchus masou* virus (5) (OMV; 00-7812 株) を、凍結乾燥保存法の検討には IPNV (VR-299), IHNV (CHAB) および OMV を供試した。

供試細胞：魚類由来株化細胞としてニジマス (*Salmo gairdneri*) 卵巣由来の RTG-2 細胞 (23) を供試し、10% 牛胎児血清 (FBS) 加 Eagle's MEM (Gibco) (以後 MEM₁₀ と称す) を用い 15°C で培養した。

供試ウイルスの調製法：IPNV, IHNV および OMV の培養には RTG-2 細胞を用い、15°C で 7～10 日間培養後、培養液をポアサイズ 0.45 μm (ミリポアフィルター HA) あるいは 0.40 μm (ヌクレオポアフィルター; OMV の場合) のフィルターで濾過してバイアルチューブに分注後、-80°C に保存し、この同一ロットのウイルスを再度上記の条件で培養後フィルターで濾過し実験に供した。

低温下における安定性および凍害防御剤の添加効果の測定：供試ウイルス液に 5% の割合にグリセロールあるいはジメチルスルホオキシド (DMSO) を添加し、ポリプロピレンチューブに分注して 0, -20, -80°C, および液体窒素中に保存し、1 週間および 1, 3, 6 カ月後にウイルス感染価を RTG-2 細胞を用いた常法のマイクロタイター法により測定した。

凍害防御剤の濃度の影響：凍害防御剤の添加濃度の検討には OMV の培養濾液に DMSO を 1, 2.5, 5, 10% の割合に添加して、-20°C に保存し、それぞれ 1, 2, 3, 4 週間後に感染価を測定した。

冷却速度の影響：IPNV と IHNV の培養濾液を対象に DMSO およびグリセロールを 10% の割合に添加し、プログラムフリーザー (プランナー, RKRYO-10) を用い、0.3°C/min の冷却速度で -30°C まで、あるいは 1.0°C/min の冷却速度で -60°C まで冷却し、以後液体窒素中へ投入、または直接液体窒素中へ投入の 3 条件を設定し、凍結後のウイルス感染価を比較した。

凍結乾燥法：凍結乾燥法の検討には IPNV (VR-299), IHNV (CHAB) および OMV (OO-7812) を供試し、凍害防御剤としてラクトース、グルコース、ソルビトール、スキムミルク、アルブミン、グルタミン酸ソーダを選び、それぞれ 2% 濃度となるように加えた後、凍結乾燥を行い無添加のものとウイルス感染価の比較を行った。凍結乾燥はドライアイス-アルコールで予備凍結の後、室温で真空凍結乾燥 (Labconco Model 175035) を行い、所用時間を 4 時間とした。保存温度としては -20, 0, 15°C を設定し、3, 6 カ月後のウイルス感染価をマイクロタイター法により測定し比較検討した。さらに一部は米国オレゴン州立大学で凍結乾燥を行い、郵送による輸送試験を実施した。

結 果

凍結保存温度：ウイルスの低温下での安定性を Fig. 1, 2 に示した。IPNV (VR-299) および IHNV (CHAB) は -20°C で安定であったが、OMV は不安定で -80°C 以下で保存する必要が認められた (Fig. 1)。株間では IHNV の各株はデータは示していないが -20°C でいずれも安定であった。しかし IPNV の Buhl, Ab, Sp 株は不安定であった (Fig. 2)。したがって IPNV や OMV 各株の保存には DMSO あるいはグリセロールを添加して -80°C 以下で保存する必要性が認められた。

DMSO の添加濃度：OMV を対象に DMSO を 1, 2.5, 5, 10% の割合に加え最適添加濃度を検討した。

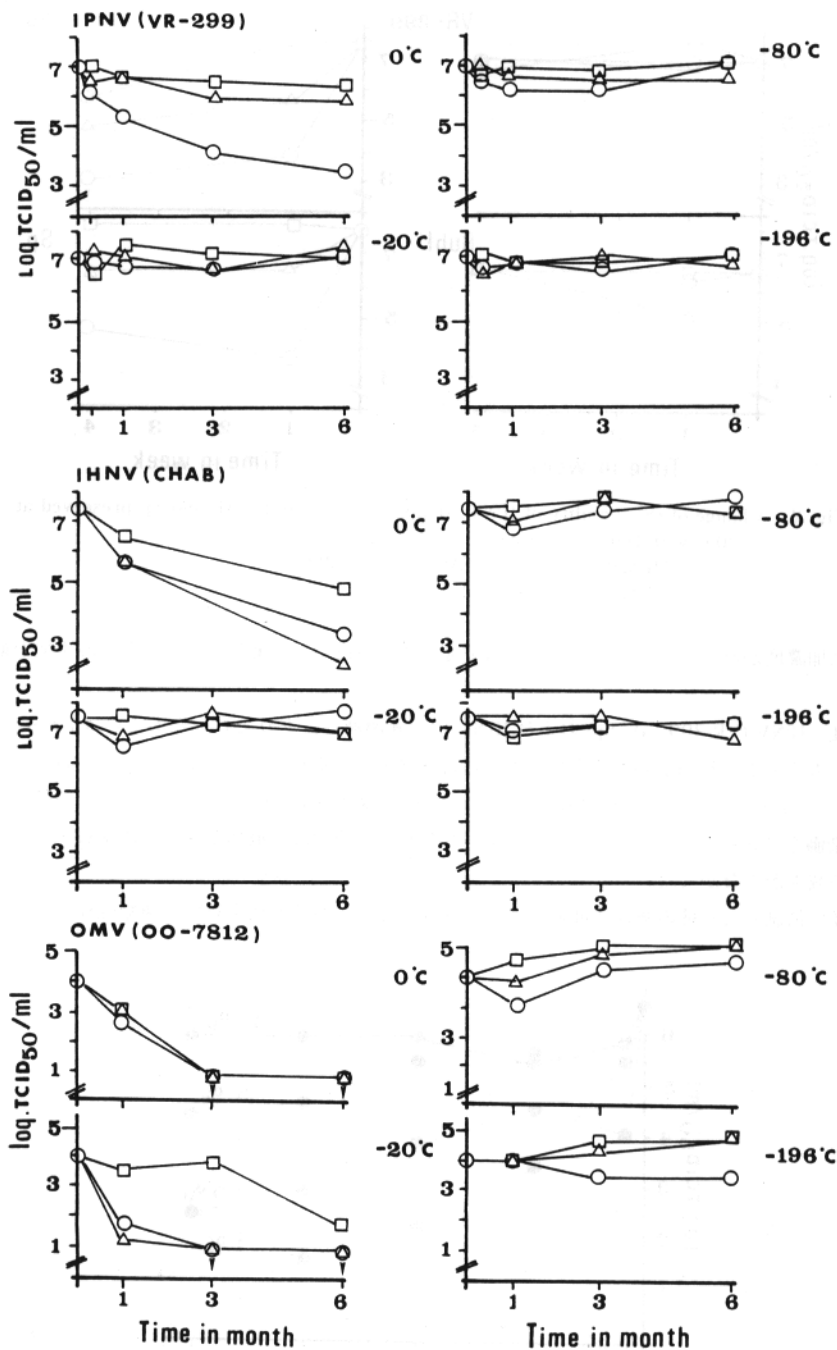


Fig. 1. Viability of IPNV (VR-299), IHN (CHAB) and OMV (00-7812) preserved at 0, -20, -80 C and in liquid nitrogen with DMSO or glycerol.
 ○—○ : MEM10, □—□ : MEM10 + 5 % DMSO
 △—△ : MEM10 + 5 % glycerol

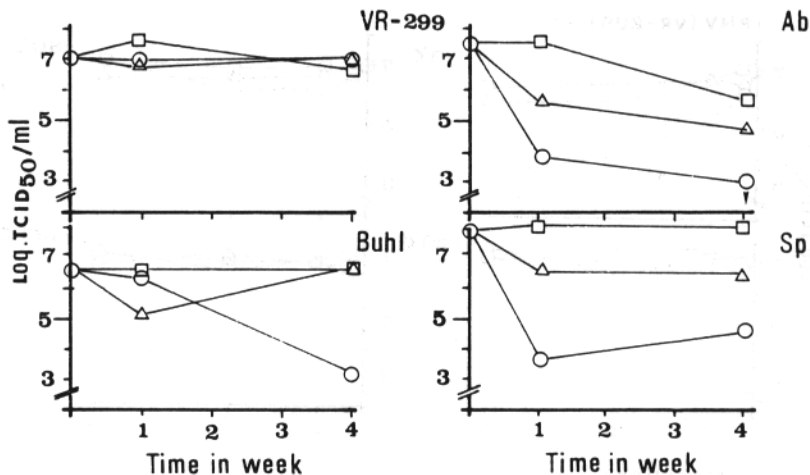


Fig. 2. Change of the viability of IPNV, strain VR-299, Buhl, Ab and Sp preserved at -20°C with DMSO or glycerol.
 ○—○ : MEM10, □—□ : MEM10 + 5 % DMSO
 △—△ : MEM10 + 5 % glycerol

DMSO の添加濃度が高くなるにつれウイルスは安定した (Fig. 3)。保存には10%濃度の添加が最も適していた。

冷却速度：IPNV (VR-299, Ab, Sp) および IHN の培養濾液に、グリセロールあるいは DMSO を10%の割合で加えたものおよび無添加のものを用いた。冷却速度 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で -30°C まで冷却し、以後液体窒素へ、 $1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、 -60°C まで冷却し以後液体窒素へ、および直接液体窒素中に投入の3条件で凍結を行った。凍結後の感染価を Table 1 に示した。緩慢冷却よりもむしろ急速冷却 (液体窒素への直接投入) の方がウイルス感染価の減少が少なかった。

凍結乾燥：供試した6種の凍害防御剤を2%の割合に加えて凍結乾燥を行い、凍結乾燥前後のウイルス感

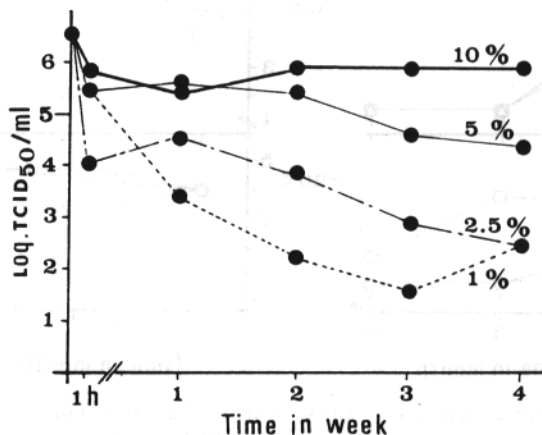


Fig. 3. Effect of the concentration of DMSO on OMV (00-7812) viability preserved at -20°C .
 —●— : MEM10+10%DMSO, —○— : MEM10+ 5 %DMSO,
 - - -●- - : MEM10+2.5%DMSO, : MEM10+ 1 %DMSO,

Table 1. Effect of freezing speed and cryoprotectant on viability of IPNV and IHNV.

Freezing speed (C / min)	Cryoprotectant	Infectivity* ¹ (log.TCID ₅₀ /ml)			
		IPNV			IHNV
		VR-299	Ab	Sp	CHAB
0.3 C / min (to -30 C)	MEM ₁₀ * ²	3.30	0.80	0.80	4.80
	MEM ₁₀ + 10 % glycerol	7.80	3.80	5.80	4.55
	MEM ₁₀ + 10 % DMSO* ³	7.55	3.25	6.30	5.05
1.0 C / min (to -60 C)	MEM ₁₀	7.05	3.75	6.05	4.30
	MEM ₁₀ + 10 % glycerol	7.55	3.75	6.55	4.80
	MEM ₁₀ + 10 % DMSO	7.05	3.75	6.05	4.55
Directly into liquid nitrogen	MEM ₁₀	7.55	3.05	7.05	4.30
	MEM ₁₀ + 10 % glycerol	7.55	4.75	6.30	4.55
	MEM ₁₀ + 10 % DMSO	7.55	4.05	6.30	4.55
Before freezing		7.55	4.05	6.80	4.55

*¹ Preserved before a month and melted by running water (10 C).

*² Eagle's MEM supplemented with 10 % FBS.

*³ Dimethyl sulfoxide.

感染価を比較した。Table 2 にみられるように IPNV で 1～2 オーダ、IHNV で 2 オーダ、OMV では 2～3 オーダの感染価の低下が観察された。

凍結乾燥後の保存温度：ウイルス培養濾液に最終濃度が 2 % となるように凍害防御剤を加えて凍結乾燥を行い、-20、0 および 15℃ で 6 カ月間保存した。IHNV および IPNV にはラクトース、ソルビトールが凍害防御剤として優れた高い感染性が保持された。一方 OMV は培養濾液 (MEM₁₀) のみでも感染価は保持されたが、凍害防御剤としては、糖類よりもむしろスキムミルク、アルブミン、グルタミン酸ソーダの方が優れていた (Table 3)。データは示していないが 15℃ で保存した場合でも 6 カ月間はウイルス感染価に大きな変化は見られず、海外から郵送する輸送試験でも到着時 (凍結乾燥後 2 週間) ウイルス感染価に大きな変化は見られなかった (Table 4)。

考 察

魚類病原ウイルスのうち伝染性脾臓壊死症ウイルス IPNV (VR-299, Buhl 株) (2,20,27) や伝染性造血器壊死症ウイルス (infectious hematopoietic necrosis virus; IHNV) (1,13,14,17,27)、ウイルス性出血性敗血症ウイルス (viral hemorrhagic septicemia virus; VHSV) (4,8)、パイク稚魚のラウドウイルス (pike fry rhabdovirus; PFRV) (9,11) は無細胞濾液の状態でも 0～4℃ で 1 カ月から 1 年以上もの保存が可能とされており、IPNV では 20～50% にグリセリンを加え冷蔵保存する方法も報告されているが (12,22)、ヘルペスウイルスやラウドウイルスの中でもコイの春ウイルス病ウイルス (spring viremia of carp virus; SVCV) (3) のように 4℃ で数日から 2 週間程度で感染性を失うものもあり、ウイルスの一般的な保存法は確立していない。

凍結保存では、魚類ラウドウイルス：IHNV, VHSV, PFRV, SVCV, eel virus from America (EVA) (18), eel virus from Europe (EVEX) (19)、ヒラメのラウドウイルス症ウイルス *Rhabdovirus olivaceus* (hirame rhabdo-

Table 2. Comparison of viability of IPNV, IHN and OMV before and just after freeze dry.

Cryoprotectant	Infectivity (TCID ₅₀ /ml)		
	IPNV	IHN	OMV
MEM ¹ (Before freeze dry)	8.55	6.80	6.80
MEM + Lactose	7.05	6.30	4.05
MEM + Glucose	6.80	6.05	3.55
MEM + Sorbitol	7.30	6.55	3.80
MEM + Sodium glutamate	7.05	6.05	3.80
MEM + Albumin	6.55	5.80	3.05
MEM + Skim milk	7.30	6.30	3.05
MEM	7.30	5.80	3.30

¹ : Eagle's MEM supplemented with 10 % FBS.

Table 3. Effect of the cryoprotectant on viability of IPNV, IHN and OMV preserved -20 or 0 C for 6 months.

Cryoprotectant	Infectivity (TCID ₅₀ /ml)					
	-20 C			0 C		
	IPNV	IHN	OMV	IPNV	IHN	OMV
Before freeze-dry	8.55	7.05	6.55	8.55	7.05	6.55
MEM ¹ + 2% Lactose	7.55	4.30	3.05	7.55	7.05	2.80
MEM + 2% Glucose	7.05	6.80	2.55	6.80	5.30	3.05
MEM + 2% Sorbitol	7.05	6.05	3.05	7.55	7.05	2.80
MEM + 2% Sodium glutamate	7.55	7.30	3.80	8.80	6.80	5.80
MEM + 2% Albumin	5.30	4.05	5.30	6.55	3.80	6.05
MEM + 2% Skim milk	6.80	4.30	3.80	7.55	4.80	5.55
MEM	6.55	3.55	5.55	7.30	4.55	7.55

¹ : Eagle's MEM supplemented with 10 % FBS.

virus; HRV) (7) などでは -20 C 以下での凍結保存において凍害防御剤の有無にかかわらず少なくとも 2 年間は安定であることがすでに明らかにされているが, SVCV は -5 ~ -20 C では感染性が低下するとの報告もある (3)。一方ビルナウイルスに属す IPNV は株間により安定性が異なり, 北米由来株 VR-299 や Buhl 株は -20 C 以下の保存において比較的安定であるが, ヨーロッパ由来株は -20 C では不安定であるとされ (24), また北米由来株でもカットスロートトラウト由来の CTT 株は -60 C 保存でも 1 カ月間で 99% 以上の感染価の減少を示すという (15)。一方魚類のヘルペスウイルスは一般に不安定で 0 C はむろん -20 C でも速やかに感染性を消失し -80 C 以下に保存することが要求されている (5, 6, 17)。

本報では IPNV, IHN, OMV を対象に冷却速度, 凍結保存時における温度安定性, 凍害防御剤の添加濃度についての検討を行った。IPNV の Buhl, Ab, Sp 株および OMV は -20 C で不安定で, DMSO あるいはグリセロールを添加して -80 C 以下で保存する必要が認められた。DMSO の添加濃度は 10% が最も適していた。

Table 4. Change of the viability by transportation from U.S.A. to Japan with mail after freeze-dry.

Virus	Preservation period ^{*1}	Infectivity (Log.TCID ₅₀ /ml)	
		Cryoprotectant	
		Lactose	Sorbitol
IPNV (Buhl)	Before freeze-dry ^{*2}	8.30	8.80
	Just after ^{*2}	6.35	5.80
	2 weeks ^{*3}	(6.30) ^{*4}	6.80
	4 weeks	6.80	6.55
IHNV (SRCV)	Before freeze-dry	(6.55) ^{*4}	6.80
	Just after	6.05	6.30
	2 weeks	4.80	4.05
	4 weeks	3.30	≤ 2.80

*¹ : Preserved in 25 ~ 30 C.

*² : Infectivity was measured in Oregon State University.

*³ : Infectivity was measured in our laboratory after 2 and 4 weeks.

*⁴ : Ampoule was broken for some reason.

一方冷却速度のウイルス感染価に及ぼす影響をプログラムフリーザーを用いて検討したが緩慢冷却よりも急速冷却の方がウイルス感染価の減少が少なく液体窒素中への直接投入法が簡便で効果的と考えられた。

以上の結果より魚類病原ウイルスの保存には、ウイルス培養濾液に10%の割合に DMSO を加え-80℃低温槽もしくは液体窒素中に直接投入する方法が推奨され、この方法により現在 IPNV, IHNV の各株ならびに SVCV, PFRV, EVA, EVEX, HRV, OMV, *H. salmonis*, CCV, chum salmon virus (CSV) (21) が-80℃および液体窒素中でいずれも2年間保存されている(データ未発表)。

一方魚類病原ウイルスの凍結乾燥法については IPNV (VR-299) 培養濾液にスキムミルクや乳糖, ラクトース, アルブミンを(25), VHSV, SVCV, PFRV では FBS を2%の割合に加えて凍結乾燥を行い4℃あるいは-20℃に保存することにより良好な成績が報告されている(8,10,11)。本報ではこれらの結果を参考に供試ウイルス培養濾液に6種の凍害防御剤を2%の割合に加えて凍結乾燥を行い、凍結乾燥前後のウイルス感染価を比較したところ、若干感染価の低下が観察されたが凍結乾燥後の保存期間に感染価が減少しなければ、十分実用に供し得る方法であると考えられた。そこで凍結乾燥後-20, 0, 15℃で4週間保存しウイルス感染価の測定を行ったところ感染価の低下も少なく安定であった。凍害防御剤としては IHNV および IPNV にはラクトース, ソルビトールが、また OMV にはスキムミルク, アルブミン, グルタミン酸ソーダが優れていた。これらの結果を踏まえウイルス培養濾液と凍害防御剤を等量、最終濃度が2%となるように加えて凍結乾燥をおこない、アンプルを-20℃に保存したところ、上記の魚類病原ウイルスはいずれも2年間保存された(データ未発表)。以上の方法により魚類病原ウイルスの感染価は変化なく安定的に保持されることが明かとなった。しかし、保存後の病原性についての報告例はない。今回-80℃で保存1年後の OMV を供試して病原性を検討したが、感染魚の症状および斃死率に凍結前の実験結果と差は認められなかった(データ未発表)。今後病原性はもちろん抗原性や他の性状にも変化がないかどうか検討する必要がある、さらに少なくとも数年間は継続して観察を続け検討する必要があると考える。

謝 辞

本研究は農林水産省農林水産技術会議，昭和59～61年度特別研究「微生物の長期保存法に関する研究」によった，ここに記して謝意を表する。また凍結乾燥保存法に関しては種々協力頂いたオレゴン州立大学微生物学科の J. L. Fryer 博士，および米国野生生物局，魚類研究センターの J. R. Winton 博士に感謝の意を表する。

引用文献

- 1) Amend, D. F., Fish Disease Leaflet. 39 : 6 (1974).
- 2) Desautels, D. and R. M. Mackelvie, J. Fish. Res. Board Can. 32 : 523 (1975).
- 3) Fijan, N. N., Infectious dropsy in carp - a disease complex. In Mawdesley-Thomas (ed.), Disease of fish, p. 39, Symp. Zool Soc., London, (1972).
- 4) Frost, J. W. and S. Wellhouse, Zentbl. Vet. Med. 21 : 625 (1974).
- 5) Kimura, T., M. Yoshimizu, and M. Tanaka, Fish Health News 9, iii (1980).
- 6) Kimura, T., M. Yoshimizu, and M. Tanaka, Fish Pathol. 15 : 143 (1981).
- 7) Kimura, T., M. Yoshimizu, and S. Gorie, Dis. aquat. Org. 1 : 209 (1986).
- 8) de Kinkelin, P., Propriétés in vitro du virus d'Egtved. In Dill, W. A. (ed.), Symp. on the major communicable fish disease in Europe and their control. p.28, FAO EIFAC Tech. Paper., 17 (1973).
- 9) de Kinkelin, P., Galimard, and R. Bootsma, Nature 241 : 465 (1973).
- 10) de Kinkelin, P., and M. Berre, Ann. Microbiol. 125 : 113 (1974).
- 11) de Kinkelin, P., M. Berre and G. Lenoir, Ann. Microbiol. 125 : 93 (1974).
- 12) Mackelvie, R. M. and D. Desautels, J. Fish. Res. Board Can. 32 : 1267 (1975).
- 13) McAllister, P. E. and K. S. Pilcher, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145 : 840 (1974).
- 14) McAllister, P. E., J. L. Fryer and K. S. Pilcher, Arch. Gesante Virusforsch. 44 : 270 (1975).
- 15) McMichael, J. S., J. L. Fryer and K. S. Pilcher, Aquaculture 6 : 203 (1975).
- 16) Pietsch, J. P., D. F. Amend and C. M. Miller, J. Fish Res. Board Can. 34 : 1360 (1977).
- 17) Plumb, J. A., L. D. Wright and V. L. Jones, Prog. Fish Cult. 35 : 170 (1973).
- 18) Sano, T., Fish Pathology 10 : 221 (1976).
- 19) Sano, T., T. Nishimura, N. Okamoto and H. Fukuda, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 43 : 491 (1977).
- 20) Tu, K. C., R. S. Spendlove and R. W. Goede, Infect. Immunity 11 : 1409 (1975).
- 21) Winton, J. R., C. N. Lannan, J. L. Fryer, and T. Kimura, Fish Pathology 15 : 155 (1981).
- 22) Wolf, K., C. Dumbler and S. F. Snieszko, Prog. Fish Cult. 22 : 64 (1960).
- 23) Wolf, K. and M. C. Quimby, Science 135 : 1065 (1962).
- 24) Wolf, K. and M. C. Quimby, Arch. ges. Virus Forsch 32 : 144 (1971).
- 25) Wolf, K., M. C. Quimby and C. P. Carloson, Appl. Microbiol. 17 : 623 (1969).
- 26) Wolf, K., R. W. Darlington, W. G. Taylor, M. C. Quimby and T. Nagabayashi, J. Virol. 27 : 659 (1978).
- 27) 吉水 守・瀧澤絃子・亀井勇統・木村喬久・魚病研究 21 : 223 (1986).