



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	サケ科魚類卵巣腔液からの伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)の分離に適した細胞の選択
Author(s)	吉仲, 桃子; 吉水, 守; 絵面, 良男
Citation	魚病研究, 32(2), 75-80 https://doi.org/10.3147/jsfp.32.75
Issue Date	1997-06-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53145
Type	journal article
File Information	article84.pdf



サケ科魚類卵巣腔液からの伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV) の分離に適した細胞の選択

吉仲桃子*・吉水 守*・絵面良男*

(1996年7月2日 受付)

Selection of Suitable Cell Line for Isolation of the Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) from Ovarian Fluid of Salmonid fish

Toko Yoshinaka*, Mamoru Yoshimizu* and Yoshio Ezura*

*Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041, Japan

(Received July 2, 1996)

Replicability and yield of 2 strains of IHNV in 9 salmonid cell lines (CHSE-214, KO-6, RTE, RTG-2, RTH, RTT, SEH, STE, RTE-2) and 3 non-salmonid cell lines (FHM, EPC, EPG) were compared at a low M.O.I. of 0.001. Yield of IHNV in RTE-2 derived from rainbow trout embryo was as high as those of RTG-2, EPG, FHM and EPC cell lines. Although EPC and FHM cell lines showed high sensitivity to toxic substances in the ovarian fluid from masu salmon *Oncorhynchus masou*, RTE-2 and RTG-2 showed low susceptibility to these substances. These results indicate that the RTE-2 and RTG-2 cell lines are suitable for the isolation of IHNV from the ovarian fluid.

Key words: IHNV, cell line, cytotoxic effect, RTE-2, RTG-2, EPC, FHM, salmonid

ニジマスの養殖やサケ・マス類の孵化放流事業において、健康な種苗を確保する上で採卵用親魚の健康管理が重要な課題であり、現在有効な治療法のないウイルス病や細菌性腎臓病 (BKD) の防疫対策として採卵親魚のウイルスおよび細菌検査が日常検査の重要な項目となっている (吉水・野村, 1989)。特に伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV) によるニジマスおよび在来マスの被害は大きく、防疫対策の確立が重要な課題となっている (Amend *et al.*, 1969; Pilcher and Fryer, 1980; Yamazaki and Motonishi, 1992)。そのため採卵・孵化現場におけるウイルス検査の関心も高く、現場担当者が自ら採材し冷蔵輸送による検査依頼が増加し、われわれの研究室における1990年以降の検体数は2500件を上回っている (野村ら, 1991; Yoshimizu *et al.*, 1993)。

ウイルスの分離にはそれぞれ目的とするウイルスに対して感受性の高い細胞を用いるべきであるが、複数の細

胞を用いることは多大な労力と経費を要する。またウイルス感受性が高くても魚体成分による細胞毒性効果が発現すれば再度継代しなければならない。そこで想定される複数のウイルスに感受性を有し、かつ魚体成分の影響をあまり受けない細胞が存在すれば検査遂行上得られる利点は大きい。

Fendrick *et al.* (1982) は IHNV を分離、培養するための細胞として CHSE-214, STE-137, RTG-2, EPC, FHM の5種類の細胞を比較し、EPC と FHM 細胞が IHNV 分離、培養に優れているとした。現在、CHSE-214, RTG-2, EPC, EPG 細胞が各県の水産試験場をはじめ一般に広く用いられている。Yoshimizu *et al.* (1988) は32種の魚類由来細胞を対象に2株の IHNV の増殖量を比較検討し、CHH-1, SE, RTG-2, CHSE-214 細胞で高い感染価を得たと報告している。またニジマス胚体由来の RTE-2 細胞が IHNV に高い感受性を示す報告もある (Fernandez, 1990; Fernandez *et al.*, 1993)。

そこで上記の報告を参考に比較的 IHNV の増殖量の多い12種類の魚類由来細胞を選び、増殖量を比較検討し

* 北海道大学水産学部微生物学講座 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041, Japan).

た。さらにこれらのうち増殖量が多かった5種類と広く魚類のウイルス分離に用いられる CHSE-214 細胞を用いて、IHNВ 検出陽性群であったサクラマス の卵巣腔液成分等の影響を調べた。これらの結果を総合して、現場で多数の卵巣腔液サンプルから IHNВ を高頻度で分離できる細胞を選択した。

材料および方法

供試株化細胞

当研究室で継代培養中のサケ科魚類由来の CHSE-214, KO-6, RTE, RTG-2, RTH, RTT, SEH, STE および RTE-2 細胞, サケ科魚類以外の魚種由来の EPC, EPG, FHM 細胞の総計 12 種類を株化細胞として供試した (Table 1)。細胞の培養には 10% 牛胎児血清, ペニシリン 100 I.U./ml, ストレプトマイシン 100 μ g/ml, 0.15% NaHCO₃ および Tris-Buffer を含む Eagle's minimum essential medium (Gibco; 以後 MEM₁₀-Tris と称す) を用いた。

供試ウイルス株

供試ウイルス株として北海道のサケから分離された IHNВ (ChAb) 株 (Yoshimizu *et al.*, 1989) と本州のニジマスから分離された IHNВ (HV-7601) 株 (Sano *et al.*, 1977) を選定した。両ウイルス株の CHSE-214 細胞を用いて測定したウイルス感染価はそれぞれ 10^{5.3} および 10^{6.3} TCID₅₀/ml であった。

供試卵巣腔液

1993 年 9 月に採取した IHNВ 検出陽性群の斜里川遡上サクラマスの卵巣腔液 (60 検体) を本実験に供試した。なお卵巣腔液は、現地において採卵直前の成熟親魚の排卵腔に滅菌チップを挿入して約 1ml を無菌的に採取し (Yoshimizu *et al.*, 1985), 同量の抗生物質入り Balanced Salt Solution (Anti Ink: Hanks' Balanced Salt Solution 100ml, Penicillin-G 1500 I.U./100ml, Streptomycin 1500 μ g/100ml, Mycostatin 800 Unit/ml) を添加してよく混合したのち、氷冷して実験室へ輸送し直ちにウイルス検査を行った。そ

Table 1. Fish species and type, tissue of origin, and original reference of fish cell lines.

Cell line	Species	Pass No.	Tissue of origin/morphology	Original Reference
Salmonids				
CHSE-214	chinook salmon (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	260	embryo/epithelioid	Fryer <i>et al.</i> , 1965
KO-6	kokanee salmon (<i>O. nerka</i>)	155	ovary/epithelioid	Lannan <i>et al.</i> , 1984
SEH	chum salmon (<i>O. keta</i>)	65	embryo/epithelioid	Fernandez <i>et al.</i> , 1993
RTE	rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	102	embryo/epithelioid	Yoshimizu <i>et al.</i> , 1988
RTE-2	rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	53	embryo/epithelioid	Fernandez <i>et al.</i> , 1993
RTG-2	rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	62	gonads/epithelioid	Wolf & Quimby, 1962
RTH	rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	215	hepatoma/epithelioid	Fryer <i>et al.</i> , 1981
RTT	rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	68	tail/epithelioid	Yoshimizu <i>et al.</i> , 1988
STE	rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	206	embryo/epithelioid	Lannan <i>et al.</i> , 1984
Non-salmonids				
EPC	carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	62	epithelioma/epithelioid	Fijan <i>et al.</i> , 1983
EPG	goldfish (<i>Carassius auratus</i>)	63	epithelioma/epithelioid	Fernandez <i>et al.</i> , 1993
FHM	fathead minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	237	caudal trunk/epithelioid	Gravell & Malsberger, 1965

の後、本実験に供試するまで、 -80°C に凍結保存した。なお、この卵巢腔液の凍結前のウイルス検査で IHNV 陽性となった卵巢腔液の IHNV 感染価は、CHSE-214 細胞を用いて測定したところ $10^2\sim 10^4$ TCID₅₀/ml であった。

ウイルスの接種

供試株化細胞を 2.0×10^5 cell/ml に調整し、その 5.0ml を 25cm² フラスコ (Falcon) に分注し、 20°C で 24 時間培養後、IHNV を M.O.I.=0.001 となるように接種した。接種後、培養温度を 15°C にして、1, 3, 5, 7 日目にフラスコから培養液を 0.1ml ずつ取り、CHSE-214 細胞を用いてウイルス感染価を 50% 終末点法により測定した。

サクラマス由来卵巢腔液のウイルス検査法

上記の測定で IHNV に対して高い感染価と増殖量を示した 5 種類の細胞を選択し、一般的に広くウイルス検査に用いられている CHSE-214 細胞を加えた計 6 種類の細胞を 2.0×10^5 cells/ml に調整後、96 ウェルプレートに $100\mu\text{l}$ ずつ播き、 20°C で 24 時間培養後、供試サクラマス体腔液を $50\mu\text{l}$ ずつ 4 ウェルに接種し、 15°C で 10 日間培養した。細胞に変化が現れた試料について、それぞれ初回接種時と同じ細胞を播いた 24 ウェルプレートに継代し、細胞変性効果 (CPE) を観察した。この時、細胞に CPE が見られなかった試料は初回接種時の変化が細胞毒性 (CTE) によるものと判定した。一方、RTE-2 細胞に CPE が見られた試料については残りの 5 種、すなわち RTG-2、EPC、EPG、FHM、CHSE-214 細胞でさらに継代を行い、CPE であることを確認した。なお RTE-2 細胞で CPE が観察されなかったが他の細胞で CPE が観察された試料については全供試細胞に接種し、CPE であることを確認した。これら CPE 発現試料由来ウイルスについては抗 IHN ウィルスウサギ血清 ($\text{ND}_{50}=1:128$) を用いた定性的中和試験を行った。

結 果

M.O.I. を 0.001 にして接種した場合の IHNV の増殖量

IHNV ChAb 株を M.O.I. を 0.001 にして接種した場合の増殖量を Fig.1-A に示した。3 日目に RTG-2 細胞は $10^{7.8}$ TCID₅₀/ml 以上の感染価を示し、RTE-2、EPG、EPC 細胞がそれぞれ 6.80, 6.30, 5.80 (log.TCID₅₀/ml) と高い感染価を示した。次に IHNV HV-7601 株の結果を Fig.1-B に示した。HV-7601 株の場合、RTE-2、RTG-2、EPC、EPG、FHM、STE の 6 種類の細胞で増殖が早く、3 日目にそれぞれ 6.05, 5.80, 5.05, 5.30, 5.80, 5.30 (log.TCID₅₀/ml) の感染

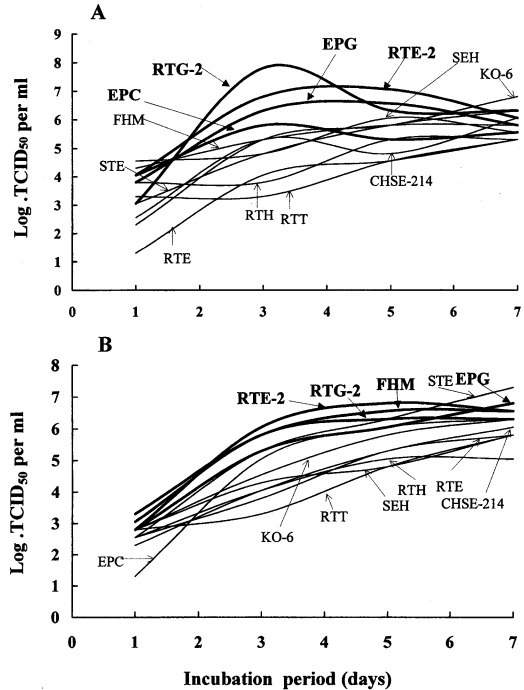


Fig. 1. Yield of IHNV in 12 fish cell lines (M.O.I.=0.001)

A: IHNV strain ChAb

B: IHNV strain HV-7601

価を示した。

サクラマス採卵親魚の卵巢腔液を接種した場合の CPE と CTE の出現

上記の RTE-2、RTG-2、EPC、EPG、FHM 細胞に CHSE-214 細胞を加えた 6 種類の細胞を用いて、斜里川に遡上したサクラマス採卵親魚の卵巢腔液 60 検体を検査した結果を Table 2 に示した。初回接種時に細胞に形態変化が現れた検体数は FHM で 26、EPC で 25、EPG で 21、RTE-2 で 19、RTG-2 で 13、CHSE-214 で 11 検体であった。なお 60 検体中 13 検体はすべての供試細胞で全く変化が観察されなかった。次に 24 ウェルプレートを用い、細胞に変化の生じた細胞から同一細胞に継代した結果 CPE が出現した検体数は RTE-2 で 14、RTG-2 で 12、EPC で 11、EPG で 10、FHM で 7、CHSE-214 で 2 検体であった。一方、初回接種時の細胞の変化が細胞毒性 (CTE) と判断された検体数は FHM で 19、EPC で 14、EPG で 11、CHSE-214 で 9、RTE-2 で 5、RTG-2 で 1 検体となった。なおこれらの検体のうちいずれの細胞でも CPE が出現しなかった検体数は 29 検体であった。残る 18 検体はいず

Table 2. CPE formation of six fish cell lines inoculated with 60 ovarian fluid samples from masu salmon collected at Shari River

	Cell lines					
	RTE-2	CHSE-214	EPC	EPG	FHM	RTG-2
1st inoculation (CPE+CTE)	19	11	25	21	26	13
2nd inoculation* ¹						
Sample No.(CPE positive)						
1	+		+	+	+	+
3	+		+	+		
5			+* ³			
6	+					+
10	+		+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	
14	+					+
17	+	+	+	+	+	+
18	+					
20						+* ⁴
23	+			+		+
26	+					
27	+		+			
33	+		+	+		+
35	+		+	+	+	+
39						+* ⁴
42			+	+	+	+* ⁴
53	+		+	+	+	+
CPE	14	2	11	10	7	12
CTE(1st-2nd)	5	9	14	11	19	1
3rd inoculation						
Positive in RTE-2	14	14	14	14	14	14
Positive in EPC						
but negative in RTE-2* ³	1	1	1	1	1	1
Positive in RTG-2						
but negative in RTE-2* ⁴	3	3	3	3	3	3
Total CPE* ²	18	18	18	18	18	18

*¹ Cell lines which showed cytopathic effect(CPE) and/or cytotoxic effect(CTE) in the 1st inoculation were passed again to the same cell line. Cytological changes in the cell line at the 1st inoculation were judged as CPE for those with changes (marked as “+”) and as CTE for those without changes in the cell line at the 2nd inoculation.

*² A total of 18 samples showed CPE in either of the 6 cell lines after the 2nd inoculation. Of these, 14, 3 and 1 samples with CPE in RTE-2, RTG-2 and EPC, respectively, inoculated to all the cell lines in the 3rd inoculation revealed all positive in CPE.

*³ Positive in EPC but negative in RTE-2.

*⁴ Positive in RTG-2 but negative in RTE-2.

れかの細胞で CPE を形成し、その中で CPE 出現の一番多かったのは RTE-2 細胞の 14 検体で、同細胞から残りの 5 種の細胞に継代した場合、全ての細胞に CPE が見られた。次に RTE-2 細胞で CPE が見られず、他の細胞で CPE が観察された試料は 4 検体(試料番号 No.5, 20, 39,

42) であった。それらのうち RTG-2 細胞で No. 20, 39, 42 の 3 検体、EPC で No. 5, 20 の 2 検体、EPG, FHM で No. 42 の 1 検体に CPE が見られた。そこで No. 20, 39, 42 は RTG-2 から、No. 5 は EPC から他の 5 種の細胞に継代した。その結果いずれの細胞にも CPE が出現した。なお

CPE 発現試料由来ウイルスは抗 IHNV ウサギ血清を用いた中和試験により IHNV と判定した。

考 察

北海道に回帰するサケ科魚類採卵親魚の保有するウイルス感染価は米国での報告例 (Mulcahy et al., 1983) に比べると低く、卵巣腔液中のウイルス感染価の多くは 10^{2-4} TCID₅₀/ml 程度であった (Yoshimizu et al., 1989)。従って 10^2 TCID₅₀/ml 程度のウイルス感染価を有する試料からウイルスを分離するためには、細胞を 2.0×10^6 cells/ml とした場合、細胞とウイルスの量的関係すなわち感染の多重性 (M.O.I.) は 0.025–0.00025 となり、この M.O.I. が 0.001 程度で細胞変性効果が出現し、かつウイルス増殖が早く、増殖量の多い細胞を用いる必要がある。

供試した IHNV ChAb 株と HV-7601 株の増殖が共に早く、かつウイルス増殖量の多い細胞として、サケ科魚類由来細胞の RTE-2 および RTG-2 細胞、サケ科以外の魚類由来細胞の EPC, EPG, FHM の計 5 種類を選んだが、この結果は Fendrick et al. (1982) が選んだ EPC, FHM 細胞、Yoshimizu et al. (1988) が選んだ 4 種の細胞の一つ RTG-2 細胞を含み、現在一般に IHNV の分離に用いられている細胞と同じになった。さらに Fernandez (1990), Fernandez et al. (1993) が、日本のサケ科魚類から分離された IPNV, IHNV, NeVTA, OMOV, CSV およびギンザケの脳由来ウイルスに対しても感受性を有し、サケ科魚類の卵巣腔液の検査に適した細胞とした RTE-2 細胞をも含む結果となった。

次いで実際のウイルス検査を考慮し、上記 RTE-2, RTG-2, EPC, EPG, FHM 細胞に一般に広く魚類のウイルス検査に使用されている CHSE-214 細胞を加え、IHNV 陽性群のサクラマス採卵親魚の卵巣腔液を用いて検討した。初回接種では FHM, EPC, EPG に細胞の変性が多くみられたが、同一細胞による継代を行ったところ継代不能なものが多く、細胞の変化は毒性によるものと判断した。これらの細胞のように初回接種に細胞変性が見られても、継代を行わないとその変化が毒性物質によるものなのか、ウイルスによるものなのか判断できず、結果的に労力と日数を要する。また同じ試料でも細胞が異なるとウイルスが分離できない場合があり、CPE 出現率の高かった RTE-2, RTG-2 および EPC 細胞から、供試細胞全てを用いたクロス継代を行い、最終的に 60 検体中 18 検体を IHNV 陽性と判定した。EPC, EPG, FHM 細胞では初回接種時に細胞に変化が観察されたにもかかわらず、継代できずに CTE の判定となった検体が多数あった。しか

し、RTE-2, RTG-2 細胞は初回接種時の CPE と CTE を含む細胞の形態変化が EPC, EPG, FHM 細胞にくらべて少なかったが、細胞毒性の影響も少ない細胞であった。

以上の結果からウイルス産生量が多いこと、ウイルス感受性が高いことおよび細胞毒性に比較的強いことなどを総合的に判断し、RTE-2 あるいは RTG-2 細胞を IHNV の分離に適した細胞として選択した。

謝 辞

本研究は平成 6 年度文部省科学研究費補助金基盤研究 (B) (課題番号 06454095) によった。ここに記して謝意を表する。

文 献

- Amend, D. F., W. T. Yasutake and R. W. Mead (1969): A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **98**, 796–804.
- Fendrick, J. L., W. J. Groberg, Jr. and J. C. Leong (1982): Comparative sensitivity of five cell lines to wild type infectious hematopoietic necrosis virus from two Oregon sources. *J. Fish. Dis.*, **5**, 87–95.
- Fernandez, R. D. (1990): Studies on the establishments, characterization, viral susceptibilities and preservation of fish cell lines. 学位論文、北海道大学, 119p.
- Fernandez, R. D., M. Yoshimizu, T. Kimura and Y. Ezura. (1993): Establishment and characterization of seven continuous cell lines from freshwater fish. *J. Aquat. Anim. Health*, **5**, 137–147.
- Fijan, N., D. Sulimavic, M. M. Bearzotti, D. Muzinic, L. O. Zwillenberg, S. Chilmonczyk, J. F. Vautherot and P. de Kinkelin (1983): Some properties of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, **134E**, 207–220.
- Fryer, J. L., A. Yusha, K. S. Pilcher (1965): The *in vitro* cultivation of tissue and cells of Pacific salmon and steelhead trout. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **126**, 566–586.
- Fryer, J. L., B. B. McCain and J. C. Leong (1981): A cell line derived from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) hepatoma. *Fish Pathol.*, **15**, 193–200.
- Gravell, M. and R. G. Malsberger (1965): A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **126**, 555–565.
- Lannan, C. N., J. R. Winton and J. L. Fryer (1984): Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro*, **20**, 671–676.
- Mulcahy, D., R. J. Pascho and C. K. Jones (1983): Titer distribution patterns of infectious hematopoietic necrosis virus in ovarian fluids of hatchery and feral salmon populations. *J. Fish Dis.*, **6**, 183–188.

- 野村哲一・吉水 守・木村喬久 (1991): 外観上正常なサケ, カラフトマス成熟親魚の *Aeromonas salmonicida* 保有状況. 魚病研究, **26**, 139–147.
- Pilcher, K. S. and J. L. Fryer (1980): The viral disease of fish. *CRC, Critical Rev. Microbiol.*, **7**, 287–363.
- Sano, T., T. Nishimura, N. Okamoto, T. Yamazaki, H. Hanada and Y. Watanabe (1977): Studies on viral disease of Japanese fishes. IV. Infectious hematopoietic necrosis (IHN) of salmonids in the main land of Japan. *J. Tokyo Univ. Fish.*, **63**, 81–85.
- Wolf, K. and M. C. Quimby (1962): Establishment eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science*, **135**, 1065–1066.
- Yamazaki, T. and A. Motonishi (1992): Control of infectious hematopoietic necrosis and infectious pancreatic necrosis in salmonid fish in Japan. In “Salmonid disease” (ed. by T. Kimura), Hokkaido Univ. Press, Sapporo, Japan, pp.103–110.
- Yoshimizu, M., T. Kimura, J. R. Winton (1985): An improved technique for collecting reproductive fluid samples from salmonid fishes. *Prog. Fish-Cult.*, **47**, 199–200.
- Yoshimizu, M., M. Kamei, S. Direkbusarakom and T. Kimura (1988): Fish cell lines; Susceptibility to salmonid viruses. In “Invertebrate and fish tissue culture” (ed. by Y. Kuroda, E. Kustak and K. Maramorosch), Japan Scientific Societies Press, Tokyo/Springer Verlag, Japan, pp.207–210.
- 吉水 守・野村哲一 (1989): サケマス採卵親魚の病原微生物検査法, 魚と卵, **158**, 49–59.
- Yoshimizu, M., T. Nomura, T. Awakura, Y. Ezura and T. Kimura (1989): Prevalence of pathogenic fish viruses in anadromous masu salmon (*Oncorhynchus masou*) in the northern part of Japan, 1976–1987. *Physiol. Ecol. Japan*, spec. vol.1, 559–576.
- Yoshimizu, M., T. Nomura, Y. Ezura and T. Kimura (1993): Surveillance and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and *Oncorhynchus masou* virus (OMV) of wild salmonid fish returning to the northern part of Japan 1976–1991. *Fish. Res.*, **17**, 163–173.