HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	細胞培養法とRT-PCR法を組み合わせた神経壊死症ウイルスの検出
Author(s)	渡辺, 研一; 吉水, 守
Citation	日本水産学会誌, 68(2), 197-200 https://doi.org/10.2331/suisan.68.197
Issue Date	2002-03-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53373
Rights	© 2002 公益社団法人日本水産学会
Type	journal article
File Information	article106.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Nippon Suisan Gakkaishi 68(2), 197–200 (2002)

細胞培養法とRT–PCR法を組み合わせた神経壊死症ウイルスの検出

渡辺研一,[1*a] 吉水 守[2]

(2001年3月14日受付，2001年10月17日受理)

[1]日本栽培漁業協会厚岸事業場，[2]北海道大学大学院水産科学研究科

Detection of nervous necrosis virus using RT–PCR combined with tissue culture

KEN-IHI WATANABE[1*a] AND MAMORU YOSHIMIZU[2]

[1]Akkeshi Station of Japan Sea-Farming Association, Akkeshi, Hokkaido 088–1108, [2]Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041–8611, Japan

The detection rates of viral nervous necrosis (VNN) virus by direct RT–PCR, tissue culture using SSN–1 cell line and RT–PCR combined with tissue culture were compared. Tested specimens were whole bodies of striped jack and brown sole larvae, eyes and brain of Pacific cod juveniles, and heads of Japanese flounder juveniles, which were affected by VNN. The specimens were diluted with a 10–fold serial dilution. RT–PCR combined with tissue culture for seven days using the SSN–1 cell line was the most sensitive and rapid method for the detection of infectious VNN virus.

キーワード：ウイルス性神経壊死症，ウイルス検出，RT–PCR，細胞培養

ウイルス性神経壊死症（VNN）は，海産魚類の主として仔稚魚に発生する致死性の高い宿主範囲の広い疾病である。[1] 日本栽培漁業協会厚岸事業場の技術開発対象種であるマツカワ *Verasper moseri* 稚魚に本疾病が発生し，その防除対策の確立が急務となった。[2]

マツカワのVNNは，主に親魚からの垂直感染により発生すると考えられ，[2] 本疾病を防除するためには，原因ウイルスを保有しない受精卵を得る必要がある。現在，マツカワの種苗生産過程における受精卵の検査は，卵巣腔液および精液を対象としたRT–PCR法（以下PCR法）により検査されている。しかし，シマアジ[3]およびマツカワ[2]では仔稚魚にVNNが発生し，PCR法の検出限界以下の微量ウイルスに由来する受精卵の選別ミスがその原因として考えられている。近年，このマツカワのVNN原因ウイルス（BF–NNV）をストライプドスネークヘッド *Channa sriatus* 由来の株化細胞であるSSN–1細胞[4]により分離・培養することが可能となった。[5] 培養細胞を用いたウイルス検査は感度の高い方法であるが，[6] cytopathic effect（CPE）の発現に約10日を要し，マツカワの受精卵が通常10日間でふ化する[7]ことから，検査結果を待って結論を出すと，時としてウイルスに感染したふ化仔魚を飼育水槽に収容してしまうこととなる。その場合，ふ化環境のみならず，種苗生産環境もウイルスで汚染される可能性がある。したがって，迅速かつ確実な検出法の開発が望まれている。

吉仲ら[8]は，伝染性造血器壊死症（IHN）ウイルスの検出に際し，試料を接種した細胞を1日培養し，その細胞をPCR法に供することにより，高感度，迅速，確実にIHNウイルスを検出できることを報告した。本報では吉仲ら[8]の培養・PCR併用法（以下併用法）をBF–NNVに応用し，試料を培養細胞に接種してウイルスの分離を行う方法，試料を直接PCRに供する方法および併用法により検査を行い，ウイルス検出感度および検出に要する日数を比較した。

* Tel : 81–767–84–1182. Fax : 81–767–84–1184. Email : kenichi-watanabe@jasfa.or.jp
[a] 現所属：日本栽培漁業協会能登島事業場（Notojima Station of Japan Sea-Farming Association, Ishikawa 926–0216, Japan）

材料と方法

供試魚および材料 本研究に用いた病魚材料は，1992年の日本栽培漁業協会五島事業場のシマアジ仔魚，1996年の北海道立栽培漁業総合センターのマダラ稚魚，同年の日本栽培漁業協会能登島事業場のマガレイ仔魚，および1998年の宮城県栽培漁業センターのヒラメ稚魚である。また，PCR法でウイルス陰性を確認したマツカワ仔魚の頭部ホモジネートに培養BF-NNVを混合した試料と産卵期末期のマツカワ親魚から得た卵巣腔液を対照試料として実験に供試した。シマアジでは5尾プールの全魚体3検体を，マダラでは稚魚1尾の眼と脳3検体を，マガレイでは10尾プールの全魚体3検体を，さらにヒラメでは3尾プールの頭部3検体を供試し，それぞれ9倍量のHanks' balanced salt solution (HBSS, Gibco) でホモジナイズし，0.45 μm フィルター (HA，ミリポア) でろ過除菌し，適宜希釈したものを被検液とした。なおシマアジでは試料重量の関係から99倍量のHBSSで希釈した。BF-NNV混合試料では，健康なマツカワ仔魚の頭部を9倍量のHBSSでホモジナイズ後，同様にろ過除菌し，培養BF-NNVを$10^{6.8}$ $TCID_{50}$/mLとなるように混合した試料2検体を被検液とした。マツカワ卵巣腔液では6個体から採取した卵巣卵を3,000 $\times g$ で5分間遠心分離して上清を採取後，HAでろ過除菌し，200 IU / mLのペニシリンG (Sigma) と200 μg / mLの硫酸ストレプトマイシン (Sigma) を含むHBSSを等倍量加えたものを被検液とした。なお，供試材料は試験に供するまでいずれも−80℃に保存した。

供試培養細胞 魚類由来培養細胞としてストライプドスネークヘッド由来のSSN-1[4]を供試し，前報[5]にしたがって細胞培養用96 wellプレート (Falcon) に培養した。1試料につき被検液を50 μLずつ4 well (BF-NNV混合試料では2 well) に接種し，シマアジ，マガレイおよびヒラメ由来試料を接種した細胞は20℃で，マダラおよびマツカワ由来試料では15℃で培養した。シマアジ由来試料では10^{-3}~$^{-8}$，マダラ，マガレイおよびヒラメ病魚由来試料では10^{-1}~$^{-8}$，BF-NNV混合試料では10^{0}~$^{-8}$に希釈した。マツカワ卵巣腔液試料では，24 wellプレート (Iwaki) で培養したSSN-1細胞に1試料につき被検液原液を100 μLずつ4 wellに接種して15℃で培養した。

結果の判定法 試料を接種した4 wellのうち2 wellは，7日間細胞変性の有無を観察した後，細胞と培地を3,000 $\times g$ で5分間の遠心後，上清50 μLを同様にプレートに培養したSSN-1細胞に継代するとともに，遠心後のペレットと上清をPCR法に供試した。残りの2 wellは2週間観察を続けると共に，同様にPCR法に供試した。さらに上清を盲継代し，接種後2週間観察を行った。BF-NNV混合試料は7日間培養後，細胞変性の有無を観察し，2 wellを同様にPCR法に供試した。

PCR法には，卵巣腔液試料では被検液原液を，BF-NNV混合試料では階段希釈した被検液100 μLを，病魚由来試料では階段希釈した被検液50 μLを，併用法では採取した細胞浮遊液を3,000 $\times g$ で5分間遠心後の細胞ペレットと上清およそ50 μLを核酸抽出用試料として用いた。核酸抽出はIsogen (ニッポンジーン) を用いて行い，得られた核酸の全量をPCR法に供した。PCR法によるウイルス遺伝子の検出は，Nishizawa *et al.*[9] の方法の，逆転写酵素をSuper Script Ⅱ (Gibco) へ，DNAポリメラーゼをEX *Taq* (TaKaRa) へ変更し，NNVのT4領域を増幅した。[10]

結果と考察

病魚試料からのVNNウイルス検出結果をTable 1に示す。シマアジ病魚由来試料では，直接PCR法により10^{-7}希釈した被検液までウイルス遺伝子が検出された。細胞培養法では，7日培養後に10^{-4}希釈で，14日後には10^{-7}に希釈した被検液を接種した細胞で，細胞の膨化と顆粒様物質を含む球形細胞の出現が観察された。盲継代した細胞を14日間培養したものでは，10^{-7}希釈した被検液を接種した細胞まで同様の変化が観察され（データは示していない），これらはVNNウイルスのCPEと考えられた。培養日数によるウイルス検出状況の違いでは，14日間培養した場合には7日間の培養に比べて1,000倍高い希釈倍率の被検液においてもウイルスが検出された。直接PCR法では10^{-7}希釈した被検液までウイルス遺伝子が検出され，14日間培養した場合と比較してウイルス検出状況に差が認められなかった。併用法では，7日間ならびに14日間予備培養した場合ともに10^{-8}希釈した被検液までウイルスが検出され，培養日数の違いによりウイルス検出状況に差は認められなかった。直接PCR法との比較では，併用法で10倍高い希釈倍率の被検液においてもウイルスが検出された。細胞培養法と比較すると，7日間培養した場合に較べ10,000倍，14日間培養した場合に較べ10倍，併用法によりウイルスが検出された被検液の希釈倍率が高かった。

マダラ病魚由来試料でも同様に，直接PCR法により10^{-4}，細胞培養法により10^{-4} (7日間培養)，10^{-6} (14日間培養)，併用法により10^{-7} (7日間予備培養)，10^{-7} (14日間予備培養) 希釈した被検液までウイルスが検出され，併用法によりウイルスが検出された被検液の希釈倍率が最も高かった。

マガレイおよびヒラメ病魚由来試料でも各ウイルス検出法の検出状況は同様の結果となった。

Table 1. Comparison of NNV detection in several diseased fish by direct RT-PCR, tissue culture, and RT-PCR from preincubation

Specimen (Prefecture)	Method	Number of specimens	Dilution rate of virus solution*1							
			−1	−2	−3	−4	−5	−6	−7	−8
Striped jack (Nagasaki)	Direct RT-PCR	3	ND*2	ND	3*3	3	3	3	1	0
	Tissue culture (7 days)		ND	ND	3	3	0	0	0	0
	Tissue culture (14 days)		ND	ND	3	3	3	3	2	0
	RT-PCR combined with tissue culture (7 days)		ND	ND	3	3	3	3	3	3
	RT-PCR combined with tissue culture (14 days)		ND	ND	3	3	3	3	3	3
Pacific cod (Hokkaido)	Direct RT-PCR	3	3	3	2	1	0	0	0	0
	Tissue culture (7 days)		3	3	2	1	0	0	0	0
	Tissue culture (14 days)		3	3	3	3	3	1	0	0
	RT-PCR combined with tissue culture (7 days)		3	3	3	3	3	3	2	0
	RT-PCR combined with tissue culture (14 days)		3	3	3	3	3	3	2	0
Brown sole (Ishikawa)	Direct RT-PCR	3	3	3	3	0	0	0	0	0
	Tissue culture (7 days)		3	3	3	3	0	0	0	0
	Tissue culture (14 days)		3	3	3	3	3	0	0	0
	RT-PCR combined with tissue culture (7 days)		3	3	3	3	3	3	1	0
	RT-PCR combined with tissue culture (14 days)		3	3	3	3	3	3	1	0
Japanese flounder (Miyagi)	Direct RT-PCR	3	3	3	3	3	3	0	0	0
	Tissue culture (7 days)		3	3	3	3	3	2	0	0
	Tissue culture (14 days)		3	3	3	3	3	3	3	3
	RT-PCR combined with tissue culture (7 days)		3	3	3	3	3	3	3	3
	RT-PCR combined with tissue culture (14 days)		3	3	3	3	3	3	3	3
Head of barfin flounder larvae containing cultured BF-NNV	Direct RT-PCR	2	2	2	2	0	0	0	0	0
	Tissue culture (7 days)		2	2	2	2	1	0	0	0
	RT-PCR combined with tissue culture (7 days)		2	2	2	2	2	2	1	0

*1 $\log_{10}$ (dilution rate of virus solution).
*2 Not done.
*3 Number of specimens that showed positive result.

また，健康なマツカワ稚魚の頭部ホモジナイズ液に BF-NNV を混合した試料では，直接 PCR 法で 10^{-3}，細胞培養法で 10^{-4}~$^{-5}$，併用法で 10^{-6}~$^{-7}$ 希釈した被検液までウイルスが検出され，併用法によりウイルスが検出された被検液の希釈倍率が最も高かった。

さらに，マツカワ卵巣腔液を試料としたところ，直接 PCR 法および細胞培養法を用いた場合には VNN ウイルスが検出されなかった。併用法では予備培養 7 日目と 14 日目ともに，6 検体中 2 検体からウイルスが検出され，併用法のウイルス検出状況が最も優れるとともに，予備培養日数による違いは認められなかった（データは示していない）。

以上の結果から，VNN ウイルスの検出感度は，併用法＞細胞培養法≧直接 PCR 法の順に高く，併用法では予備培養期間の違いによる検出感度に差がないことが明らかとなった。試料に $10^{6.8}$ $TCID_{50}$/mL となるように BF-NNV を混合した試料では，培養法により 10^{-4}~$^{-5}$ 希釈した被検液まで，併用法により 10^{-6}~$^{-7}$ 希釈した被検液までウイルスが検出された。被検液として 50 μL を接種していることから，細胞培養法では理論値通りとなった。一方併用法では，さらに 100 倍希釈した被検液からもウイルスが検出された。このことから，培養法による検出限界量以下のウイルスを SSN-1 細胞が増殖させ，PCR 法を併用したことにより VNN ウイルスを検出できたことが推察される。

今までに，VNN ウイルスの検出法として電子顕微鏡観察，[11] ELISA 法，[12] PCR 法，[9] 蛍光抗体法，[13] 酵素抗体法，[14] *In situ* hybridization[15] および細胞培養法[5] など

が報告されている。これらのうち電子顕微鏡観察，蛍光抗体法，酵素抗体法および *In situ* hybridization による方法は組織切片を作製する必要があることから，多くの試料について調査するには不向きである。ELISA 法は，多くの試料を短時間で処理することができるため，受精卵のウイルス保有の有無を調査する方法として優れているが，PCR 法より VNN ウイルス検出感度が低いことが報告されている。[16] したがって，従来法の中で高感度に多数の試料の検査が可能な方法として，直接 PCR 法および細胞培養法が挙げられる。

本報告で明らかとなったように，細胞培養法では併用法と同等のウイルス検出結果を得るのに，2 倍の 14 日間を要し，直接 PCR 法では不可能であった。これらのことから，現状で最も高感度に，かつ速やかに VNN ウイルスを検出できる方法は併用法であるものと考えられる。

吉仲ら[8]は，直接 PCR 法，細胞培養法および併用法を用いてサクラマスおよびベニザケ稚魚からの IHN ウイルスの検出結果を報告している。サクラマスにおける IHN ウイルス検出率は，直接 PCR 法で 0％，細胞培養法で 56％，併用法で 100％であった。ベニザケでは同様に 0％，0％，33％であった。これらのことから，併用法はサケ科魚類の IHN においても最も感度の高いウイルス検出法であると考えられ，VNN ウイルスの場合も同様であった。

マツカワの受精卵は 10 日でふ化する。[7] したがって，種苗生産に用いる受精卵の検査の際には，卵巣腔液や精液を SSN-1 細胞に接種し，7 日予備培養後に PCR 法によりウイルス陰性と判定された卵と精液を用いて得た受精卵からふ化した仔魚を種苗生産に用いることが，現状において最も迅速で確実な本疾病における親魚から仔魚への垂直感染を防除する方法と考える。

謝　辞

本研究に当たり，試料を分与いただいた北海道立中央水産試験場，宮城県栽培漁業センター，日本栽培漁業協会上浦事業場森広一郎博士，日本栽培漁業協会能登島事業場有瀧真人主任技術員（現宮古事業場）に感謝申し上げる。

文　献

1) 室賀清邦，古澤　徹，古澤　巌．シマアジのウイルス性神経壊死症．水産増殖 1998; **46**: 473–480.
2) 渡辺研一，石間正浩，川真田憲治，吉水　守，絵面良男．マツカワにおけるウイルス性神経壊死症の発生．北大水産彙報 1999; **50**: 101–113.
3) Nishizawa T, Muroga K, Arimoto M. Failure of the polymerase chain reaction (PCR) method to detect striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack *Pseudocaranx dentex* selected as spawners. *J. Aquat. Anim. Health* 1996; **8**: 332–334.
4) Frerichs GN, Rodger HD, Peric Z. Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Gen. Virol.* 1996; **77**: 2067–2071.
5) 渡辺研一，吉水　守．魚類由来培養細胞の魚類ノダウイルス感受性．魚病研究 1999; **34**: 213–214.
6) Yoshimizu M, Kimura T, Winton JR. An improved technique for collecting reproductive fluid samples from salmonid fishes. *Prog. Fish-Cult.* 1985; **47**: 199–200.
7) 渡辺研一，鈴木重則．水槽内におけるマツカワの自然産卵と卵の発生状況から推定した産卵時刻．日水誌 1999; **65**: 408–413.
8) 吉仲桃子，堀　友花，本西　晃，河西一彦，山本　淳，鈴木邦雄，宇賀神光男，野村哲一，吉水　守．RT-PCR と細胞培養法を組み合わせた伝染性造血器壊死症ウイルス（IHNV）の検出．サケ・マス資源管理センター研究報告 1998; **1**: 29–34.
9) Nishizawa T, Mori K, Nakai T, Furusawa I, Muroga K. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Org.* 1994; **18**: 103–107.
10) 渡辺研一，吉水　守．マツカワのウイルス性神経壊死症原因ウイルス遺伝子の検出に及ぼす PCR 条件の検討．水産増殖 2001; **49**: 85–90.
11) Yoshikoshi K, Inoue K. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Disease* 1990; **13**: 69–77.
12) Arimoto M, Mushiake K, Mizuta Y, Nakai T, Muroga K, Furusawa I. Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathol.* 1992; **27**: 191–195.
13) Nguyen DN, Nakai T, Muroga K. Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 1990; **24**: 99–105.
14) Office International des Epizooties (OIE) Diagnostic manual for aquatic animal diseases. The centre for environment, fisheries & Aquaculture science, Dorset. 1996; 195p.
15) Comps M, Trindade M, Delsert Cl. Investigation of fish encephalitis viruses (FEV) expression in marine fishes using DIG-labeled probes. *Aquaculture* 1996; **143**: 113–121.
16) Mushiake K, Nishizawa T, Nakai T, Furusawa I, Muroga K. Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.* 1994; **29**: 177–182.