



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ワカサギWF-1 (シリーズ28バイオテクノロジー素材としての培養細胞 哺乳類以外の有用細胞 (I) 魚類細胞)
Author(s)	吉水, 守
Citation	蛋白質核酸酵素, 36(14), 2447-2448
Issue Date	1991-11
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/54799
Rights	©1991 共立出版 共立出版の許可を得て、本コレクションに収録したものです。
Type	journal article
File Information	sosetsu5b.pdf



Jpn. Soc. Sci. Fish., 49, 1159-1163 (1983)

Cult., pp. 47-77 (1987)

11) Abstracts of VII Int. Conf. Inverte. and Fish Tis.

ウナギ EK-1

哺乳類以外の有用細胞 (I) 魚類細胞

福田 頼穂 (東京水産大学水族病理学研究室)

【起源】 ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) の腎臓から、台湾大学の Chen らによって樹立された¹⁾。

【性質・特徴】

形態 上皮様細胞で、多核の細胞が少数含まれることが多く、単核で大型の細胞も存在する。また、繊維芽細胞の存在も指摘されている²⁾。

染色体構成・核型 染色体数は 21~62 と多様性に富むが、そのモードは 38 であり、ニホンウナギの体細胞のそれと同じであるという。

移植性 検討されていない。

【培養方法】

培養液 ウシ胎児血清 (5~10%) を含む L-15 培地を用いられる。

増殖形態 付着性の増殖を行ない、単層を形成する。浮遊培養系は開発されていない。増殖は 20~36°C で可能であるが、38°C 以上では 12 時間で死滅し、20°C では増殖速度が低下する。コロニー形成率は低い (8~9%¹⁾ あるいは 17%²⁾)。倍加時間は詳細には検討されていないが、約 1.5×10^5 個細胞/cm² で、5% FBS 添加 L-15 培地を用い、30°C で培養を開始した場合、3~4 日で飽和 ($5 \sim 6 \times 10^5$ 個細胞/cm²) に達する。

培養上の注意点 増殖可能温度範囲は広いが、数倍に希釈して 30°C 前後で培養し、数日のうちに継代するとよい。細胞分散剤としては、0.1% トリプシンと 0.02% EDTA を含む PBS⁻ (Mg²⁺ および Ca²⁺ を含まない)

を用いる。凍結保存は、グリセリンあるいは DMSO を 10% に加えた L-15 (10% FBS 添加) に約 10^6 個細胞/ml の濃度で懸濁して行なえば、-80°C でも数年間は可能であるが、グリセリンを用いたほうが生残率がよいようである。時に激しい空胞化を起こすことがあるが、継代を適正な時期にくり返すと回復することが多い。

【研究応用】

分化誘導、生化学的性状などに関してはまったく研究されていない。ただし、魚病の分野では病原ウイルスの分離に活用されている。ウナギからはヘルペスウイルス、パポバウイルス、ビルナウイルス、ラブドウイルス、レオウイルス、ピコルナ様ウイルスが分離されているが、これらウイルスのうち、ピコルナ様 (未発表)、パポバ (未発表) およびヘルペスウイルス³⁾ は EK-1 細胞ではよく増殖するものの、魚類ウイルス検査に広く使用されているサケ科あるいはコイ科など、ウナギ以外の魚種由来の細胞では増殖しなかった。

【文 献】

- 1) Chen, S., Ueno, Y., Kou, G.: *Proc. Natl. Sci. Coun. B. Roc.*, 6, 93-100 (1982)
- 2) Chen, S., Kou, G.: in *Invertebrate and Fish Tissue Culture* (eds. Kuroda, Y., Kurstak, E., Maramorosch, K.), pp. 218-227, Jpn. Sci. Soc. Press, Springer-Verlag (1988)
- 3) Sano, M., Fukuda, H., Sano, T.: in *Pathology in Marine Science* (eds. Perkins, F., Cheng, T.), pp. 15-31, Academic Press (1990)

ワカサギ WF-1

哺乳類以外の有用細胞 (I) 魚類細胞

吉 水 守 (北海道大学水産学部)

【起源】 ワカサギ (*Hypomus transpacificus*) の鰓から筆者ら¹⁾によって樹立された。

【性質・特徴】

形態 当初、一部に上皮細胞が混じっていたが、現在は繊維芽細胞のみで構成されている。

染色体構成 染色体数は 50 から 62 の範囲で測定され、モードは 57 にあった。ワカサギの染色体数 ($2n=56$) から 2 倍体のままであると考えられる。

【培養方法】

培養液 10% ウシ胎児血清を含むライボビットの L-15 培養液を用いる。この培養液はアミノ酸組成から pH が 7.2 前後に保たれ、炭酸ガス恒温器を必要としない。イーグルの MEM (minimum essential medium) を使用してもよい。この場合、緩衝液は Tris の使用が好ましい。

増殖動態 発育温度範囲は 5°C から 25°C であり、至適発育温度は 20°C である。15°C あるいは 20°C で $1.5 \sim 2.0 \times 10^5$ 個細胞/ml で培養すると約 1 週間で飽和密度になる。フラスコを用い上記濃度で培養すると、15°C で 1 カ月以上、生存が可能である。

培養の注意点 継代の際、細胞を 3~5 倍に希釈すると上記の密度になる。保存株は 15°C で培養し、1 カ月ごとに継代している。炭酸ガス恒温器は使用していない。凍結保存は 10% の割合に DMSO を加えたウシ胎児血清に 15°C 培養 7 日目の細胞を約 10^6 個/ml に懸濁し、-1°C/分 程度の温度勾配で -80°C まで下げ、その後、液体窒素中に保存している^{2,3)}。

【研究応用】

ドイツのエルベ川河口に棲息するスメルト (キュウリウオの仲間) の上皮腫瘍組織中に見られるヘルペスウイルス⁴⁾を分離する目的で、WF-2 (同じくワカサギの鰭由来細胞) と SF (チカの鰭由来細胞) とともに作製した細胞である¹⁾。魚類病原ウイルスではラブドウイルス⁵⁾ (サケ科魚類の伝染性造血器壊死症ウイルス IHNV, ヒラメラブドウイルス HRV, コイの春ウイルス病ウイルス SVCV, バイク稚魚ラブドウイルス PFRV, ウナギのラブドウイルス EVA, EVEX) およびアメリカナマズのヘルペスウイルスに感受性を持ち、ラブドウイルスの培養に適している。

【文 献】

- 1) Yoshimizu, M., Kamei, M., Dirakubusarakom, S., Kimura, T.: *in* Invertebrate and Fish Tissue Culture, pp. 207-210, Japan Scientific Societies Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin (1988)
- 2) 吉水 守: 凍結保存——動物・植物・微生物 (酒井昭編), pp. 94-96, 朝倉書店 (1987)
- 3) 吉水 守: 海洋, 22, 154-158 (1990)
- 4) Anders, K., Möller, H.: *J. Fish Dis.*, 8, 233-235 (1985)
- 5) Wolf, K.: *Fish viruses and Fish viral diseases*, 476 pp., Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, New York (1988)

ヤマメ YEL-13

Yamame embryonic liver の略

■ 哺乳類以外の有用細胞 (I) 魚類細胞 ■

【起源】 孵化直前のサクラマス¹⁾の陸封型、ヤマメ *Oncorhynchus masou* 胚の肝臓¹⁻³⁾。22 例培養を試みうちで最も増殖の速かった上皮細胞系。

【性質・特徴】

形態 上皮性、接触阻止を受けて単層で増殖。飽和密度になると敷石状になって増殖し、細胞は小型化する。電顕的には大型の核小体を有する円形の核をもち、細胞質にはミトコンドリアや粗面小胞体が発達している。YEL-13 は pseudoglobulin 分画に属する血清蛋白質を産生しており、培養液中に放出する。本細胞は粗面小胞体がよく発達しており、拡張した小胞体もしばしば見られることから、血清蛋白質合成系がよく発達した細胞系と考えられる²⁾。また、YEL-13 のなかには糖 (もしくは糖蛋白質) を産生しているものも存在し、PAS 陽性細胞が多数見られ、培養液中にも放出しているが、血清蛋

白質を産生している細胞とは違う細胞である。

染色体構成・核型 染色体数は $56 (=2n)$ であるが、50~80 の間でばらつきが多い。4 倍体もしばしば現われるが、3 倍体はほとんど見られない。

【培養方法】

培養液 イーグル MEM に 10% ウシ胎児血清 (FCS) を添加して培養する。ロットはあまり選ばないが、FCS 以外では培養できないと考えられる。2% FCS でも増殖速度は落ちるが培養可能。

増殖形態 20°C でいちばん増殖がよく、約 48 時間で倍加する。15°C でも若干、増殖速度は落ちるが増殖する。10°C では増殖はみられないが、死ぬことはない。25°C 以上では 1 週間以内に器面より剥がれて死んでしまう。

【培養上の注意】

飽和密度になったあと、そのまま培養すると、空胞変