学位論文題名

Studies on the Establishments, Characterization, Viral Susceptibilities and Preservation of Fish Cell Lines

(魚類培養細胞の樹立とその生物学的性状, ウイルス感受性ならびに保存法に関する研究)

学位論文内容の要旨

食糧資源としての魚類が見なおされ、世界各国において養殖魚あるいは放流用種苗の生産量が年々増加の一途をたどっている。しかし養殖および種苗生産対象魚介類の多くの種で病原微生物による疾病の発生が見られ、養殖業の経営や放流用種苗生産に打撃を与え大きな問題となっている。なかでもウイルス性の疾病は現時点では治療法がなく、被害が甚大であることから早急な対策の確立が急がれている。

ウイルス性疾病の研究には、原因ウイルスの分離・同定、性状検査に宿主由来培養細胞が不可欠である。サケ科魚類を中心に次々と培養細胞系が樹立され、研究に供されているものの、わが国の重要な養殖対象海産魚の培養細胞は、ヒラメ、ブリ、マダイでの報告があるのみで、海産魚の疾病原因ウイルスの多くは分離すらできない状況にある。

このような状況から、本研究では魚類病原ウイルス研究の発展に寄与し得る新しい魚類培養細胞の樹立を主眼とし、多数の既存の培養細胞を含めた魚類培養細胞に対する好適培養条件の設定、各種病原ウイルスの増殖・培養のための好適培養細胞の選択ならびに長期保存法等について以下の検討を行った。

まず、第一章において、シマアジ、クエとキジハタのハイブリット、カンパチ、ニジマス、サケ、キンギョ、ワカサギ、キノボリウオを供試し Japanese striped knife jaw gonad (JSKG), Kelp and redspotted grouper embryo (KRE), Purplish amberjack skin (PAS), Rainbow trout embryo No. 2 (RTE-2), Sake embryo head (SEH), Epithelioma papulosum of goldfish (EPG), Wakasagi Fin No. 1 (WF-1), Snakehead fish heart (SHH) 細胞を樹立した。

細胞数の測定は、組織培養用96穴プレートに培養した細胞を固定後、クリスタルバイオレットで染色し、600nmでの吸光値を求め、吸光値の増加から細胞の増殖量を推定する方法が正確か

つ簡便であることを明らかにし、以後本法を細胞の増殖量測定に用いた。樹立した細胞はいずれも炭酸緩衝液単独あるいは Tris 緩衝液混合 Eagle's MEM 培地で良く増殖し、海産魚由来細胞を含め、至適食塩濃度は0.116~0.171Mであった。至適発育温度はサケマス類由来細胞が15~20°C、他の温水魚由来細胞は20~30°Cであった。染色体は2nのものが大部分であったが、すでに人工培養環境に適応していた。魚類病原ウイルスとして伝染性腭臓壊死症ウイルス (IPNV)、伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV)、ヒラメのラブドウイルス (HRV)、コイの春ウイルス病ウイルス (SVCV)、アメリカウナギのラブドウイルス (EVA)、ヨーロッパウナギのラブドウイルス (EVEX)、バイク稚魚のラブドウイルス (PFRV)、サケ科魚類のヘルペスウイルス (OMV と *Herpesvirus salmonis*)、アメリカナマズのヘルペスウイルス (CCV)、サケのレオウイルス (CSV) を供試し各細胞のウイルス感受性を観察した。海産魚由来細胞はサケ科魚類のヘルペスウイルスに感受性を示さず、サケ科魚類由来細胞は CCV に感受性を示さなかった。EPG と WF-1 は IPNV, OMV, CCV, CSV に、SHH は *H. salmonis*, CCV, CSV に感受性を示さなかった。大部分のウイルスの増殖に新たに樹立した RTE-2 が優れていた。

第二章では現在微生物学講座において継代培養されている魚類由来細胞の中から代表的な17種類を選び、第一章で樹立した細胞と共に、魚類由来細胞の培養条件の検討を行った。前章で樹立した8種類の細胞の他、サケ科魚類由来の細胞として大西洋サケの卵巣由来細胞 ASE、サケ心臓由来の CHH-1、マスノスケ胚由来の CHSE-214、ヒメマスの卵巣由来細胞 KO-6、サケ胚由来の SE、ヤマメ腎臓由来の YNK、ニジマスの胚、卵巣、肝臓、尾柄由来の RTE, RTG-2, RTH, RTT, スチールヘッドトラウトの胚由来細胞 STE-137を、さらにサケ科魚類以外の淡水魚由来の細胞としてブルーギルの鱭由来の細胞 BF-2、アメリカナマズの卵巣由来 CCO、ウナギの卵巣および腎臓由来の EO-2 および EK-1、コイの上皮腫由来の EPC、ファットヘッドミノの尾柄由来の FHM 細胞を供試した。Eagle の MEM を基礎培地に CO₂ インキュベーターを用いた場合と Tris および HEPES 緩衝液を用いた場合ならびに Leibovitz の L-15と199培地を用いた場合の細胞増殖量を比較した。供試した細胞の中でサケ科魚類由来細胞を含む15種類の細胞は Eagle の MEM あるいは MEM₁、トリスを用いた場合最も良好な増殖を示した。前章同様至適増殖温度はサケ科魚類由来細胞が15~20°C、温水淡水魚由来細胞が20~30°C、海産魚由来の細胞は20~30°Cであった。至適食塩濃度は淡水魚および海産魚由来細胞共に0.116~0.171Mであった。

第三章では前章までに得られた至適培養条件下での魚類由来細胞のウイルス感受性および接種ウイルスの増殖量の検討を行った。サケ科魚類由来細胞の大部分は IPNV, IHNV, OMV およ

び *H. salmonis* に感受性を有したが、HRV, SVCV, CSV には一部感受性を示さず、CCV には大部分が感受性を示さなかった。他方温水魚および海産魚由来細胞は供試ラブドウイルスには感受性を有したが、サケ科魚類のヘルペスウイルスには感受性を示さなかった。ウイルス接種量の少ない場合にレスポンスが早くウイルス増殖量の多い細胞として IPNV では RTE - 2, CHSE-214, RTG- 2 が、IHNV では RTE- 2, RTG- 2, ASE が、HRV では EPC, RTE- 2, SEH, また OMV では RTE, KO- 6, CHH- 1 が、*H. salmonis* では YNK, KO- 6, RTE- 2 さらに CSV では SE, JSKG, SEH が優れていた。ウイルス増殖量は IPNV, IHNV, HRV, OMV, *H. salmonis*, CSV でそれぞれ 10^8 , 10^7 , 10^{11} , 10^4 , 10^5 , 10^5 TCID₅₀/ml 以上であった。特に RTE- 2 細胞は IPNV, IHNV, OMV の増殖に適した細胞であることが再確認された。

第四章では約10年間継代培養を続けた細胞と液体窒素中に保存した継代数の少ない細胞を用い、ウイルス増殖量と染色体数のモードの変化を観察した。供試した5種類の細胞におけるウイルス増殖量は IPNV や IHNV, *H. salmonis* の場合継代数の差による相違はほとんど見られなかったが、RTG - 2 と SE 細胞での OMV 増殖量は継代数の進んだ細胞で低下していた。供試した7種類の細胞のうち2種類の細胞で明らかな染色体数の増加が観察された。これらの細胞を保存する場合、FBS あるいは MEM₁₀ Tris に凍結保護剤として DMSO あるいはグリセリンを10%の割合で加え、0.3~1.0℃/min の温度勾配で-30℃あるいは-60℃まで下げ、その後液体窒素中に保存することにより、3年間生存率85%以上で保存することが可能であった。

以上本論文では、新たに産業上重要な8種の養殖対象魚類から培養細胞を樹立し、微生物学講座保存の多数の魚類培養細胞との比較から魚類培養細胞の特性および至適培養条件を明らかにし、既知の魚類病原ウイルスに対する最適な細胞系を明らかにすることができた。さらにこれら魚類細胞の最適な保存法を確立し得た。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 絵 面 良 男
副 査 教 授 信 濃 晴 雄
副 査 教 授 山 崎 文 雄
副 査 助 教 授 田 島 研 一

ウイルス性疾病の研究にはウイルスの分離から性状検査まですべて好適培養細胞が不可欠である。そこで本研究では新しい魚類培養細胞の樹立を主眼とし、既存の培養細胞を含めた魚類培養細胞の好適培養条件の設定、代表的魚類病原ウイルスの培養に適した培養細胞の選択並びに細胞の長期保存法について検討した。評価される主な成果は以下のとおりである。

1. シマアジ、クエとキジハタのハイブリッド、カンパチ、ニジマス、サケ、キンギョ、ワカサギ、キノボリウオを供試し Japanese striped knife jaw gonad (JSKG), Kelp and redspotted grouper embryo (KRE), Purplish amberjack skin (PAS), Rainbow trout embryo No. 2 (RTE-2), Sake embryo head (SEH), Epithelioma papulosum of goldfish (EPG), Wakasagi fin No. 1 (WF-1), Snake head fish heart (SHH) と名づけた8種の細胞を樹立した。

2. 細胞数の測定は、マイクロタイタープレートに培養した細胞を固定・染色後、吸光値を求め、吸光値の増加から細胞の増殖量を推定する方法が正確かつ簡便であることを明らかにし、この測定法を用いて多数の培養細胞の培養条件設定に活用した。

3. 新しく樹立した8種類の細胞と既存の代表的な17種類の魚類培養細胞の培養条件を検討し、各細胞の好適な培地、緩衝液、食塩濃度および培養温度を設定した。魚類由来細胞はいずれも炭酸緩衝液単独か Tris 緩衝液を混合した Eagle's MEM 培地で良く増殖し、至適食塩濃度は淡水魚および海産魚由来細胞とも0.116~0.171Mであること、至適発育温度がサケマス類由来細胞で15~20℃、他の温水魚由来細胞は20~30℃であり、染色体は2nのものが大部分であったが、すでに人工培養環境に適応していることを明らかにした。

4. 新しく樹立した8種類の細胞を含めた25種類の細胞について、各細胞の至適培養条件下で伝染性膀胱壊死症ウイルス (IPNV)、伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV)、ヒラメのラブドウイルス (HRV)、コイの春ウイルス病ウイルス (SVCV)、アメリカウナギのラブドウイルス (EVA)、ヨーロッパウナギのラブドウイルス (EVEX)、パイタ稚魚のラブドウイルス (PFRV)、

サケ科魚類のヘルペスウイルス (OMV と *Herpesvirus salmonis*), アメリカナマズのヘルペスウイルス (CCV), サケのレオウイルス (CSV) を供試して各細胞のウイルス感受性を観察した。サケ科魚類由来細胞の大部分は IPNV, IHNV, OMV および *H. salmonis* に感受性を有したが, HRV, SVCV, CSV には一部感受性を示さず, CCV には大部分が感受性を示さないことを明らかにし, さらに温水魚および海産魚由来細胞は供試ラドウイルスには感受性を有したが, サケ科魚類のヘルペスウイルスには感受性を示さないことを明らかにした。また新しく樹立した EPG と WF-1 は IPNV, OMV, CCV, CSV に, SHH は *H. salmonis*, CCV, CSV に感受性を示さないことを, さらに大部分のウイルスの増殖に新たに樹立した RTE-2 が優れていることを明らかにした。

5. ウイルス接種量の少ない場合にレスポンスが早くウイルス増殖量の多い細胞として IPNV では RTE-2, CHSE-214, RTG-2 が, IHNV では RTE-2, RTG-2, ASE が, HRV では EPC, RTE-2, SEH が, また OMV では RTE, KO-6, CHH-1 が, *H. salmonis* では YNK, KO-6, RTE-2 さらに CSV では SE, JSKG, SEH が優れていることを明らかにし, 特に新たに樹立した RTE-2 細胞は IPNV, IHNV, OMV の増殖に適した細胞であることを再確認した。

6. 約10年間継代培養を続けた細胞と液体窒素中に保存して継代数の少ない細胞を用い, ウイルス増殖量と染色体数のモードの変化を観察し, ウイルス増殖量は IPNV や IHNV, *H. salmonis* の場合継代数の差による相違はほとんど見られないが, RTG-2 と SE 細胞での OMV 増殖量は継代数の進んだ細胞で低下することを明らかにし, 供試した一部の細胞で明らかな染色体数の増加が観察された。

7. 継代数の増加を伴わない魚類培養細胞の凍結保存法として FBS あるいは MEM₁₀ Tris に凍結保護剤として DMSO あるいはグリセリンを10%の割合で加え, 0.3~1.0°C/min の温度勾配で-30°Cあるいは-60°Cまで下げ, その後液体窒素中に保存することにより, 3年間生存率85%以上で保存することが可能であることを明らかにした。

以上の結果は魚類病原ウイルス学の基礎確立に寄与するのみならず, 水産学に貢献するところ大であり, 審査員一同は本論文が博士(水産学)の学位論文として十分な業績と判定した。