

ヒメマスのヘルペスウイルスNeVTAの細胞病理,ウイルス粒子形態および病原性

誌名	日本水産学会誌
ISSN	00215392
著者名	羽曾部,正豪 佐野,徳夫
発行元	日本水産学会
巻/号	55巻7号
掲載ページ	p. 1197-1201
発行年月	1989年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ヒメマスのヘルペスウイルス NeVTA の細胞病理,
ウイルス粒子形態および病原性

羽曾部 正豪, 佐野 徳夫

(1989年1月30日受付)

Studies on Cytopathology, Morphology and Pathogenicity of a Nerka
Herpesvirus NeVTA

Masahide Hasobe and Tokuo Sano*

A nerka herpesvirus NeVTA (Nerka virus in Towada lake, Akita and Aomori prefecture), isolated from the kokanee salmon fry *Oncorhynchus nerka* in 1974, was examined for cytopathic effects including nucleus inclusion body and virion morphology using the negative stain method. The characteristic of NeVTA infection exhibited the Cowdry type A inclusion body in nuclei of RTG-2 cells at 24 hour after the infection. The morphology of virion purified with CsCl density gradient centrifugation showed typical and fine structures being envelopes, capsids and some of microstructures. The additional characterization of NeVTA was carried out on an experimental infection against salmonid fry for the basic evaluation of pathogenicity. The results suggested that higher susceptibility could occur in landlocked salmon species such as *O. nerka* and *O. masou*, but lower in seagoing salmon species *O. keta*, *O. gorbuscha* and trout species *S. gairdneri*. No mortality was observed in an experiment against charr *S. fontinalis*.

佐野らは十和田湖産ヒメマス稚魚に高い致死性を示す慢性流行病を調査検討し、1974年病稚魚より分離したヘルペスウイルスが、その流行病の原因ウイルスであることを確認し NeVTA (Nerka Virus in Towada Lake, Akita and Aomori Prefecture) と仮称し、報告している。¹⁾ 本ウイルスの感染症は、その後当地における卵消毒などの防疫対策の実行にともない、発病は現在確認されていない。

本研究では NeVTA 感染細胞における核内封入体、合胞体などの細胞病理及び陰性染色法によるウイルス粒子の形態を電子顕微鏡で観察し、ヘルペスウイルスにおける特徴的な知見を得た。また、サケ科魚類に対する NeVTA の致死病的病原性について 3 属 6 種の稚魚を用いて比較検討を行った。

実験方法

培養細胞と感染細胞染色標本 供試細胞は NeVTA に感受性を示すサケ科魚類由来の株化細胞、²⁾ RTG-2 (rainbow trout gonad), CHSE-214 (chinook salmon embryo), STE-137 (steelhead trout embryo), SSE-5

(sockeye salmon embryo) の各細胞を 10% の牛胎児血清を含むイーグル MEM 培地で培養して用いた。各供試細胞を直径 1 cm のカバーガラス上にそれぞれほぼ繁茂状態に培養し、ウイルスを接種し 15°C で培養後、染色標本の調製を行った。供試ウイルスは RTG-2 細胞で 1 回クローン純化の後、同細胞で 5 継代さらに CHSE-214 細胞で 1 継代したものである。ウイルス接種量は合胞体観察では m.o.i. を 0.01 TCID₅₀/細胞、核内封入体観察の場合には 1.0 とした。感染細胞は CPE 発現後、PBS (-) で洗浄、無水メタノールで 5 分間固定し、その後メイ・ギムザ染色を施した。

電子顕微鏡観察用試料の調製 CHSE-214 細胞に m.o.i.=0.05 で NeVTA を接種し、15°C で培養して 90% 以上に CPE が現れた時点 (4~5 日) で細胞残渣を含むウイルス液 (感染力価 10^{6.8} TCID₅₀/ml) を回収した。この液に 20 Kc, 50 W, 60 秒/100 ml の超音波処理を施した後、低速遠心 (2,000 rpm 10 分間) で残渣を除いた。その上清に 6% (w/v) のポリエチレングリコール-6000 と最終濃度 0.5 M の NaCl を加え、4°C で 2 時間処理した。さらに 4,000 rpm 30 分間の遠心分離を

* 東京水産大学 (Laboratory of Aquatic Pathology, Tokyo University of Fisheries, Minato-ku, Tokyo 108, Japan).

行い粗ウイルス沈渣を得た。沈渣はリン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.2) に再懸濁した後, 15,000 rpm 30 分間の遠心分離でウイルス沈渣を得, 少量の同リン酸緩衝液に再懸濁し, 濃縮ウイルス液 (感染力価 $10^{9.2}$ TCID₅₀/ml) とした。ウイルス粒子の電顕観察は, 塩化セシウム密度差平衡遠心 (45,000 rpm, 20 時間) によって精製したウイルス画分を 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で透析後, 2% リンタングステン酸で陰性染色し行った。

感染実験供試魚 供試稚魚は以下に示すサケ科 3 属 6 種の卵を当研究室において, ふ化飼育して用いた。供試魚の平均体長および体重は, ニジマス *Salmo gairdneri* Richardson (静岡県水産試験場富士養鱒場産) 26 mm 0.20 g, ドナルドソン系ニジマス *Salmo gairdneri* Donaldson (養殖研究所日光支所産) 30 mm 0.24 g, ヒメマス *Oncorhynchus nerka* (同支所産) 31 mm 0.22 g, ヤマメ *Oncorhynchus masou* (東京都水産試験場奥多摩分場産) 34 mm 0.34 g, カラフトマス *Oncorhynchus gorbusha* (水産庁北海道サケマスふ化場産) 42 mm 0.43 g, シロザケ *Oncorhynchus keta* (水産庁北海道サケマスふ化場産) 42 mm 0.43 g, カワマス *Salvelinus fontinalis* (東京都水産試験場奥多摩分場産) 41 mm 0.65 g である。

感染実験供試ウイルス RTG-2 細胞で 1 継代後 CHSE-214 細胞で 7 回継代培養し, その遠心上清を分注保存したものを供試ウイルス液とした。その感染力価は CHSE-214 細胞において $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml を示した。

ウイルス接種と飼育 稚魚に対するウイルス接種は感染力価 $10^{4.8}$ TCID₅₀/ml の飼育水 (10°C) 中に供試魚 50 尾を 90 分間浸漬して行った。接種後, 供試魚はサイフォン利用による流水式実験水槽 (1 日 4~5 回転) に収容し, 実験期間中 (30 日間) 毎日適量給餌するとともに, 瀕死魚を取り上げ, 観察記録した。実験は 1 実験区 2 水槽で行った。

結果及び考察

細胞病理とウイルス粒子形態の観察 NeVTA 感染細胞において合胞体 (多核巨細胞) の形成, それに続いて起こる細胞崩壊及び Cowdry A 型核内封入体を観察することが出来た (Fig. 1)。合胞体及び Cowdry A 型核内封入体の形成はヘルペスウイルス感染細胞における特徴的な細胞病理であることが知られている。^{3,4)} また, これらの細胞病理は, 他の魚類ヘルペスウイルス CCV,⁵⁾ *Herpesvirus salmonis*,⁶⁾ YTV,⁷⁾ OMV,⁸⁾ *H. cyprini*,⁹⁾ ならびに *H. anguillae** についても報告されている。

しかし, NeVTA による CPE の様相は供試細胞種の

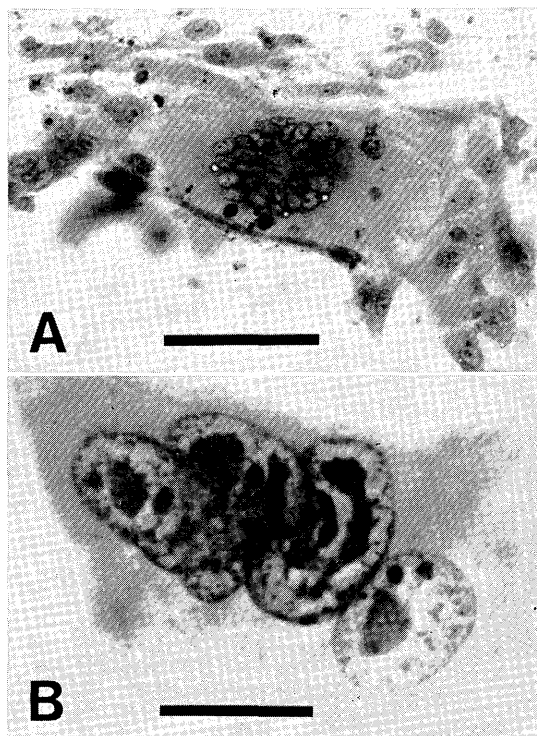


Fig. 1. Syncytium and intranuclear inclusion body (Cowdry type A) in cells infected with NeVTA. (A) A syncytium formed in RTG-2 cells infected with NeVTA (Bar=50 μ). (B) A syncytium and intranuclear inclusion body (Cowdry type A) formed in RTG-2 cells infected with NeVTA (Bar=10 μ). Cell monolayers were stained by the May-Grünwald Giemsa method.

違いにより, 顕著に異なり, 合胞体の出現頻度は RTG-2, STE-137 細胞で高く, CHSE-214, SSE-5 細胞での出現率は低かった。また, RTG-2 および STE-137 細胞では 1 合胞体中に存在する核数は 10~20 にも及び多数であったが, CHSE-214, SSE-5 の両細胞では, その核数は 4, 5 個と小数の傾向を示した。さらに, RTG-2 細胞における封入体の形状は CHSE-214 細胞におけるものより明瞭であり, かつ出現頻度も高かった (Fig. 1B)。RTG-2 細胞において核内封入体の出現は感染後 13 時間頃から始まり, 24 時間後にピークに達し, 48 時間以降には容易に観察できなかつた。なお, ヘマトキシリン-エオシン染色の場合, 核内封入体の観察は困難であった。

塩化セシウム密度差平衡遠心分離で精製後, 感染性を示す画分は比重 1.24~1.27 g/cm³ に相当し, Fig. 2A に

* T. Sano, M. Sano, and H. Fukuda: In "Abstracts, Third International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture", Ed. by F. O. Perkins, Virginia, USA, 11-12 (1988).

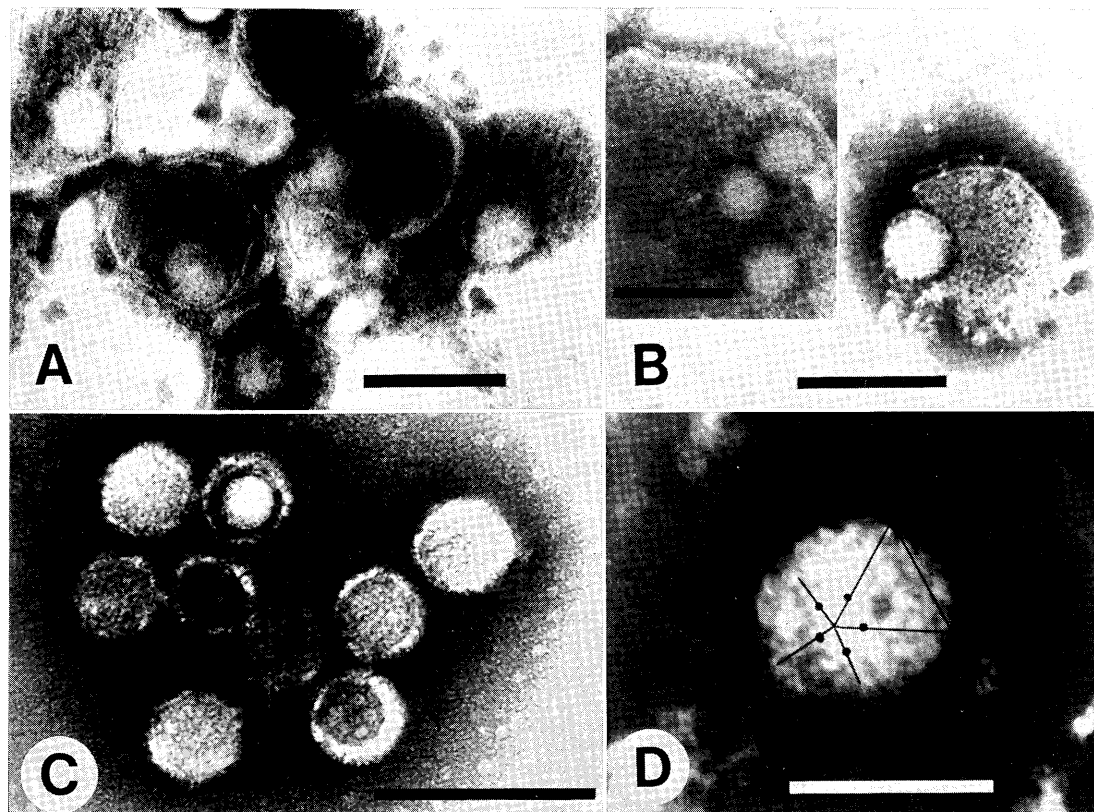


Fig. 2. Electron micrograph of NeVTA virion purified with CsCl density gradient centrifugation. (A) Intact virions having infectivity after purification (Bar=300 nm). (B) Spike-like projections are observed on the surface of the envelope (Bar=200 nm). (C) Naked capsid (Bar=200 nm). (D) Naked capsid showing a part of icosahedron (Bar=100 nm).

示すように帯状のエンベロープに包まれたカプシッドとその間の電子密度の低い物質 (tegumentum) から成る完全なヘルペスウイルス粒子形態を観察することができた。一方、比重約 1.4 g/cm^3 の画分には Fig. 2 C, D に示すようなエンベロープのないカプシッド粒子が観察された。そのカプシッド構造は1辺5個のキャプソメアから成る正20面体を示した (Fig. 2D)。また、エンベロープ表面にはスパイク様突起も確認された (Fig. 2B)。ウイルス粒子の大きさと各構成単位をカタラーゼクリスタル (応研商事) を基準準として計測した場合、エンベロープを有するウイルス粒子 (Fig. 2A) の直径は $252 \pm 36 \text{ nm}$ (66 粒子測定)、カプシッドの直径は $103 \pm 6 \text{ nm}$ (115 粒子測定)、またスパイクの長さは約 17 nm 、エンベロープの幅は約 20 nm であった。通常、陰性染色法によるウイルス粒子の測定値は超薄切片法の値よりも幾分か大きく測定されるが、本結果も同様に既報の NeVTA 粒子サイズ¹⁾ (エンベロープ粒子 230 nm 、カプシッド粒子 80 nm) よりも多少大きな値を示した。上記の NeVTA 粒子サイズは既報¹⁰⁾ のサケ科魚類由来ヘルペスウイルス、*H. salmonis*, Steelhead herpesvirus, OMV, YTV のウイルス

粒子サイズ (カプシッド $80 \sim 115 \text{ nm}$ 、エンベロープ粒子 $200 \sim 250 \text{ nm}$) とほぼ同等であることが再確認された。

15°C 飼育魚における病原性 各実験感染区における供試魚の斃死状況を Table 1 に示す。イワナ属カワマス以外の魚種において斃死が認められ、NeVTA の病原性が致死性のものであることが確認された。感染実験区における斃死は、いずれの魚種においても8日目以降に生じ、それ以前では観察されなかった。30日間の累積斃死率が高い値を示した魚種は、陸封型のサケ属魚種ヒメマスとヤマメで、斃死状況はほぼ直線的に上昇し、それぞれ80%と60%の斃死率を示した。降海型サケ属シロザケ、カラフトマス及びマス属ニジマスでは10~30%であった。接種時のウイルス力価は $10^{4.8} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ と比較的高い値であったが、斃死率の低かったシロザケ、カラフトマス及びニジマスでは斃死が接種後ほぼ20日以内で終息した。上記の結果を既報の結果と比較すると、NeVTA がカワマスに対し病原性を示さない特性は *H. salmonis*⁶⁾ と類似しており、ヒメマスとヤマメに強い病原性を示すことでは OMV^{8,11)} と類似している。

飼育水温の影響 飼育水温と NeVTA 接種ヒメマス稚

Table 1. Pathogenicity of NeVTA on salmonid fry at 15°C*1

Experimental fish	Test group	Cumulative mortality (%)		
		10 days	20 days	30 days
<i>Oncorhynchus nerka</i>	I	6 (11)* ²	30 (32)	88 (80)
	II	16	34	72
<i>Oncorhynchus masou</i>	I	2 (1)	58 (50)	62 (60)
	II	0	42	58
<i>Oncorhynchus keta</i>	I	0 (0)	8 (9)	12 (11)
	II	0	10	10
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	I	8 (12)	30 (26)	30 (26)
	II	16	22	22
<i>Salmo gairdneri</i> (Richardson)	I	12 (11)	14 (14)	20 (21)
	II	10	14	22
<i>Salmo gairdneri</i> (Donaldson)	I	4 (6)	6 (12)	6 (12)
	II	8	18	18
<i>Salvelinus fontinalis</i>	I	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	II	0	0	0

*1 Less than 5% of mortality was observed in all control groups without virus infection (data not shown).

*2 Figures in parentheses indicate the average(%) of test groups I and II.

Table 2. Effects of water temperature on the mortality of kokanee salmon (*Oncorhynchus nerka*) fry infected with NeVTA*1

Temp. (°C)	Test group	Cumulative mortality (%)					
		5 days	10 days	15 days	20 days	25 days	30 days
5°C	I	0	0	0	0	4 (5)* ²	24 (15)
	II	0	0	0	0	6	16
10°C	I	0	0 (1)	30 (24)	36 (30)	42 (34)	42 (41)
	II	0	2	18	24	26	40
15°C	I	0	6 (11)	16 (18)	30 (32)	66 (62)	88 (80)
	II	0	16	20	34	58	72
20°C	I	0	0	0	0	0	6
	II	0	0	0	0	0	0

*1 Less than 5% of mortality was observed in all control groups without virus infection.

*2 Figures in parentheses indicate the average(%) of test groups I and II.

魚の斃死率との関係を Table 2 に示す。5°C, 10°C, 15°C 飼育における 30 日間の累積斃死率は水温の上昇とともに増加し, 5°C で 15%, 10°C で 41%, 及び 15°C で 80% であったが, 20°C では斃死が認められなかった。また, 斃死開始時期は飼育水温の上昇とともに早くなることから, NeVTA 感染後の発症, 斃死は温度に依存し, 潜伏期間を含む斃死開始までの期間は 5°C で 25 日以上, 10°C で 10 日以上, 15°C で 8 日以上であった。各水温での斃死魚について, 各 5 検体の魚体内ウイルス力価を測定した結果, 5°C 飼育で接種後 25~29 日に斃死した個体で $10^{4.0} \sim 10^{5.3}$ TCID₅₀/g, 10°C 飼育で 10~14 日後の斃死魚で $10^{6.8} \sim 10^{6.3}$ TCID₅₀/g, 15°C 飼育で 8~12 日後の斃死魚では $10^{4.5} \sim 10^{5.5}$ TCID₅₀/g であった。20°C 飼育において, 斃死及び異常行動が観察され

なかったことは興味深い。本ウイルスの安定性を MEM 中, 20°C で調べた結果, 48 時間で 99% 失活したこと,* また, CHSE-214 細胞に NeVTA を感染させても, 20°C では CPE の発現が観察されないことから, 飼育水温 20°C では NeVTA は不活化されてヒメマス稚魚に感染しないか, しても軽度の感染にとどまり, 感染魚は発症, 斃死に至らないと推定される。また, 20°C 感染魚における摂餌行動には 10°C, 15°C 飼育対照魚と同様に, 異常が認められなかった。

謝 辞

本研究では, 感染実験供試魚を静岡県水産試験場富士養鱒場, 養殖研究所日光支所, 東京都水産試験場奥多摩分場ならびに水産庁北海道サケマスふ化場より分与して

いただいた。関係各位に記して感謝の意を表します。

引用文献

- 1) T. Sano: *Fish Pathol.*, **10**, 221-226 (1976).
- 2) K. Wolf and J. A. Mann: *In Vitro*, **16**, 168-179 (1980).
- 3) F. Fenner, B. R. McAuslan, C. A. Mims, J. Sambrook, and D. O. White: *The Biology of Animal Viruses*, Second Edition, Academic Press, New York and London, 1974, pp. 338-392.
- 4) K. Wolf: *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*, Cornell University Press, Ithaca, 1988, pp. 19-249.
- 5) K. Wolf and R. W. Darlington: *J. Virol.*, **8**, 525-533 (1971).
- 6) K. Wolf, R. W. Darlington, W. G. Taylor, M. C. Quimby, and T. Nagabayashi: *J. Virol.*, **27**, 659-666 (1978).
- 7) T. Sano, H. Fukuda, N. Okamoto, and F. Kaneko: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **49**, 1159-1163 (1983).
- 8) T. Kimura, M. Yoshimizu, M. Tanaka, and H. Sannohe: *Fish Pathol.*, **15**, 143-147 (1981).
- 9) T. Sano, H. Fukuda, and M. Furukawa: *Fish Pathol.*, **20**, 381-388 (1985).
- 10) R. P. Hedrick, T. McDowell, W. D. Eaton, T. Kimura, and T. Sano: *J. Appl. Ichthyol.*, **3**, 87-92 (1987).
- 11) T. Kimura, M. Yoshimizu, and M. Tanaka: *Fish Pathol.*, **17**, 251-258 (1983).