

合胞体形成を伴った壊死を主病徴とするマコガレイ仔稚魚の  
ウイルス学的検討：CHSE-214細胞に発現した細胞変性効果と  
その電子顕微鏡観察

一色 正・長野泰三

Virological examinations of larval and juvenile marbled sole *Pleuronectes yokohamae* showing  
necrosis accompanied by syncytial formation : cytopathic effect on CHSE-214 cells and its  
electron microscopy

Tadashi ISSHIKI and Taizou NAGANO

# 合胞体形成を伴った壊死を主病徴とするマコガレイ仔稚魚のウイルス学的検討：CHSE-214細胞に発現した細胞変性効果とその電子顕微鏡観察

一色 正\*・長野泰三

Virological examinations of larval and juvenile marbled sole *Pleuronectes yokohamae* showing necrosis accompanied by syncytial formation : cytopathic effect on CHSE-214 cells and its electron microscopy

Tadashi ISSHIKI\* and Taizou NAGANO

To establish the etiology of a putative viral infection in larval and juvenile marbled sole *Pleuronectes yokohamae*, authors attempted virological examinations of the diseased fish showing the pathognomonic sign such as necrosis accompanied by the syncytial formation. The inoculation of the tissue filtrate from the diseased fish collected in 1997 produced a cytopathic effect (CPE) consisting of plaque-like syncytia on CHSE-214 cells, while the subculture resulted in failure. Electron microscopy of the cells developing CPE revealed formation of cytoplasmic inclusion bodies containing of nascent reovirus-like particles or their component-like materials, suggesting that the virus examination with CHSE-214 cells may be a potential diagnosis of the putative viral infection in marbled sole.

キーワード：マコガレイ, *Pleuronectes yokohamae*, ウイルス検査, 細胞変性効果, 電子顕微鏡観察, 合胞体形成, レオウイルス

1989～2001年にかけて、香川県下の種苗生産場のマコガレイ *Pleuronectes yokohamae* 仔稚魚に、眼球突出や腹部膨満を示す疾病がしばしば発生して問題となっていた<sup>1)</sup>。Isshiki *et al.*<sup>1)</sup> は病魚を病理組織学的に検討し、最も特徴的な病変は肝臓、尿細管上皮、膵臓および腸管上皮における合胞体形成を伴った壊死であること、および壊死した肝細胞の電子顕微鏡観察において、結晶状に配列したウイルス様粒子を含む細胞質内封入体の形成が確認されることから、本疾病の発生にはウイルスの感染が関わっているのではないかと推察している。しかし、原因ウイルスの分離や病魚の磨碎濾過液を用いた再現実験には成功しておらず、その原因については未だ明らかにされていない。

著者らは1997年に採取し、凍結保存していた病魚を用いてウイルス学的検討を行ったところ、CHSE-214細胞において合胞体形成を特徴とする細胞変性効果(CPE)の発現を確認するとともに、CPEの発現した培養細胞の電子顕微鏡観察を行ったので報告する。

## 材料および方法

### 供試材料

1997年2月に香川県下の種苗生産場で採取し、 $-60^{\circ}\text{C}$ で凍結保存していたマコガレイ病仔稚魚(43～48日令、平均全長20mm)のうち、飼育水槽の異なる2つの飼育群由来の個体を用いた。なお、供試材料を採取した飼育群は病理組織学的検査により、本疾病の発生が確認されているものである。また、対照として、本疾病の発生が認められなかった1999年に前記と同一の種苗生産場で採取し、凍結保存していた健康なマコガレイ仔稚魚を供試した。

### ウイルス分離

株化細胞には、ウシ胎児血清を10%添加したイーグルMEM培地(日水)を用いて培養したCHSE-214細胞<sup>2)</sup>を供試した。ウイルス分離では、病魚から摘出した腹部と頭部の混合物に9倍量のHanks' BSS(日水)を加えて磨碎し、遠心分離(1770×g, 15分,  $4^{\circ}\text{C}$ )を行った。得られた上清をさらにHanks' BSSで5倍に希釈後、

\* 現 三重大学大学院生物資源学研究所

穴径0.45 $\mu$ mフィルター (MILLIPORE) で濾過した濾液を、あらかじめ培養面積25cm<sup>2</sup>の培養フラスコ (Falcon) に培養しておいたCHSE-214細胞単層に100 $\mu$ L接種し、15°Cで30日間培養してCPEの発現の有無を観察した。CPEが発現した培養フラスコは-80°Cで凍結融解後、培養液を回収して遠心分離 (1770 $\times$ g, 15分, 4°C) し、得られた上清の100 $\mu$ LをCHSE-214細胞単層に接種して初代培養時と同様な条件で継代培養を行い、CPEが発現するのかどうかを確認した。なお、対照用の健常魚についても同様な処理を行った。

### 電子顕微鏡観察

接種6日後、15日後および30日後にCPEの発現している培養フラスコを電子顕微鏡観察に供試した。観察用試料を作製するため、培養細胞をセルスクレーパー (Nunc) を用いて剥離し、その細胞浮遊液を遠心分離 (200 $\times$ g, 10分, 4°C) した。得られた細胞は2.5%グルタルアルデヒド・2%パラホルムアルデヒド混液 (pH7.3) で前固定後、2%四酸化オスミウムで後固定し、常法に従ってエポキシ樹脂 (Epon812) に包埋した。包埋後、超薄切片を作製して酢酸ウランとクエン酸鉛による二重染色を施したのち、透過型電子顕微鏡 (JEM1010, 日本電子) を用いて加速電圧80kVで観察した。なお、健常魚の磨砕濾過液を接種した培養細胞についても同様な処理を行った。

## 結 果

### ウイルス分離

病魚の磨砕濾過液を接種して培養したCHSE-214細胞では、接種6日後に培養単層の局所において、細胞の融合に基づく多核・斑状の合胞体の形成を特徴とするCPEが発現した (Fig. 1A)。発現初期には小型斑状であった合胞体は接種6日後~14日後にかけてだいに大きくなったが、14日後以降にはその発達が停止し、30日後の観察期間終了時においても大型化した合胞体が残存するものの、細胞の崩壊あるいは剥離には至らなかった。接種6日後、15日後および30日後の培養細胞を継代培養した結果、いずれにおいてもCPEは再現されなかった。なお、健常魚の磨砕濾過液を接種して培養したCHSE-214細胞においてはCPEの発現は確認されなかった。

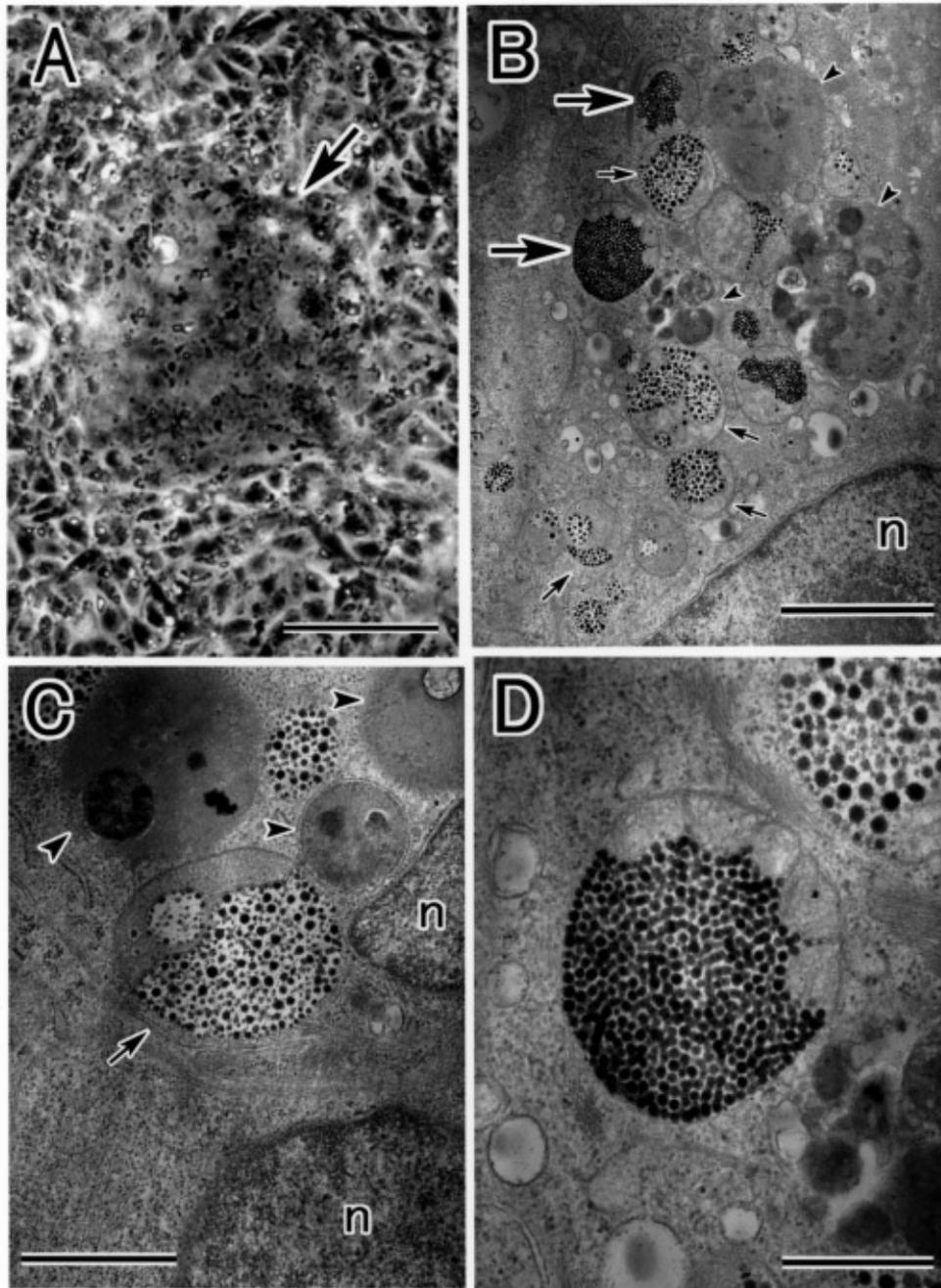
### 電子顕微鏡観察

CPEの発現した培養細胞に共通して認められた電子顕微鏡学的所見は、細胞質における形態の異なった複数の封入体の形成であった (Fig. 1B)。このうち、初期段階にあると推定される封入体は電子密度の高い小

体として確認され、微少顆粒から構成されており、内部に繊維状あるいは膜状の構造物を含んでいた。発達過程にあると推定される封入体はその周囲を細い限界膜で囲まれ、内部に含まれている繊維状あるいは膜状の構造物の一部が消失し、そこに形成された空胞内では様々な大きさの電子密度の高い粒子や断片が出現していた (Fig. 1C)。発達の進んだ状態にあると推定される封入体は内部の繊維状あるいは膜状の構造物がほとんど消失し、直径約52nmのほぼ均一な粒子によって満たされていた。それらの粒子の多くは電子密度の高いコアを持ち、その周囲はコアよりもやや電子密度の低い一重の薄層によって被われていた (Fig. 1D)。なお、Isshiki *et al.*<sup>1)</sup> が病魚の肝細胞の電子顕微鏡観察において確認している、断面が六角形で二層のカプシドに包まれたレオウイルススピリオン様粒子 (最大径75~80nm) に一致する構造物は観察されなかった。一方、健常魚の磨砕濾過液を接種した培養細胞では特筆すべき所見は観察されなかった。

## 考 察

本疾病の特徴的な病理組織学的変化は合胞体形成を伴った壊死であり、壊死病変部の電子顕微鏡観察により、細胞質内封入体におけるレオウイルス様の粒子形成過程および結晶状に配列したレオウイルススピリオン様粒子が確認されることから、本疾病の発生にはこのウイルスの感染が関わっているのではないかとされている<sup>1)</sup>。また、アクアレオウイルス属に分類されるウイルスは、感受性を示す魚類由来株化細胞において斑状の合胞体形成を伴った定型的CPEを形成することが知られている<sup>3)</sup>。今回の研究において、CHSE-214細胞に発現したCPEの形態も合胞体形成を特徴としていた。CPEを発現した培養細胞を電子顕微鏡観察したところ、病魚組織内と同様に細胞質内封入体の形成が確認されたが、病魚組織内で見られたレオウイルススピリオン様粒子の存在を確認することはできなかった。しかし、封入体内では未成熟なレオウイルス粒子およびその前駆体<sup>4)</sup> に形態学的特徴が酷似する小型で電子密度の高い粒子および断片が出現しており、同様な所見は病魚組織内の封入体におけるレオウイルス様の粒子形成過程でも観察されている<sup>1)</sup>。ターボットアクアレオウイルスが感染したCHSE-214細胞を電子顕微鏡観察した研究においても、viroplasmと呼ばれる封入体内で未成熟な小型のウイルス粒子が形成されることが報告されている<sup>5)</sup>。一方、今回の研究で確認されたCPEは継代することができなかったが、CPEの発現した培養細胞では上記のような電子顕微鏡学的所見が得られていること、レオウイルスの定型的CPEであるこ



**Fig. 1.** (A) Cytopathic effect (CPE) in CHSE-214 cells inoculated with the tissue filtrate of diseased fish. Note the formation of a plaque-like syncytium (allow). Scale bar = 100  $\mu$ m. (B) Electron micrograph of CHSE-214 cells developing the CPE. There are some inclusion bodies in cytoplasm. The primary inclusion bodies (allow heads) are observed as electron dense bodies and consist of fine granules and fibril or membranous structures. The developing inclusion bodies (small allows) were delimited by a thin membrane and have partial disappearances of fibril or membranous structures as well as formations of vacuoles in which electron dense particles of various sizes appear. The well-developed inclusion bodies (large allows) mostly lose their fibril or membranous structures and are occupied by great numbers of particles with high electron density. Scale bar = 3  $\mu$ m. (C) A high power view of primary inclusion bodies (allow heads) and a developing inclusion body (arrow). The fine granules, fibril or membranous structures, and electron-dense particles of various sizes in vacuoles are evident. Scale bar = 1  $\mu$ m. (D) A high power view of a well-developed inclusion body. The completely-filled particles within the inclusion body frequently have an electron-dense core surrounded by a single layer and a similar size of approximately 52 nm in diameter. Scale bar = 600 nm. n: nucleus.

と、および健常魚の磨砕濾過液を接種して培養した細胞においてはCPEの発現は確認されなかったことから、病魚組織由来の細胞毒性によるものではないと判断するのが妥当であると思われる。これらのことから、CHSE-214細胞は本疾病の発生に関わっていると推測されているウイルスに対して感受性があり、本ウイルスが複製する過程でCPEを発現した可能性があると思われる。なお、CPEが継代できなかつた理由については、CHSE-214細胞では感染性のウイルスピリオンが形成されなかつたためではないかと推察される。

著者らは過去にCHSE-214細胞を含む6種類の魚類由来株化細胞を用いて、1989, 1990, 1991, 1997および2001年に採取し、凍結保存していた病魚からウイルス分離を試みたが、いずれの培養細胞においてもCPEの発現を認めることはできなかつたことを報告しており<sup>1)</sup>、今回の研究とは異なつた結果を得ている。この理由として、今回の研究では前報<sup>1)</sup>とは異なるロットの病死魚を用いていることから、CPEを発現させたウイルスの感染性は変化し易い性質があり、前報<sup>1)</sup>においてウイルス分離に供試した病魚試料中の本ウイルスの感染性は凍結保存期間中に失われていた可能性が考えられる。凍結保存していない新鮮な病魚試料を用いてウイルス分離を試み、同様なCPEが確実に発現するのかどうかを検討する必要があると思われる。

異体類におけるレオウイルス感染症あるいはレオウイルス様ウイルスの関与が疑われる疾病は、カナダおよびスコットランドのアトランティックハリバット *Hippoglossus hippoglossus*<sup>6,7)</sup>、および米国のサマーフラウンダー *Paralichthys dentatus*<sup>8)</sup> など発生していることが知られている。近年では、我が国の複数県の種苗生産場においても本疾病と同様な合胞体形成を伴つた壊死を呈する疾病がマコガレイやヒラメ *P. olivaceus* などの異体類に発生して問題となっているが、現在のところ、病理組織学的検査が本疾病の唯一の診断法となっている。今後、本疾病の疑いが持たれた病魚の診断に際しては、CHSE-214細胞によるウイルス検査を併用して実施し、診断法としての有用性を検証する必要がある。

## 文 献

- 1) Isshiki T, Nagano T, Abe M, Miyazaki T: 2003, Histopathological changes probably associated with a virus in larval and juvenile marbled sole *Pleuronectes yokohamae*. *Fish Pathol.*, **38**, 143-149.
- 2) Lannan, C. N., J. R. Winton, J. L. Fryer: 1984, Fish cell lines: Establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro*, **20**, 671-676.
- 3) Lupiani, B., K. Subramanian, S. K. Samal: 1995, Aquareoviruses. *Annu. Rev. Fish Dis.*, **5**, 175-208.
- 4) Mertens, P. P. C., R. Duncan, H. Attoui, T. S. Dermody: 2005, Family *Reoviridae*. In "Virus taxonomy. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses" (ed. by Fauquet C M *et al.*). Elsevier Academic Press, Oxford, pp. 447-454.
- 5) Rivas, C., M. Noya, C. Cepeda, I. Bandín, J. L. Barja, C. P. Dopazo: 1998, Replication and morphogenesis of the turbot aquareovirus (TRV) in cell culture. *Aquaculture*, **160**, 47-62.
- 6) Cusack, R. R., D. B. Groman, A-M. MacKinnon, F. S. B. Kibenge, D. Wadowska, N. Brown: 2001, Pathology associated with an aquareovirus in captive juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and an experimental treatment strategy for a concurrent bacterial infection. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 7-16.
- 7) Ferguson, H. W., S. D. Millar, F. S. B. Kibenge: 2003, Reovirus-like hepatitis in farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Vet. Rec.*, **153**, 86-87.
- 8) Wada S, Kurata O, Hatai K, E. J. Noga, M. J. Dykstra, J. S. Burke: 2009, Reovirus-like infection of cultured summer flounder *Paralichthys dentatus*. *Fish Pathol.*, **44**, 151-153.

## 要 旨

1989～2001年に香川県下の種苗生産場のマコガレイ仔稚魚に合胞体形成を伴つた壊死を主徴とする原因不明の疾病がしばしば発生していた。1997年の凍結保存病魚をウイルス学的に検討した結果、組織の磨砕濾過液を接種したCHSE-214細胞に合胞体形成を特徴とする細胞変性効果が発現した。培養細胞の電顕観察では、未成熟なレオウイルス様粒子およびその前駆体様構造物を含む細胞質内封入体の形成が確認された。