

令和元年6月25日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19285

研究課題名(和文)細胞融合による新たなウイルス感受性細胞の作出

研究課題名(英文) Study for establishment of new virus-susceptible fish cell cultures using cell-to-cell fusion techniques

研究代表者

佐野 元彦 (SANO, MOTOHIKO)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：00372053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ポリエチレングリコール(PEG)による魚類の細胞融合法を検討した。融合細胞だけを選択できるように、核酸合成酵素の欠損を誘導するため、ウナギ由来E0細胞を5-bromodeoxyuridineに、また、マスノスケ胚細胞であるCHSE-214を8-azaguaninに耐性化させた。これらの細胞は、選択培地中で死滅せず、融合細胞だけの選別が困難であった。ほ乳類とは異なる魚類培養細胞独自の耐性機構が存在する可能性が示唆された。E0-2細胞での細胞融合条件では、PEG処理25、1分間と推測された。このように、薬剤選別がうまく機能するようになれば、細胞融合により魚類の新たな細胞株は作出可能と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PEGによる魚類の細胞融合自体は可能であることがはじめて分かったが、融合細胞の選択培養はできなかった。選択培養のため、核酸合成阻害剤である5-bromodeoxyuridine (BUdR)あるいは8-azaguanin(8-AZ)への魚類培養細胞の薬剤耐性化を進めたが、アミノプテリンを含む選択培地で細胞が死滅することはなく、ほ乳類の培養細胞とは異なり、魚類培養細胞独自の耐性メカニズムが存在する可能性が示された。薬剤選別がうまく機能するようになれば、細胞融合により魚類の新たな細胞株は作出可能と考えられ、魚類ウイルス培養に新たな道を拓くものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Cell fusion protocol using polyethylene glycol (PEG) was studied for fish cells. For selective culture of the fusion cells, eel ovary cell line E0-2 and Chinook salmon embryo cell line CHSE-214 were tolerized to nucleotide synthesis inhibitor 5-bromodeoxyuridine and 8-azaguanin respectively to induce nucleic acid synthesis enzyme deficiency. Since there two tolerized cell lines were not killed by an inhibitory medium, selective culture of the fused cells cannot be conducted. The mechanism of the tolerance to the drugs in fish cells may different from those in mammalian cell lines. Fusion protocol using E0-2 cells might be of PEG treatment at 25 for 1 min. The results suggest that new cell line can be developed using PEG cell fusion method as long as selective culture works well on fused cells.

研究分野：水族病理学

キーワード：細胞融合 魚類細胞 ウイルス培養 組織・細胞 魚病

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

被害の大きな魚介類のウイルス病の中に、いまだ病原ウイルスが分離・培養ができず、従ってワクチン開発に目処が付かない疾病が多く残されている。ウイルスが培養できないことが性状・病原性解明やワクチン開発に大きな障害となっており、このブレイクスルーが是非とも必要なこととなっている。魚体組織片からウイルス感受性細胞を作出しようとする、線維芽細胞が大半を占める場合が多く、分化した上皮細胞などの培養細胞系の樹立は難しい。

ほ乳類ではミエローマ細胞とBリンパ球を細胞融合させ、ハイブリドーマとしてモノクローナル抗体を作出する技術は、確立・普及されており、以前からこの細胞融合技術を体細胞間融合による機能解明やES細胞などの多能性回復のために応用することが行われてきている。また、ほ乳類のウイルス研究では、細胞の感染ファクター解明の一環として、細胞融合による細胞のウイルス感受性変化などについて報告例がある。

魚介類での細胞融合の応用として、マウスなどの細胞に魚類細胞を融合させ、遺伝的な変化を検討するラジエーションハイブリッドが知られているが、魚介類自体の細胞融合は検討されておらず、ウイルス感受性に着目した研究はない。

そこで、いまだ分離・培養ができないウイルスの培養を可能とし、ワクチン開発に道を拓くため、細胞融合を活用して新たなウイルス感受性細胞を作出しようという着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究は、培養が困難な魚介類ウイルスの分離・培養に使用できる細胞を細胞融合によって作出することを目的とし、魚類培養細胞を用いた融合条件の検討と培養ができない1つのウイルス(アユの異型細胞性鰓病ウイルス)を例としてその培養が可能となるか検討する。

### 3. 研究の方法

本研究は、今まで全く行われてこなかった魚介類細胞の細胞融合を用いて、培養が困難な魚介類ウイルスの分離・培養に使用できる細胞を作出することを目的とし、魚類培養細胞を用いた融合条件の検討および培養ができない1つのウイルスを例としてその培養が実際に可能となるか検討する。まず、融合した細胞だけを選択できるように、5-bromodeoxyuridine (BUdR)に耐性化させたウナギ由来E0細胞をすでに準備しており、これらの培養細胞と同種の魚から分離した鰓上皮細胞、白血球や血管内皮の細胞など、また、冷水性魚・温水性魚など異種の魚類細胞とのポリエチレングリコールによる細胞融合を行い、ポリエチレングリコール濃度・処理時間と処理温度について最適条件を決定する。また、作出した融合細胞のウイルス感受性スペクトラム、培養可能温度の変化などを調べ、本手法が魚介類ウイルスの研究に有用か評価する。さらに、養殖アユで大きな被害を出す異型細胞性鰓病、通称“ボケ病”で知られるウイルス疾病を一例として検討を行う。アユの鰓に感染する原因ポックスウイルスは、いまだ分離・培養ができておらず、養殖団体や県から強い要望のあるワクチン開発には道筋が見えていない。まず、アユの鱗由来AYF157-2細胞のBUdRあるいは8-azaguaninの耐性化を行い、薬剤マーカーを導入して融合細胞を選択できるように準備する。次で、この薬剤耐性化アユ培養細胞とアユ鰓の細胞との細胞融合を行い、融合細胞を薬剤耐性により選択し、拡大培養後、ポックスウイルスに感受性があるかを評価する。並行して、ポックスウイルスが感染し肥大化した鰓細胞を病魚より分離し、このウイルス感染細胞と薬剤耐性化アユ培養細胞と細胞融合させることにより持続的にウイルスを産生する細胞の樹立を検討する。

### 4. 研究成果

#### 1) 細胞融合のための支持細胞の作出

細胞融合によるハイブリドーマ細胞の作出のためには、融合細胞だけが生残して選択できる必要があることから、まず支持細胞としてのミエローマ細胞の核酸合成酵素の欠損を誘導する必要がある。そのため、5-bromodeoxyuridine (BUdR)あるいは8-azaguanin(8-AZ)への耐性化を行い、酵素欠損を誘導する。そこで、魚類の細胞から温水性魚類としてウナギ由来E0細胞及びアユ鱗由来AYF157-2細胞をそれぞれBUdRおよび8-AZへの耐性化を、また、冷水性魚類としてマスノスケ胚細胞であるCHSE-214細胞を8-AZへの耐性化を行った。培養液中の各薬剤濃度を継代時に徐々に増加させていき、E0-2ではBUdR 500 $\mu$ g/mL、CHSE-214細胞では8-AZ 10 $\mu$ g/mLまで耐性化を進めることができた。AYF157-2細胞では8-AZ 0.25 $\mu$ g/mLまでしか濃度が上がらず、耐性にはできなかった。耐性化したE0-2細胞とCHSE-214細胞を選択用のアミノプテリンの入ったHAT培地で培養すると両細胞ともに増殖の阻害が若干かかる程度で死滅することはなかった。今後、これらの細胞の高度な薬剤耐性化を進め、選択培地による選択が可能か、引き続き試験する。

耐性化した細胞に酵素欠損が誘導されていないと考えられることから、魚類の細胞では異なるメカニズムで耐性が起こっている可能性が考えられた。そこで、元々の樹立培養細胞系のBUdRと8-AZへの感受性を調べた。その結果、魚類培養細胞はBUdRあるいは8-AZのどちらかに元来感受性が低いものが多く、特にBUdRへの感受性が低いものが多くみられた。このことから、耐性化は8-AZを用いた方が良いことが判明した。しかし、元々の細胞株の感受性が低いことから、ほ乳類の培養細胞でみられる核酸のモノリン酸化酵素の阻害ではない可能性が考えられる。魚類培養細胞の核酸合成経路がほ乳類と異なるとすれば、重要な発見と思われ、今後、

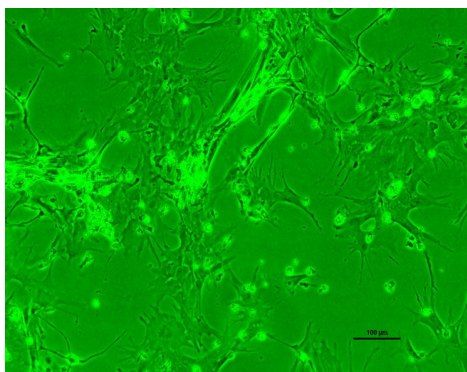
融合細胞の選択のためにもその耐性化メカニズムも明らかにする必要がある。最終的に薬剤選別がうまく機能するようになれば、細胞融合により魚類の新たな細胞株は作出可能と考えられ、魚類ウイルス培養に新たな道を拓くものと期待される。

培養細胞株	半数増殖阻止濃度(μg/mL)	
	8-Azaguanine	BUdR
EO-2	0.56	3.11
BUdR耐性化EO-2	2.95	100
CCB	0.48	0.81
CHSE-214	3.13	100
RTG-2	1.49	14.15
BF-2	3.37	65.04
RyuF-2	2.91	2.17

EO-2: ウナギ卵巣由来細胞株、CCB: コイ脳由来細胞株、CHSE-214: マスノスケ胚由来細胞株、RTG-2: ニジマス卵巣由来細胞株、BF-2: ブルーギル稚魚由来細胞株、RyuF-2: キンギョ鰭由来細胞株

## 2) 細胞融合条件の検討

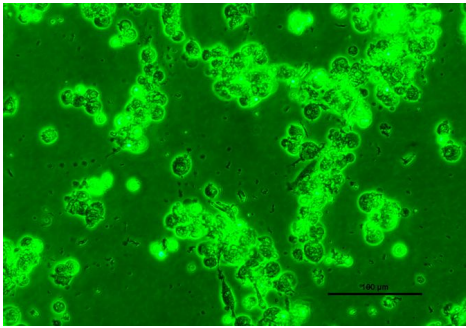
HAT 培地による選択が有効に作用しないため、ポリエチレングリコールによる融合後の細胞の顕微鏡観察および細胞数のカウントから、融合条件を検討した。支持細胞には EO-2 細胞を、融合させる細胞にはウナギの腎臓から分離した白血球を用いた。通常のマウスのハイブリドーマの作製プロトコルに従い、分子量 1500 の細胞融合用の 50% PEG 液 (Roch) を用いて、融合処理の温度を 25、30、33 とし、融合時間を 1 分間、2 分間、3 分間とした。その結果、温度では特に差がなく、融合時間は長いほど若干の毒性がみられた。このことから融合温度は 25、時間は 1 分間で十分であると推測された。



EO-2 細胞とウナギ腎臓白血球を PEG1500 で融合させ HAT 培地中で培養した細胞

## 3) ウイルスと細胞の融合によるアユ異型細胞性鰓病原ウイルスの分離・培養

養殖アユで大きな被害を出す異型細胞性鰓病、通称“ボケ病”は、*Plecoglossus altivelis* poxvirus (PaPV) が原因と考えられているが、いまだウイルスの分離・培養には成功していない。期間中、生きた病魚を入手することができなかつたため、病鰓の異型肥大細胞と支持細胞の細胞融合は実施できなかった。そこで、ウイルスを PEG により細胞に取り込ませる実験を行った。病魚の鰓を磨砕して細胞残渣を除き、さらに高速遠心分離によって得られたウイルスを含むペレットを再懸濁させてウイルス液を調整した。このウイルス液とアユ鰓由来細胞 AYF157-2 細胞を PEG1500 によりウイルス粒子を細胞に取り込ませる実験を行ったところ、強い細胞毒性が出現し、ウイルスの増殖は認められなかった。AYF157-2 細胞が PEG に感受性が高く、処理時間を短くすることに加え、融合させるウイルスを精製することで毒性を軽減できる可能性があり、さらに検討を行う。



異型細胞性鯨病アユの鰓から調整した  
ウイルス液とアユ由来 AYF157-2 細胞を  
PEG1500 で融合させ培養した細胞

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。