

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22325

研究課題名(和文)二枚貝の重要病原体カキヘルペスウイルスの分離培養技術開発とその応用

研究課題名(英文) Development and application of in vitro culture of OsHV-1, an important viral pathogen for oyster culture

研究代表者

伊藤 直樹 (Itoh, Naoki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：30502736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：In vitro条件で初代培養したマガキの細胞および組織に、マガキの重要病原体であるカキヘルペスウイルス(OsHV-1)を加え、ウイルスを人為的に増やす技術の開発を目指した。血球を加えた実験区内では、対照区と比べて有意なウイルス量の増加は見られなかった。そこで、初代培養した鰓、心臓、外套膜の組織片にOsHV-1液を加えて増殖を試みたところ、鰓組織片内におけるウイルス量は、培養上清中のウイルス量より増加する傾向が見られ、OsHV-1が鰓組織内の細胞に感染したと考えられた。組織片を用いることでOsHV-1をin vitro条件で増殖させる可能性が新たに開かれ、今後は手法の改良が望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初はマガキの血球を用いマガキの病原ウイルスであるOsHV-1を安定的に増殖させることを目指したが、達成には至らなかった。一方、血球に代えて培養鰓組織片を用いると、OsHV-1をin vitroで人為的に増殖させることができる可能性が初めて見出された。鰓組織は採取が容易かつ多量に取得可能であるため、今後、手法を改良することで、OsHV-1研究の進展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was to establish a proliferation system of OsHV-1, an significantly important viral pathogen for oyster culture, using in vitro cultured oyster cells and organs. Amount of OsHV-1 was found to increase when the viral suspension was added to primary cultured oyster hemocytes from Day 3 to Day 7, but the increase was not significant compared to the control group, suggesting that hemocyte cell was not the target cell type for OsHV-1. Then, viral suspension was added into gills, mantle or heart organs maintained in a culture medium. OsHV-1 DNA was not detected in mantle and heart, but consistently detected in gill tissues, indicating that gill is a suitable tissue to proliferate OsHV-1 in vitro. However, OsHV-1 was not recovered from the used culture medium in the experiment, and further improvement is required to apply this method to obtain large amount of pure OsHV-1.

研究分野：魚病学

キーワード：マガキ ウイルス 組織培養 細胞培養

## 1. 研究開始当初の背景

カキヘルペスウイルス(Ostreid Herpes Virus I:以降 OsHV-1 と呼称)の変異型の一つである OsHV-1  $\mu$ Var による感染症は、マガキ養殖に最大で 100%に達する深刻な死亡をもたらす大きな問題である。しかし、最近では OsHV-1  $\mu$ Var 以外にも高い病原性を有する変異型が多数存在すること、世界各地のマガキ産地にこれらの病原性変異型が広く分布すること、さらにはいくつかの変異型はマガキ以外の二枚貝類にも病害性を示す可能性があることが示唆されている。また、日本国内にも病原性を有する OsHV-1 の変異型が報告されており、本ウイルスは内外を問わず二枚貝生産の最大の懸念の一つである。

様々な変異型が出現している現状では、各 OsHV-1 変異型の性状を解析、有害性の高い変異型を明らかにして防疫対策を実施することが重要と考えられる。ウイルスの場合、in vitro 培養した宿主培養細胞を用いて対象ウイルスを分離・増殖させ、その上でウイルスの性状解析を実施することが常套手段である。しかし、OsHV-1 の場合、ウイルスを増殖させる二枚貝培養細胞系が樹立されておらず、OsHV-1 の分離培養が成功しておらず、上述の病原生物学的的情報の取得は大幅に遅れている。

近年、イタヤガイ科(ホタテガイの仲間)の一種から得た初代培養血球を用い、OsHV-1 と宿主間の相互作用に焦点を当てた研究報告が Ji et al. (2017)によって発表された。この中で、培養液中に OsHV-1 ゲノムが増殖しているとされ、二枚貝血球に OsHV-1 が感染し、増殖していると考えられていた。一方、培養液からのウイルスの単離等、病原生物学的技術開発はなされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、上述の Ji et al (2017)の研究報告に基づき、OsHV-1 に対する感受性の高いマガキの細胞および組織を初代培養し、感染個体から調整した OsHV-1 懸濁液を加え、in vitro 条件下で安定的に OsHV-1 を培養する技術の確立を目指す。また、樹立された手法を用い、実際に感染マガキからのウイルス分離を試み、その上で病原生物学的知見の集積につなげることも目指した。さらに、培養液中にウイルスが増加した場合にはこれを回収し、特異抗体の作成等も試みることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 【実験1】培養マガキ血球を用いた OsHV-1 増殖の試み

これまで OsHV-1 の感染報告がない海域由来のマガキを購入し、閉殻筋から血リンパ液を採取した。血リンパ液の一部から DNA を抽出してから OsHV-1 特異的 PCR に供し、OsHV-1 に感染していない血リンパ液を細胞培養用マイクロプレートに撒いた。血球細胞の接着を確認後、血リンパ上清を除去し、抗生物質を添加した細胞培養用培地を加えた。24 時間後、OsHV-1 に発症したマガキ個体の組織抽出液を濾過滅菌したウイルス原液を培地に加え、15℃ で培養した。ウイルス原液を加えた培地(攻撃用培地)と、接種前(Day 0)、接種 3 日後(Day 3)、および接種 7 日後(Day 7)の培地を採取して DNA を抽出、定量リアルタイム PCR を用いて OsHV-1 ゲノム DNA 量を測定した。対照区として、マガキ血球のない攻撃用培地を用意した。

### 【実験2】培養温度の影響評価

培養温度による血球の維持およびウイルス増殖への影響を評価するため 15℃ と 20℃ の実験区を設定し、実験 1 と同じ実験を実施した。なお、研究期間中、新たな貝類細胞培養用培地が発表

されたため (Potts et al. 2020, PeerJ)、本実験は実験 1 とは培地組成を変更して実施した。

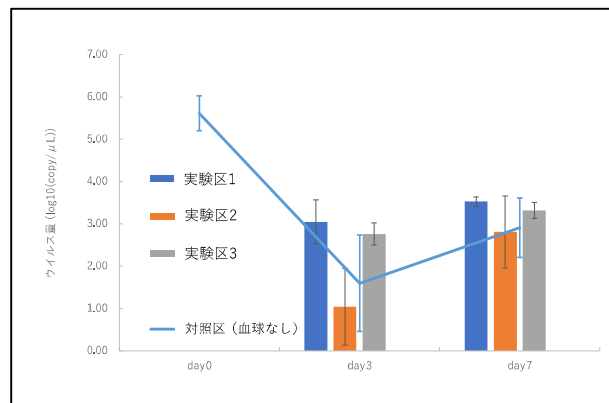
#### 【実験 3】培養マガキ組織を用いた OsHV-1 増殖の試み

OsHV-1 の感染報告がない海域由来のマガキから、鰓、心臓および外套膜を採取した。採取後は抗生物質と抗真菌剤を含む滅菌濾過海水で入念に洗浄したのち細切、組織片を抗生物質入り液体培地内に入れ、25℃ で培養した。培養 2 日後、OsHV-1 に発症したマガキ個体の組織抽出液を濾過滅菌したウイルス原液を培地に加えた。ウイルス原液を加えた培地 (攻撃用培地) と、接種前 (Day 0) と接種 7 日後 (Day 7) の培地、および培養 7 日後の培養組織を取り出し、DNA を抽出、定量リアルタイム PCR を用いて OsHV-1 ゲノム DNA 量を測定した。

### 4. 研究成果

#### 【実験 1】培養マガキ血球を用いた OsHV-1 増殖の試み

培養中に細菌のコンタミンによって結果が得られなかった 1 実験区を除く 3 実験区で、Day 3 から Day 7 にかけて、OsHV-1 ゲノム DNA 量の増加を確認することができた。一方、血球を加えていないウイルス原液のみの対照区では培養開始直後から Day 3 までウイルス量が低下したが、Day 7 には再度上昇していた (右図)。そのため、血球を加えた実験区の培養液中のウイルス量増加が、培養血球細胞を加えたことによる効果であると結論づけることはできなかった。



#### 【実験 2】培養温度の影響評価

それぞれの温度において実験区を 5 グループ設けて実験を実施したが、2 グループで細菌のコンタミンが生じ、ウイルス量の評価ができなかった。残りの 3 グループについては定量 PCR を用いたが、ウイルスを検出することができなかった。実験 1 と実験 2 の結果より、血球細胞は OsHV-1 が感染する好適な細胞ではないこと、また使用した培地が本研究目的に合わない可能性等が考えられたため、当該手法による培養血球による OsHV-1 の増殖は困難と判断した。

#### 【実験 3】培養マガキ組織を用いた OsHV-1 増殖の試み

マガキの外側に位置する外套膜は、ウイルス原液を加えるまでの間にバクテリアによるコンタミンが起っていたため、ウイルス増殖試験には用いなかった。また、心臓については培養後 7 日目まで拍動が確認できるなど良好な状態で維持することができたが、実験期間中、培地中にも組織内からも OsHV-1 は検出できなかった。

一方、鰓を用いた実験区では、Day 7 における培地中の OsHV-1 ゲノム量は Day 0 に比べて減少していたが、鰓組織内から検出された OsHV-1 ゲノム量は培地の 20 倍程多いことがわかった。そのため、培地に加えたウイルスが鰓組織内の好適細胞に感染し、細胞内で増殖している可能性が考えられた。しかし、Day 7 の培地内から検出されたウイルス量が少ないことから、細胞内で増殖したウイルスが放出されるまでには至らなかったのかもしれない。実際、培養 7 日後に至っても鰓上皮の繊毛は運動を続けており、ウイルス感染による鰓組織への障害が培養期間中に確認できていない。従って、今後はより長期な培養時間を設定することで、培地中へのウイルス放出を促すことが可能になるかもしれない。

## 研究のまとめ

本研究では先行研究結果に基づき、まず初代培養血球を用いた OsHV-1 の増殖システムの構築を目論んだ。しかし、試行を繰り返したものの先行研究で報告されているような結果は得られなかった。考えられる可能性として、マガキの生態防御系を担う血球細胞は OsHV-1 に対する感受性が低いこと、用いた血球は OsHV-1 に対して比較的強い耐性を有する成貝由来であったこと、さらに実験に用いた OsHV-1 の型の病害性が強くなかったことが考えられ、今後は、上記の点を鑑みて実験系を改良する必要がある。

培養組織を用いた試験では、*in vitro* 条件下で OsHV-1 を鰓組織に感染させることができると言う見込みを初めて得ることができた。血球を採取するよりも鰓組織を採取する方が容易であり、また実験に使用する量も多く確保することができるため、最終的に多くのウイルス量を取得できると予想され、良い手法かもしれないと考えられる。今後は、鰓組織に OsHV-1 が実際に感染し増殖していることを組織学的手法等で確認することが必要である。本研究では当初の目的を達成するまでは至らなかったが、OsHV-1 の分離培養に向けた新たな方向性が見出せたと考えられる。

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------