

2. 細胞培養とウイルス分離

(1) 細胞培養による検出

ア. MEM 培養液の調整

【器具・消耗品】

- 滅菌耐圧ガラス瓶（口径 33 mm）調合用 1000 ml.
- 滅菌ガラス瓶（口径 33 mm）MEM 培養液保存用 500ml 2 本.
- コニカルビーカー回転子入り（MEM 溶解用 200 ml）.
- 攪拌機（スターラー） ○10ml ディスポピペット
- 滅菌濾過フィルター（ミリポア製 0.22 μ m、口径 33mm）
- 滅菌済 DDW:1000ml ○吸引ポンプ ○オートピペッター

【試薬】

- MEM 粉末（1 袋,9.5g: GIBCO 61100-061 10 \times 1L）
- FBS（濾過滅菌済み）50ml \times 2 本（GIBCO カナダ産12483-020 500ml）
- 1M Tris 水溶液 pH8.0、5~7ml 作成:付録 2
- 炭酸水素ナトリウム（重曹）750mg/L
- 抗生物質
ペニシリン G カリウム:69 mg/L、ストレプトマイシン:139.2 mg/L
または PSN: \times 100 10ml（『市販品』 GIBCO \times 100 100ml Cat.No.15640）
MEM は粉末から作らず市販の液体培地を購入しても良い
（MEM 液体培地 :GIBCO 500ml Cat.No.11575-032）

【方法】

（無菌室外の操作手順）

- 抗生物質を秤量する際は、極力細菌などの混入を防ぐため、新しい薬包紙を使用する（包みの中間から引き抜くなど）。
- 抗生物質及び MEM 粉末は、結露を防ぐため早めに冷凍庫から取り出し、常温条件にしてから秤量等に供する。
- * PSN は液体なので 10ml ずつ分注し凍結保存、使用前に冷凍庫から取り出しクリーンルームに入れ解凍する。

イ. 無菌室内の操作手順

- 紫外線照射（少なくとも 15 分以上）後クリーンルーム内をアルコール消毒し、安全キャビネット内に薬品・器具等を準備する。
- 濾過吸引用のシリコンチューブを十分にアルコールで消毒する。
- 口径 33mm のガラス瓶（MEM 保存用 500ml）2 本の口をバーナーにかざす。
- 安全キャビネットの送風を停止する（粉末の飛散を防ぐため）

- 粉末 MEM の袋は、事前に上部の開封切れ目付近の内部にある粉末をよくたたいて落とし、ハサミで切断して開封する。
- コニカルビーカーをスターラーに載せ、MEM の粉末を入れる
- DW を 150ml ほど入れ、スターラーで MEM を溶解する
 - * 少量の DDW で袋の中の残った粉末を良く溶解してコニカルビーカーに加える
(2 回繰り返す)
 - * この段階では他の試薬を混ぜないこと (MEM の濃度が高く沈殿ができてしまう)。
- 十分溶解したらコニカルビーカーの溶液を 1000ml の滅菌済ガラス瓶に入れ(回転子共)、スターラーで攪拌しながらさらに滅菌 DW を約 900ml まで入れ、MEM を十分に溶解する。
 - * この時コニカルビーカー内に残った MEM 溶液は、2 回程度 DDW ですすいでガラス瓶に入れる。
- 十分溶解させた後、炭酸水素ナトリウム(重曹) 750 mg/L を加え滅菌 DW を 950 ml 程度まで加える
- MEM 溶液に秤量した抗生剤を加える。分注した PSN を用いる場合はベンチの送風を開始後 10ml を直接加える。
- 安全キャビネットの送風を再開する
- Tris 液 5ml を加えた後、キャップをして瓶を軽く振って液をよく混合させる。(液色を見ながら若干量を調整する。赤みがかかったオレンジ色が目安。
 - * MEM 溶液の入った瓶の口をバーナーにかざしてから Tris 緩衝液を入れる。
- 残りの滅菌 DDW を用いて、1000ml の目盛りまでメスアップする
- 口径 33mm の滅菌済ガラス瓶(MEM 保存用、500ml)にフィルター容器をセット(容器口は下向)、フィルター容器に吸引ホースを接続する。
- MEM 液をフィルターカップ容器に注ぎ、吸引させて滅菌濾過を行う。濾過中はカップ内のフィルター(濾紙)が露出しないように MEN を断続的に注ぎ込む。
 - * 1L の MEN を作成するにはガラス瓶 2 本を使用。
- (例)
 - ・直ぐに使用する場合 : 1 本目のガラス瓶に FBS を入れ冷蔵する。
(2%は 10ml、10%は 50ml)
 - ・保存する場合 : 2 本目のガラス瓶は FBS を入れずに冷凍し、使用前に解凍して FBS を入れる(2%は 10ml、10%は 50ml)
- * 瓶には培養液名及び作成月日、FBS の入れた月日及び濃度を記入する。

ウ. 細胞培養及びプレート作成 (75cm² フラスコ 1 本)

【器具・消耗品】

- ピペット台(試験管立て代用) ○滅菌 先曲がりピペット(細胞分散・溶液用) 2 本
- 滅菌 コニカルビーカー200ml、2 個 (細胞攪拌用<回転子入>、廃液用)、
- 攪拌機(スターラー) ○10ml メスピペット 1 本 ○細胞培養マイクロプレート 24well 4 枚



培養フラスコ 25 cm² ・75 cm²
ピペット台、分注オートピペッター
先曲がりピペット、10ml ピペット
廃液入れ、MEM 分注瓶

培養プレート 24 穴 ・96 穴
8 連ピペット・200 μl チップ、
リザーバー

【試薬等】

- 株化細胞(CHSE-214) : 75cm²フラスコに継代培養中のもの 1 本
- MEM 培養液
- 0.02%EDTA 液 : 付録 4 参照
- OV/T 液 0.25%トリプシン ×1 *



MEM 培養液
EDTA 溶液
0.25%トリプシン



攪拌機
コニカルビーカー、回転子



MEM 培養液と溶液は事前に冷蔵
庫から出しパスボックスに入れる

<写 真>



○ 継代する細胞の状況を確認しパスボックスからクリーンルームに搬入する

エ. 細胞培養

○MEM 培養液の入ったガラス瓶の口を火炎で軽く炙り、メスピペットで 200ml のコニカルビーカーに必要量（75cm² フラスコの培養細胞1本では 100ml；24 ウエルプレート1枚、75cm² フラスコ 4 本を作成）を分注する：

作成する分量の目安：24 ウエルプレート1枚約 25ml、96 ウエルプレート1枚約 10ml、25 cm² フラスコ1本 5 ml、75 cm² フラスコ1本 15-20 ml；細胞の希釈は 3~5 倍程度まで。（使用する器具はすべて口を火炎で軽く炙る）。

分注後 MEM 培養液は速やかに冷蔵庫に収納する（コンタミ防止）。

○培養フラスコ（75cm² フラスコ CHSE-214 細胞培養済み）のフラスコの周辺をアルコール棉で消毒し、キャップを開けから細胞培養液を火炎で十分炙った先曲りピペットで吸い出し（廃液用）コニカルビーカーに捨てる。

○培養フラスコの天地を逆さにし、火炎消毒した溶液用先曲がりピペットで EDTA 溶液を 3ml 程度細胞と直接触れないようにフラスコ内に入れ、ゆっくりと回転して元に戻して細胞面を浸し、2~3 回ゆっくりと傾けて細胞をリンスした後しばらく静置し、溶液を吸い出す。この操作を EDTA 溶液を 1ml として再度繰り返す。

○溶液を十分吸い取った後、細胞分散用 V/T 液（トリプシン）を 10 滴程度入れ細胞表面をリンスし 2 分程度静置した後、観察しながらフラスコ表面の細胞シートが十分白くなるまで上下に傾斜させながらリンスする（細胞の状態や温度によって時間が変化する）。

○細胞が白濁し、わずかに剥離が見られたところで V/T 液を丁寧に抜き取り、キャップをしてフラスコを軽くたたき、剥離の進行を確認する。

○フラスコに MEM 培養液を 2~3ml 入れ、先曲がりピペットで 50 回程度ピペッティングし、細胞の物理的分離を行う。

（ピペッティング時に泡が生じないよう、ピペット内に空気が入らないようにする）

○細胞の分離状態を顕微鏡で確認後、新たに MEM 培養液 10ml をメスピペットで培養フラスコに入れ、ピペットで攪拌後、攪拌用回転子入りコニカルビーカーに細胞懸濁液を全て戻し、軽く攪拌する。これを 2～3 回繰り返す。

* 25cm² フラスコで培養した細胞を経代する場合は、ここまでの経代作業に用いる液量をすべて 1/3 容量として行う(EDTA、V/T、MEM、など)。

○10 ml のメスピペットを用いて、24 well プレートに細胞懸濁液を 1ml ずつ入れる。

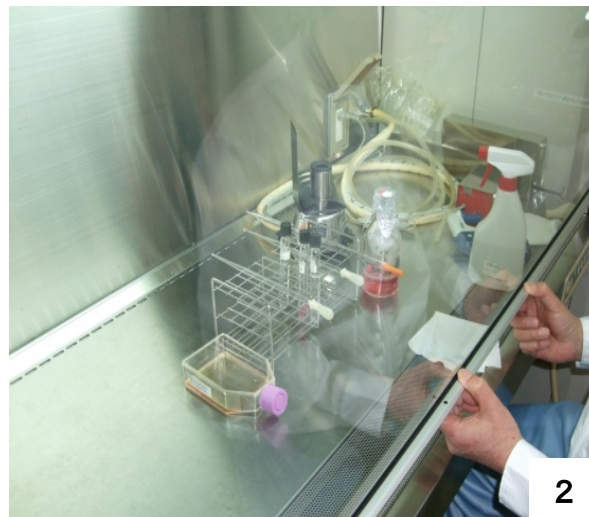
(ピペットの最後の 1ml は残した方が入れやすい)

96 well プレートの場合、細胞懸濁液を適量リザーバーにとり、200 μ l のチップをしっかりつけた 8 連ピペッターを用い、100 μ l で 8 穴ずつ入れる

○プレートに細胞混合液を入れ終わったら、残りの混合液を 15～20ml ずつ 75 cm² のフラスコにいれ細胞を継代する(細胞名、継代番号・年月日等を記入したラベルを貼る)。

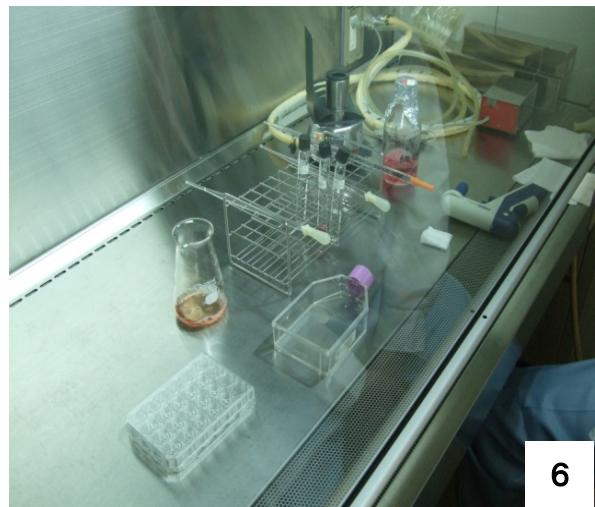
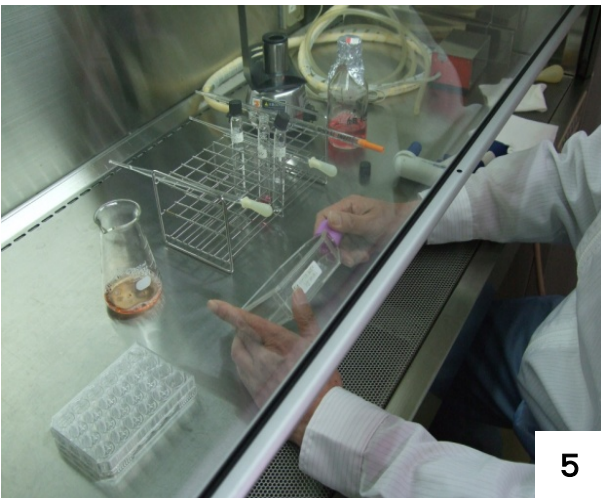
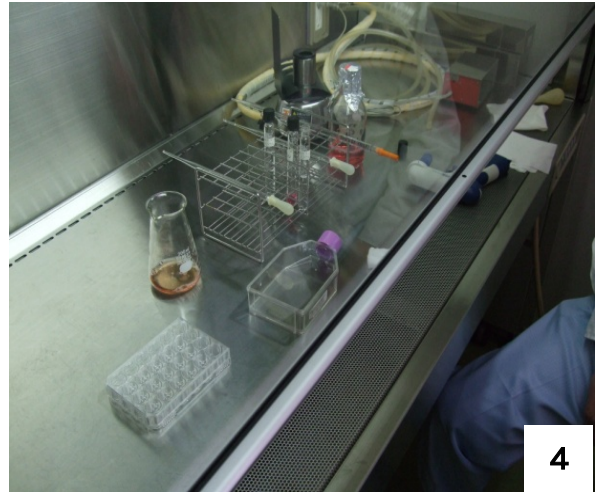
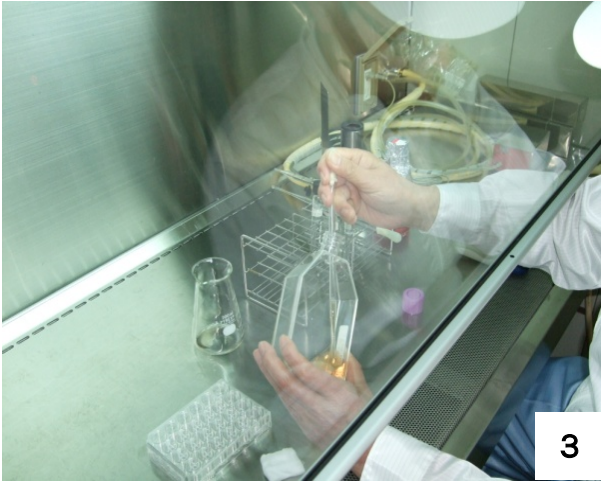
○細胞を入れたプレートは、静かに移動し、クリーンベンチ内で紫外線を防ぐためにアルミ泊で覆い、細胞が定着するまで少なくとも 1 時間程度静置する。

<写 真>



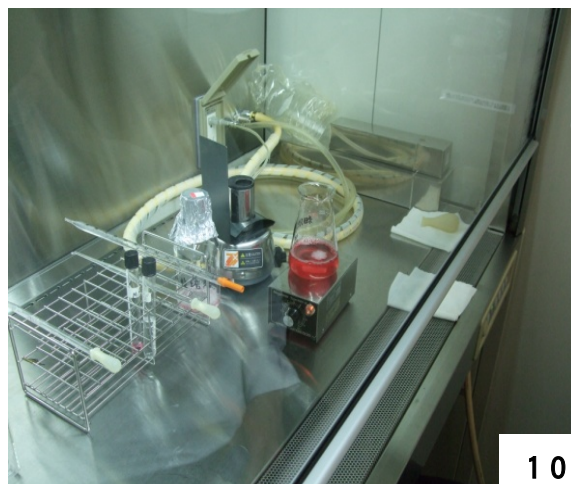
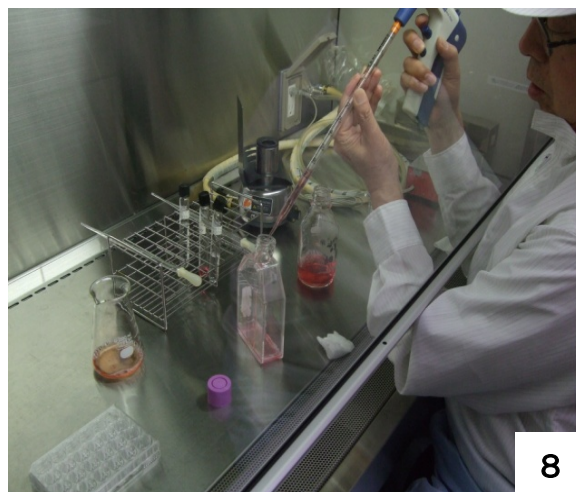
1. ピペット・培養液・廃液入れ・細胞フラスコ・プレートなど火炎消毒し準備する。
2. フラスコ内の古い培養液を先曲がりピペットで抜きとり廃液入れに入れる。

<写真>



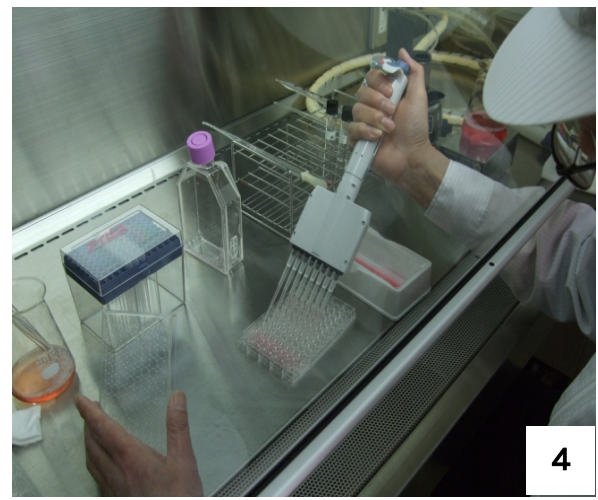
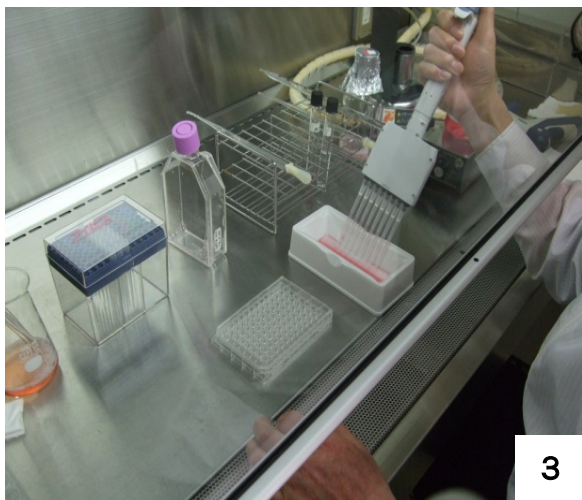
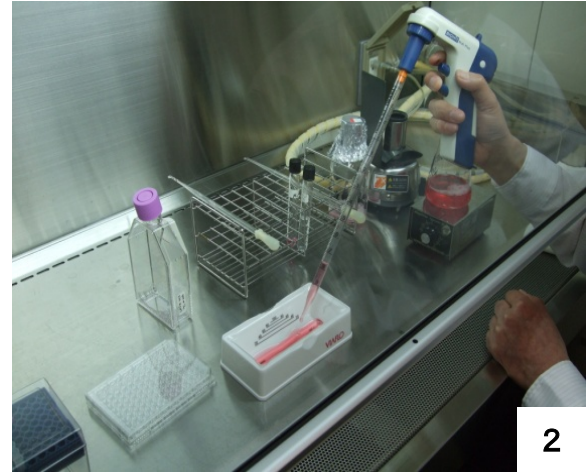
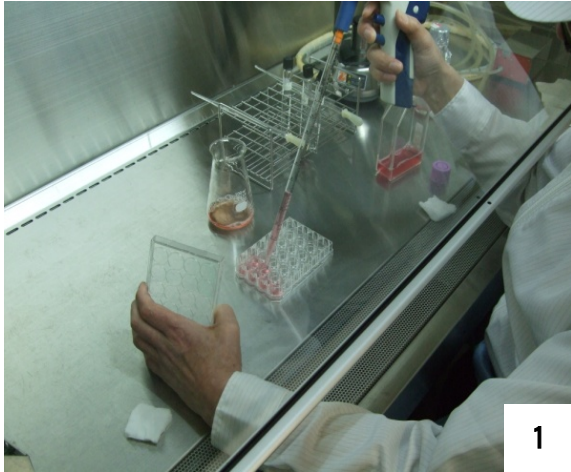
3. 溶液用ピペットで EDTA 溶液を 3 ml 程度入れ細胞表面及び壁面をリンスする
4. 2分程度静置し、EDTA 溶液を抜き取った後更に 1ml の EDTA 溶液を入れ軽くリンスし液を抜きとる。
5. トリプシンを 10 滴ほど壁面を伝い入れ細胞表面に行き渡らせ 2 分程度静置する。
6. 更にトリプシンを行き渡らせ、細胞が白濁し剥離が確認されたら、液を抜き取る。

<写真>



7. MEM 液を 10ml ピペットで 2.5ml とりフラスコ入れる
8. 先曲がりピペットで 50 回程度ピペッティングし物理的細胞分散を行う
9. 細胞分散を確認して、10ml の新しい MEM 培養液をフラスコに加え攪拌する
この操作を 2~3 回繰り返す。
10. コニカルビーカー（回転子入）に培養液を移し、攪拌機で均一にする。

〈写真〉



ウイルスの検出用プレートの作成 (24well プレート)

1. 攪拌した CHSE 細胞培養液を、24well プレートに 10ml のメスピペットで 1ml ずつ入れる

ウイルス感染価測定用プレートの作成 (96well プレート)

2. まず攪拌していた CHSE 細胞培養液を適量リザーバーに移す。
3. 次に 8 連ピペッターに 200 μ l のチップをしっかりと付け、目盛りを 100 μ l にセットする。
4. リザーバーの CHSE 細胞培養液を吸い取り、96well プレートに 8 穴ずつ入れる。

オ. 体腔液の接種及び盲継代（60 検体）

【器具・消耗品】

- 体腔液サンプル(60 検体) ○CHSE 細胞の入った 24well プレート 5 枚
- 汎用マイクロピペット(200 μ l用)及びマイクロピペット用チップ
- 廃チップ入れ ○プレート置き台

【方法】

- 細胞を入れたプレートは、前日準備しておく(当日の場合 4 時間以上静置させておく)。プレート蓋には検体名・番号・年月日を記入し、蓋と本体の間をパラフィルムやビニールテープ等で封をしておく。
- 体腔液・細胞プレート及び器具類をパスボックスからクリーンルームに搬入する。
- 安全キャビネットにプレートなどの搬入した器具等をセットする。
- 安全キャビネット内で 24well プレートの蓋を開け、体腔液(接種用サンプル)の各検体から 100 μ ずつマイクロピペットを用いて取り各 well に接種する。なお、それぞれの検体につき 2well に接種する。(チップは検体毎に交換する)
- 接種が終了したら、蓋をしてプレートとビニールテープ等で封をして、15°Cに設定した恒温器で保管し、7 日間細胞変性(CPE)の有無を観察する。

(盲継代)

- 7 日後に細胞変性が観察されなかった接種プレートについては、更に盲継代を行う。盲継代は1検体の2ウエルからそれぞれ100 μ lずつをマイクロピペットでとり、新しく作成した24wellプレートの1wellに計200 μ l接種する(新しい細胞プレートは前述の細胞培養・プレート作成等参照)。

カ. ウイルスの同定

従来法では中和試験による。TCID₅₀法とプラーク法があり、TCID₅₀法では 100 TCID₅₀/well に調製したウイルス液の感染性が阻止されるかどうかを試験する。プラーク法では 100 PFU/well のウイルスが中和されるかどうかを試験する。使用する抗血清には上記ウイルス量の半数を中和できる最大希釈倍数が記載されている (ND₅₀)。診断用抗血清は市販されていないので、(社)日本水産資源保護協会から配布される診断用抗血清を利用するか、各研究者から分与を受けたものを使用する。分離ウイルスの同定には、後述の血清学的手法および遺伝子検出法を用いる。

ウイルス特異タンパク質やウイルス特異遺伝子の検出法が開発され、中和試験の代わりに用いられている。

抗血清が配布されているウイルスはサケマス類のウイルスではIHNVおよびIPNVであり、中和しない場合は増養殖研究所魚病診断・研修センターに検体を送る。この場合、クール便(5°C)で送り、凍結してはいけない。細胞が融合し、巨核多細胞を形成する場合はOMVDのレファレンスラボに同定を依頼する。水産科学研究院海洋生物防疫学研究室。

付 録

・細胞培養に係る試薬等の調整

付録1: 抗生剤 (Anti Ink) の調整方法

【薬品種類・1L 当たりの量】

- ・硫酸ストレプトマイシン 800 μ g/ml (800mg/L)
- ・ペニシリン G カリウム 800IU/ml 、1mg = 1430units (559mg/L)
- ・マイコスタチン 400IU/ml 、1mg = 5326units (75.1mg/L)、またはナイスタチン 同量
- ・ハンクス液 9.8g/L ・炭酸水素ナトリウム 0.2g/L ・滅菌蒸留水1L

注: IU は国際単位

【器具・消耗品】

- ・1L 滅菌ガラス瓶(口径 33mm) 1 本、 ・ミリポア製 0.22 μ m 濾過滅菌フィルター
- ・ディスポピペット(25ml) ・攪拌機 (回転子共)
- ・遠沈管 (100ml)

【方法】

- ・上記の薬品を 1L 分計量しパスボックスから無菌室に搬入する。
- ・クリーンベンチをアルコール消毒し、薬品・器具等を準備する。
- ・上記の薬品を 1L の滅菌蒸留水を入れた瓶に解かし入れる。
- ・十分攪拌したのを確認してから、フィルター濾過(ミリポア製 0.22 μ m)を行う。
- ・できあがった抗生剤を、25ml のピペットで遠沈管に 80ml ずつ分注し、使用まで一旦冷蔵後冷凍保存する。

付録2 : Tris 調整方法

1M Tris の調整

M=mol/L 121.14g/L

- ・200ml 作成の場合 $121.14 \times 200\text{ml}/1000\text{L} = 24.228\text{g}/200\text{ml}$
- ・トリス 24.228gを滅菌 DW にを解かず(150mlDW)
- ・HCl で pH 調整 約 pH7.6~7.8 (200ml に対し約 20ml)
- ・滅菌 DW を加えて 200ml
- ・フィルターを 200ml の滅菌ボトル(径 33mm)に取り付け吸引濾過滅菌をする。
- ・製造年月日 Tris 明記して冷蔵庫に保管

付録3 : 0.02%EDTA 含む PBS 液の調整

- ・2NA(EDTA-2NA) 0.1g を PBS 4.8g 溶液に溶解し全量を 500ml にする。
- ・10ml のスクリュウキャップ付きガラス容器に分注し高圧滅菌をする。保存は常温で行う

付録4. ウイルスの定量 (TCID50)

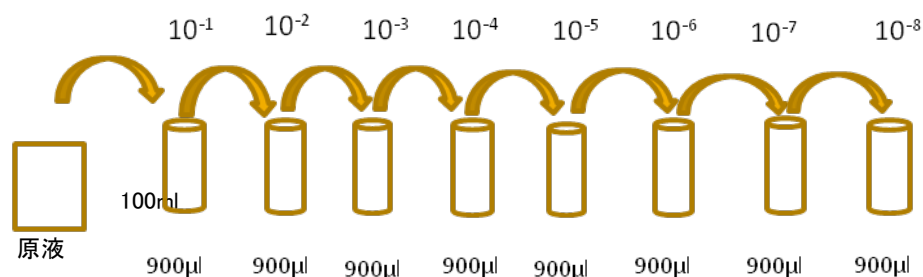
【器具・消耗品】

- ・ウイルスにより細胞変性が認められた 24well プレート
- ・新しく作成した CHSE 細胞の入った 96well プレート
- ・マイクロピペット(1ml、200 μ l) および滅菌済み専用チップ
- ・1.5ml マイクロチューブ(希釈用)
- ・破碎氷(冷却用) ・廃チップ入れ ・プレート置き台

【方法】

希釈列の作成

- ・マイクロチューブに血清なしの MEM 培地を 900 μ l ずつ 8 本に入れ、氷で冷却する。(希釈列は 10^{-1} から 10^{-8} の 10 倍段階希釈とし、ウイルス番号・希釈倍数等を記入する)
- ・CPE を発現した体腔液接種ウイルスの原液から 100 μ l を取り 10^{-1} のチューブに入れ、ボルテックスでよく混合させる。
- ・チップを交換して、混合させた 10^{-1} の液から 100 μ l を 10^{-2} のチューブに入れ混合させる。この操作を順次 10^{-8} まで(10^{-3} ・ 10^{-4} ・…… 10^{-8})繰り返す。



- ・CHSE 細胞入りの 96well のプレートに、各希釈列を 50 μ l 取り 4 穴にそれぞれ接種する。
- ・接種が終了したら、ビニールテープで封をして、15°C の恒温器で 1 週間 CPE を観察する。
- ・この結果から「Behrens-Karber 法」により、感染価を算出する。

接種プレート 希釈 10 倍段階希釈

	ウイルスNo.				ウイルスNo.				ウイルスNo.				
希	①	②	③	④	①	②	③	④	①	②	③	④	希
-1													-1
-2													-2
-3													-3
-4													-4
-5													-5
-6													-6
-7													-7
-8													-8
	接種 月 日								細胞名 CHSE				

Behrens-Karber 法

検査事例

計算式 $\log\text{TCID}_{50} = D + (h_3+h_4+h_5+\dots) \times d + 0.5 \times d$

D: 全 well がCPE陽性(陽性率=1)であった(最高)希釈倍率の常用対数 $=\text{Log}10^2 = 2$

h: 各wellのCPE陽性率 (<1 の場合)

h	陽性 well 数 (A)	接種 well 数 (B)	陽性率 A/B
h1	4	4	1
h2	4	4	1
h3	3	4	0.75
h4	1	4	0.25
h5	0	4	0
h6	0	4	0
h7	0	4	0
h8	0	4	0
計			1

希釈系列 10 n 乗

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	+	+	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-	-	-
C	+	+	+	+	-	-	-	-
D	+	+	-	-	-	-	-	-

CPE 発現状況

d: 試料の 1 希釈当たりの希釈倍率の常用対数 = 1 (希釈倍数は 10 倍なので)

$$\log\text{TCID}_{50} = 2 + (0.75 + 0.25 + 0 + 0 + 0) \times 1 + 0.5 \times 1 = 2 + 1 + 0.5 = 3.5$$

1well に接種した液中のウイルス感染価 ($\log\text{TCID}_{50}$) = 3.5

1ml に換算するには 1well 当たり接種液量 0.05ml であるから 20 倍して $\log 20 = 1.301029996$

1ml の液中のウイルス感染価 $\log\text{TCID}_{50} = 3.5 + \log 20 = 3.5 + 1.301029996 = 4.8013$

$\log\text{TCID}_{50}/\text{ml} = 4.8$

(別計算方法)

$$\text{TCID}_{50} = (1 \text{ 列目の希釈倍率}) \times (\text{希釈倍率})^{\Sigma - 0.5}$$

ただし、 $\Sigma =$ 各希釈段階における {(CPE 陽性ウェル数) / (検体数)} の総和

上記の例では $\Sigma = 4/4 + 4/4 + 3/4 + 1/4 = 12/4 = 3$

$$\text{したがって、TCID}_{50} = (1 \times 10^1) \times 10^{3-0.5} = 10 \times 10^{2.5} = 10^{3.5}$$

使用したウイルス液は 50 μl なので、 TCID_{50} とすると、ウイルス原液の力価は

$$10^{3.5} (\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{l}) \times 20 = 2 \times 10^{4.5} (\text{TCID}_{50}/\text{ml}) \quad 2 = 10^{0.301} \text{ より}$$

$$\rightarrow 10^{0.301} \times 10^{4.5} (\text{TCID}_{50}/\text{ml}) = 10^{4.801} (\text{TCID}_{50}/\text{ml})$$

$$\rightarrow \log \text{TCID}_{50}/\text{ml} = 4.801$$

付録5 :RT-PCRによるIHNV検出のための試薬調整

- ・ウイルスの核酸抽出及びPCRの手法は次の資料を参照。
「分離ウイルスをテンプレートとしたRT-PCR法によるSVCの診断(PDF)」
http://nria.fra.affrc.go.jp/sindan/kenkyu/pdf/svc_rt-pcr_bunri.pdf

・IHNVのRT-PCRは以下の2つの手法が現在比較的高い検出感度が得られている。

1. OIE (2006) OIE manual <OIE>

Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2006

2. Arakawa et. al. (1990) Disease of Aquatic Organisms <DAO> 8:165-170 DAO

Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a nucleoprotein gene sequence of infectious hematopoietic necrosis virus

【プライマーリスト】

1. OIE法

(1st)

OIE-UP TCAAGGGGGGAGTCCTCGA

OIE-DW CACCGTACTTTGCTGCTAC

(Nest)

OIE-NU TTCGCAGATCCCAACAACAA (=IHN-F)

OIE-ND GCGCACAGTGCCTTGGCT

2. Arakawa法

IHN-F TTCGCAGATCCCAACAACAA (=OIE-NU)

IHN-S CTTGGTGAGCTTCTGTCCA

【RT-PCR試薬の調整】

キット：One step super script III mixture (インビトロジェン社)

	25 ul
DW (RNase free)	8.5
Sense Primer (10pico/ul)	0.5
Ant Sence Primer (10pico/ul)	0.5
2x Reaction Mix	12.5
SuperScript RT/Taq	1
Temp RNA	2 ul

【RT-PCR のプロトコル】

1. OIE 法

IHN-OIE	
OIE (1st step)	
Primer	OIE-UP OIE-DW
55°C	30 min
94°C	2 min
25	cycle
95°C	30 sec
50°C	30 sec
72°C	1 min
72°C	7 min
→ Nest step	

PCR 産物 786bp

OIE (Nest step)	
Primer	OIE-NU OIE-ND
25	cycle
95°C	30 sec
50°C	30 sec
72°C	1 min
72°C	7 min

PCR 産物 323bp

2. Arakawa 法

IHN-Ara	
Arakawa	
Primer	IHN-F IHN-R
55°C	30 min
94°C	2 min
40	cycle
94°C	1 min
52°C	1 min
70°C	4 min

PCR 産物 252bp
