

魚病診断マニュアル

コイ春ウイルス血症（SVC）の診断

ウイルス分離による診断法

（平成 20 年 8 月 改訂版）

独立行政法人 水産総合研究センター

養殖研究所 魚病診断・研修センター

1. 注意事項

- ・ 生の魚体組織試料を扱う場合には、何らかの病原体がいる可能性を常に考え、検査後、殺菌・消毒できる場所で行う。
- ・ サンプルは新鮮なものを用いる（腐敗の著しいものは使用しない）。試料到着後、速やかに検査を行う。やむを得ず、後日検査する場合には、 -80°C に凍結保存する。
- ・ 特定疾病が疑われる試料では、検査方法、供試細胞、検査組織・部位などは、各疾病のマニュアルに従う。
- ・ 試料のクロスコンタミネーションを防ぐため、検体ごとにチップ、ピペット類を換える。
- ・ 注射器を使用する場合には、使用時および使用後の取扱いに注意する。

2. 必要な実験装置と試薬類

1) 試薬・実験器具



- ・ フィルター付きチップ ($200\ \mu\text{L}$)
- ・ オートピペッター ($200\ \mu\text{L}$)
- ・ 解剖用具
- ・ 2ml 容クライオチューブ (滅菌済み)



- ・ 10 x 抗生物質添加培地
接種用細胞の分散時に用いた培養液(2% 血清添加 MEM)に x100 抗生物質-抗真菌液(抗一抗液)(例：Invitrogen-Gibco 抗生物質-抗真菌剤 (100x) 15240-062) を 1/10 量加える。
- ・ ガラスホモジナイザー (滅菌済み)
- ・ ピペット (滅菌済み)
- ・ 電子天秤 2 つ(魚体重を量るものと、組織用の一桁の mg まで測られる精密な電子天秤)
- ・ 1.5ml 容マイクロチューブ (滅菌済み)
- ・ アルコール綿
- ・ 滅菌缶滅菌シャーレ
- ・ ティッシュ



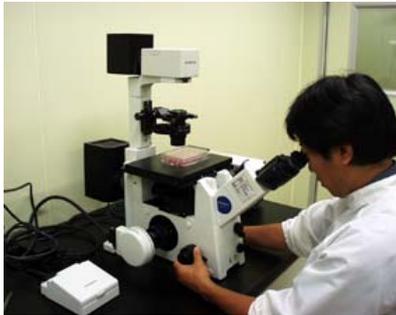
細胞：EPC を使用する。

検査の前日もしくは6時間前に24wellプレートに1mLずつEPC細胞を分注する。準備するwell数は検査用個数×2(高・低濃度接種用)+1(陰性対照分)とする。細胞分散は、「細胞培養」に準ずるが、使用する培地は2%血清・抗生物質添加培地とする(例：2%血清・Invitrogen-Gibco 抗生物質-抗真菌剤(1×)添加MEM(2-MEM培地))。

2) 実験機器・装置

- ・ 冷却遠心機あるいは冷却高速微量遠心機
- ・ オートクレーブ
- ・ クリーンベンチ
- ・ 倒立顕微鏡
- ・ インキュベータ

3. 手技



- ① 準備した細胞が使用できる状態か確認する。コンフレント少し前が良い。
- ② x10 抗-抗液加 2-MEM 培地，ホモジナイザーをあらかじめ氷冷する。依頼先の資料や調書，検体数や検査部位等について確認する。



- ③ 解剖用具を火炎滅菌（あるいは乾熱滅菌）する。



- ④ 魚が活着ている場合は、麻酔する。



- ⑤ 検査魚の外観症状等を観察後、体長・体重を測定・記録する（診断依頼事項や必要に応じて、寄生虫や細菌検査を行う）。



- ⑥ 体表をよく絞ったアルコール綿で拭く（アルコールはウイルスをも不活化するので、アルコールは必ず、よく絞る）。



- ⑦ 総排泄口よりやや頭よりのところにはさみをいれて、片側の体側を腸管が切れないように背びれ方向へ向けて切る。



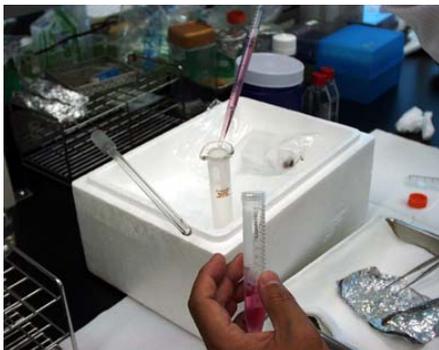
- ⑧ 側線よりやや背鰭側に、側線に沿うように頭の方へ向けて切り込みをいれる。魚が活着している場合は解剖中に出血することがあるので、乾綿でぬぐう(使用した乾綿は滅菌缶に入れて、最後にオートクレーブする)



- ⑨ 鰾の前室と後室の間にある体腎組織を採取する。採取した組織の半分はウイルス分離用として、もう半分はRT-PCR用の試料とする。検体数が多い場合は、5尾ずつ、プールしてもよい。解剖ができないほど小さい稚魚では魚体全体あるいは筋肉部を除去して魚体前半部を採取する。



- ⑩ ウイルス分離用の組織(ホモジナイズする組織)重量を測定・記録する。



- ⑪ ホモジナイザーに検体を入れ、10倍量の10x抗-抗液添加2-MEM培地を加える(250mg組織なら2.5mLの10x抗-抗液添加2-MEM培地を加える)。



- ⑫ ホモジナイザーを冷やししながら、組織が乳化するまで磨砕する。使用した乳棒は滅菌缶へ入れる。



- ⑬ 磨砕液の中央部分付近から 1mL 採取し、滅菌済みの 1.5mL 容マイクロチューブへ入れる。ピペットは、個体ごとに変え、使用後は滅菌缶へ。



- ⑭ 冷却遠心機で 2000g(もしくは 5000rpm), 5 分間遠心分離する。



- ⑮ 遠心後、上清を新しい滅菌 1.5mL マイクロチューブチューブに移す。



- ⑯ 20℃、2 時間もしくは 4℃で一晩インキュベートする。途中数回攪拌して、抗生物質が十分働くようにする。インキュベート後は、-80℃で保存可能。



- ⑰ 準備した 24well の EPC 細胞のプレート蓋に接種サンプル名を記入しておく。



- ⑱ インキュベートした組織磨細液を 1 サンプルあたり 2 well に、採取組織の終濃度が 1/200 および 1/1000 となるように接種する(1mL 培地液に対して、 $10\mu\text{L}$ と $50\mu\text{L}$ を接種する)。



- ⑲ プレートの蓋をビニールテープでシールし、インキュベータへ入れる。培養温度は、 20°C とする。

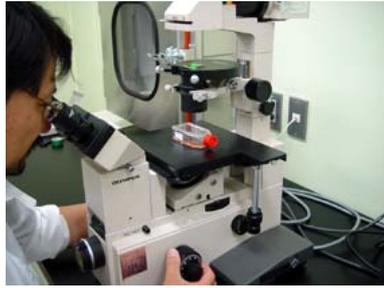


- ⑳ 接種後、毎日観察する。細胞変性効果(CPE)が出現した場合には、分離ウイルスの同定を RT-PCR で行う。

- ㉑ 7 日間 CPE が出現しない場合には、1 サンプルあたり使用した 2well から $50\mu\text{L}$ ずつピペットで上清を採取して、合わせて、 $100\mu\text{L}$ を、もう一度新しく準備した細胞へ植え継ぐ(盲継代)。



- ㉒ 盲継代実施の前日に 24well に EPC 細胞 1mL を準備し、当日、準備した細胞が使用できる状態か確認する。



- ⑳ 盲継代実施後，細胞を毎日観察する。CPE が出現しなかった場合には，ウイルス検査は陰性と判定する。CPE が出現した場合には，RT-PCR で SVCV を確認する。

4. 検査後機材処理



- ㉑ ウイルスに汚染した器具，プレート等は滅菌缶に入れオートクレーブ処理する。



- ㉒ 病魚の輸送に使用された発泡スチロール等は廃棄用の袋に入れ焼却処分する。

参考資料

- 1) 微生物学実習提要，東京大学医科学研究所学友会編，丸善株式会社