

ニジマス稚魚の瞬臓壊死症について—II 組織培養

家 坂 剛 正

本病は41年度の試験結果よりウイルス性瞬臓壊死症と推定されたので、本年度は病原体を確認するために組織培養を試みた。

I. 実 験 A

実 験 の 方 法

ニジマス一年魚より未熟卵巣及び鱗を無菌的に摘出して細切し、それをトリプシン液に入れ、4°Cで一昼夜マグネティックスターラーで攪拌することによつて細胞を分散させた。トリプシンは、Difco(1:250)を使用し、CaCl₂とMgCl₂を除いたDulbeccoのリン酸緩衝塩類溶液に0.25%の濃度に溶かし、濾過滅菌したものである。細胞を分散させたトリプシン液を4枚重ねのガーゼで濾過した後1500rpm10分間遠心し、沈殿した細胞をDulbeccoの液に浮遊させて遠心することにより細胞を数回洗滌した。洗滌した細胞を培養液に再浮遊させ、原形質及び核をそなえた完全な細胞を計数し、30万~50万/mlの細胞浮遊液として試験管(15×105mm)に1ml宛分注、19°Cで培養した。

※ 培 養 液

牛血清(千葉血清) -----	20%	
NaHCO ₃	0.25 g/l	}
NaCl	8.00	
KCl	0.40	
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.06	
Glucose	1.00	
KH ₂ PO ₄	0.06	
CaCl ₂	0.14	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20	
		Hanks液 80%

以上の液にラクトアルブミン加水分解物0.5%、ストレプトマイシン0.2mg/mlを加えた。PHは7.2~7.4にあつた。

結果及び考察

1週間観察をつづけたが、細胞の増殖はみられなかつた。その原因の一つとして、培養液の不適が考えられる。JENSENS¹⁾は単層細胞培養法を用いて魚類細胞の培養を報告しており、本報の培養液²⁾における牛血清を10%にして牛羊水を10%添加したもので培養している。また、KENWOLFSはヒトの臍帯血清、全鶏卵限外濾液、ラクトアルブミン水解物、Hanks液、Earle液及び合成培養液199からなる培養液を用いて培養に成功している。本報の組成をもつ培養液で細胞を培養したという報告例はなく、培養液を検討する必要があるのではないかと思われる。

II. 実 験 B

実 験 の 方 法

ニジマス親魚より採取した血漿を *Cover glass* (24×32mm) に1滴落し、そこにニジマス0年魚(約10g)より摘出した鱗の小片をおいた。培養液の1滴をその上に添加して *Cover glass* の四隅にワセリンをつけ、*hollow slide glass* でおしつけて *Cover glass* の縁をパラフィンで封じ、19°Cで培養した。培養液は合成培養液199(Difco)と牛血清(Difco)を4:1の割合に混合したものを用了。

結果及び考察

本実験においても細胞の増殖はみられなかつた。原因としては次のようなことが考えられる。

- 1) 普通の *hollow slide glass* を用いたために *hollow* が小さく、培養液が少量しか入らないこと。
- 2) 血漿は一般にはニワトリ血漿を用い、それに *chick embryo extract* を加えることによつて凝固させた血漿に組織片を植えて培養している。即ち、凝固血漿におけるフィブリンの網状構造は細胞が増殖していく際の物理的支持体として働き、また、細胞による消化を受けて非常によいアミノ酸供給源になるといわれている。⁴⁾ ニジマス血漿のみでは凝固し難く、支持体としての働きをなし得なかつたこと。

以上二つの実験において細胞の増殖は見られず、従つてウイルスを確認するに到らなかつた。

文 献

- 1) JENSEN, MOGENS H 1963 : *Preparation of fish tissue cultures for virus research. Bulletin de l'office international des epizooties, vol. 59, no. 1-2* 間接引用
- 2) KEN WOLF, M. C. QUIMBY, 1960 : *Preparation of monolayer cell cultures from tissues of some lower vertebrates. Science, vol. 132*
- 3) KEN WOLF and C. E. DUNBAR, 1957 : *Cultivation of adult teleost tissues in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 95*
- 4) 中井準之助他, 1965 : 「組織培養 基礎と応用」朝倉書店