

カリシウイルスの不活化とその効果の測定法に関する研究

日大生産工 (院) ○飯塚 絹江・日大生産工 (PD) 根本 浩史

日大生産工 小森谷 友絵・神野 英毅

1 緒言

カリシウイルスはノロウイルス、サポウイルス、バシウイルス、ラゴウイルスの総称であり、ウイルス表面に 32 個のコップ状のくぼみを持ち、直径 35-39 nm のエンベロープを持たないプラス一本鎖 RNA ウイルス群である。この中で、ヒトノロウイルスは急性胃腸炎の原因ウイルスであり、近年では本ウイルスによる食中毒が多数報告されている。ヒトノロウイルスは時として集団感染を引き起こすため有効な不活化法が望まれている。しかしヒトノロウイルスの人工培養系が確立されていないため、TCID₅₀法のようなウイルス培養による測定を行うことができない。そのため近年では Real-time PCR による遺伝子定量から、不活化評価が行われている。しかしながら Real-time PCR ではウイルスの感染力の有無が判断できないため、不活化ウイルスと感染力のあるウイルスが区別できない。そこで本研究ではヒトノロウイルスの代替ウイルスとして培養可能なネコカリシウイルス(Feline calicivirus:FCV)を使用し、ウイルスの遺伝子量と感染価の比較による不活化効果測定方法の検討を行った。

2 実験

2.1 ウイルス培養

FCV は F9 株を使用し、宿主細胞にはネコ腎細胞(Crandell-Rees feline kidney cell : CRFK)を用いた。FCV は CRFK 細胞が 80% コンフルエントに達した細胞に感染させ、3~4 日間培養し、細胞変性を確認後、FCV を回収した。

2.2 ウイルス濃縮および精製

FCV は培養後の溶液を回収し Amicon Ultra-15(Millipore)を用いてウイルスを濃縮した。

その後、密度勾配遠心法を用いて精製を行った。不活化の検討は精製ウイルスを用いて行った。

2.3 ウイルスの不活化効果の測定

2.3.1 不活化処理

FCV の不活化剤として Na₂CO₃(0.1~0.5%)および pH を 10.5~12.0 に調節した NaHCO₃を用いた。また不活化操作は不活化剤 270 μ に FCV 30 μL を混合し 60 秒間静置して行った。また試薬を用いずに熱処理による不活化も。熱処理は 72°C で 60 秒間行い、加熱後で氷上冷却した。不活化処理後のウイルス液は 0.5 M HEPES(pH7.5)にて 20 倍希釈した。

2.3.2 感染価測定

FCV の感染価の測定は、不活化後のウイルス希釈液を 0.5 M HEPES にて 10 倍ずつ段階希釈し、それぞれの希釈液を 30 μL ずつ 96 穴プレートに培養しておいた CRFK 細胞に播種して行った。その後 3~4 日間細胞培養し、細胞変性を顕微鏡にて観察した。

2.3.3 遺伝子定量

20 倍希釈したウイルス希釈液から Magstration System 6GC(PSS)を用い RNA を抽出し、One Step SYBR PrimeScript RT-PCR kit II (TAKARA)、LightCycler2.0(Roche)を用いて Real-time RT-PCR による遺伝子定量を行った。プライマーは F9Cp66F:5'-ACCCGACAAGGAACAATGGT-3' および F9Cp68R:5'-GAGCAAAGGGCCTAAGG ATTGT-3'を使用した。

2.3.4 RNase 処理による遺伝子量の比較

RNase 処理は 20 倍希釈した不活化ウイルス溶液に RNase 2 μL (ニッポンジーン) を加え、37°C、30 分間行った。RNase 処理後、同様に RNA を抽出して Real-time RT-PCR による遺伝子定量を

行った。

3 結果および考察

0.1%~0.5% Na_2CO_3 による不活化の結果を Fig.1 に示した。コントロールウイルスの TCID_{50} は 6.05 log となり検出限界は 4.75 log となった。感染価は濃度の増加に伴い減少し、0.4%と 0.5%では検出限界以上の減少を示した。遺伝子定量の結果、0.3~0.5%で減少量が最大となり、2.50 log 減少した。しかし感染価と RNA で減少量に差が生じた。

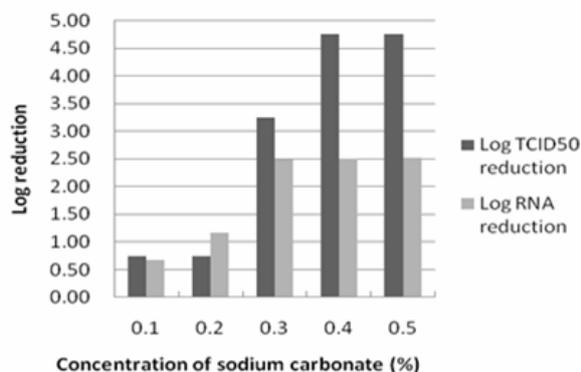


Fig. 1 Na_2CO_3 による不活化効果

0.4% NaHCO_3 による不活化の結果を Fig.2 に示した。コントロールウイルスの TCID_{50} は 6.30 log となり検出限界は 5.00 log となった。0.4% NaHCO_3 の pH による不活化では感染価と遺伝子量の変化量は pH の増加に伴い減少した。この時、感染価と遺伝子量の差は少なかった。

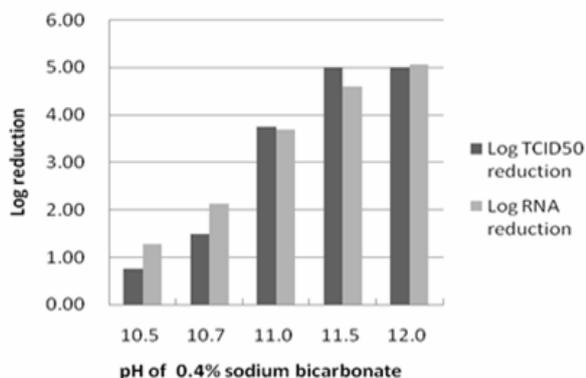


Fig. 2 NaHCO_3 による不活化効果

このように強アルカリ条件下では感染価と遺伝子の減少に相関性が見られた。しかしより弱いアルカリによる不活化では感染価の減少が見られたが、遺伝量はあまり減少しなかった。そのため、感染力のないウイルスであっても RNA

を保持しているウイルス粒子が存在すると考えられる。

熱による不活化効果の測定の結果、コントロールウイルスの感染価は TCID_{50} にて 3.00 log であったため、不活化効果は 3.00 log TCID_{50} (99.9%)以上となった。RNase 処理を行い遺伝子量の変化を調べたところ、RNase 処理のみを行った不活化していないウイルスでは 28% 遺伝子が減少した。熱処理のみ行ったウイルスは 33%減少し、熱処理と RNase 処理行った場合、86%の遺伝子が減少した。RNase 処理を行うことでウイルスの遺伝子の減少量が大きく向上した。しかし、その割合は感染価の減少率に及ばなかった。このことから RNase 処理を行うことで不活化されていないウイルスの遺伝子のみ測定することができた。

カリシウイルスウイルスは外側の capsid タンパクの中に RNA が内包されている構造をしている。ウイルスの不活化には capsid タンパクの破壊と遺伝子レベルの破壊から構成されていると考えられる。そのため熱処理や弱アルカリのような比較的マイルドな不活化条件では、遺伝子量による不活化効果の正確な測定は難しいと考えられる。

4 結論

FCV を用いて遺伝子量と感染価の比較から不活化効果の測定を行った。本結果から、不活化の条件によっては感染価と遺伝子の減少量が一致しない場合があり、遺伝子定量のみでは不活化効果の測定が不十分であることが示された。今後はさらに不活化条件の検討を行い、不活化による感染価と遺伝子量の関係について相関性を見出せる系の検討を行う。

5 参考文献

- 1) Y. S. Malik, S.M. Goyal, *International Journal of Food Microbiology* **109** 160–163(2006)
- 2) J. R. Toppin, et al. *Journal of Virological Methods*, **156** 89-95 (2009)