

カリシウイルスの不活性化とReal Time RT-PCRの相関性の研究

日大生産工(院) ○星 麻利華 ライオン株式会社・ファブリックケア研究所 戸部 聖一
日大生産工 小森谷 友絵 吉宗 一晃 神野 英毅

1. 背景

ノロウイルス(NV)は急性胃腸炎における原因の1つであり集団感染を引き起こすため、有効な不活性化法が望まれている。

一般的なウイルスの不活性化評価は主に細胞培養による感染価の測定が行なわれているが、NVは細胞培養系が確立していないため不活性化評価が困難である。

Real Time RT-PCRを用いた解析手法は、培養を行わなくてもウイルスの定量を可能とした。そこで、Real Time RT-PCRを用いることによって不活性化を判定できる可能性が考えられる。

現在、NVの代替としてネコカリシウイルス(FCV)を用いて、感染価の測定から不活性化評価が行われている。ところが、不活性化したFCVにもRNAが存在するため、不活性化したFCVの感染価とRNA量の相関性が得られないことがErwinらによって報告されている (Table 1)¹⁾。そのため、FCVの不活性化の有無をRNA量から評価するには、上述の相関性を高める必要がある。

Table 1 不活性化の有無およびRNAの存在状態

不活性化	感染価	RNA
有	無	存在する
無	有	存在する

有機過酸のひとつであるアルキルアシルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウム(OBS)はFCVに対する不活性化効果を示す²⁾。

そこで本研究ではNVの代替ウイルスであるFCVを使用し薬剤のモデルとしてOBSを用いて、細胞培養による感染価測定値とReal Time RT-PCRによるRNAの定量値との相関性を高め、Real Time RT-PCRを用いた評価法を確立する。

2. 実験

2.1 CRFK細胞培養によるFCVの増殖

本研究ではFCV F9株(ATCC株 VR-782) を使用し、宿主細胞にはネコ腎細胞(CRFK, ATCC株 CCI-94)を用いた。CRFK細胞を5% FCS含むD-MEM培地にて培養し、FCVを感染させ、FCVの増殖数が極大を示す20時間後に細胞変性を確認して回収した。

2.2 FCVの濃縮

回収したFCV溶液を遠心分離し、その上清を0.20 μmのメンブレンフィルターでろ過を行った。その後Amicon Ultra-15 (Millipore)を用いてFCVを濃縮した。

2.3 FCV不活性化

アルキルアシルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウム(OBS)と過炭酸ナトリウムを25°Cで10分間反応し、有機過酸を生成させその溶液とFCV溶液を一定時間反応させた。反応後0.1 Mチオ硫酸ナトリウム、0.05 %カタラーゼを含む0.1 M HEPESにて反応を停止させた。

2.4 感染価の測定(TCID₅₀法)

不活性化を行ったFCV溶液および未処理のFCV溶液を0.1 M HEPESを用いて段階希釈し、96穴プレートに培養しておいたCRFK細胞にそれぞれの希釈液を30 μl ずつ接種し、3日間培養し、細胞変性の観察より感染価(TCID₅₀)を求めた。

2.5 RNase処理

FCV溶液200 μlに対してRNase (ニッポンジーン)1.25×10⁻⁴-0.25 mg/mLとなるように加え37°Cで30 min反応させた。

Study on Correlation between Calicivirus Inactive and Real Time RT-PCR

Marika HOSHI and Seiichi TOBE and Kazuaki YOSHIMUNE and Tomoe KOMORIYA
and Hideki KOHNO

2.6 RNAの定量

RNase処理を行ったFCV溶液を、QIAmp Viral RNA Mini kit(QIAGEN)を用いてFCV内部のRNAを抽出し、Real Time RT-PCRによりRNAを定量した。

3. 結果

3.1 OBS-12による不活性化

アルキル炭素鎖長12のOBS (OBS-12) を38ppmに溶解した反応液にてFCVを不活性化させた。この実験ではRNase処理を行わなかった。その結果、Fig. 1に示すとおり、感染価は3分で6 log以上(検出限界)減少した。それに対しRNA量は、3分で3 log減少しその後一定であった。

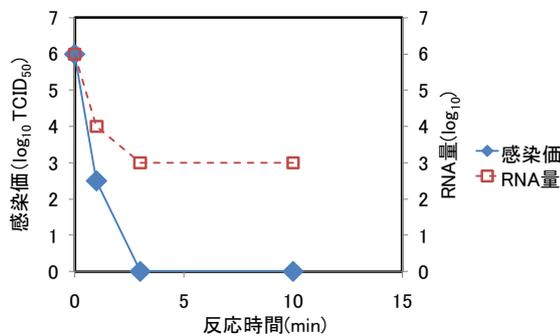


Fig. 1 OBS-12による不活性化とRNA量

3.2 RNase処理の検討

活性のあるFCVをRNase 0.25 mg/ml で処理を行うとRNA量は4.4 logから0.1 log以下まで減少し、 1.25×10^{-4} mg/mlで処理を行うとRNase未添加と同等の4 logを維持した。一方で予めFCVより抽出したRNAのみを 1.25×10^{-4} mg/mlで処理するとRNA量は3 logから0.1 log以下まで減少した。

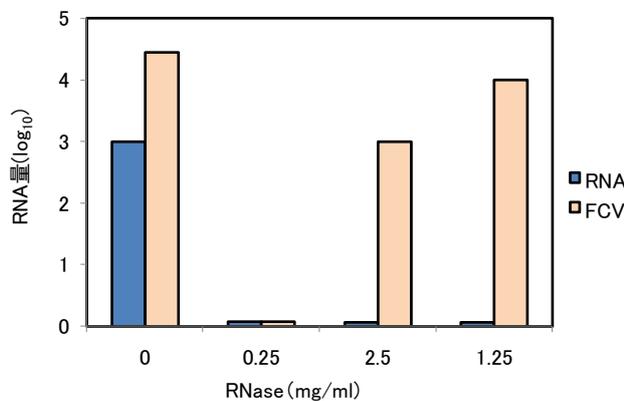


Fig. 2 RNaseの濃度に対する未処理のFCVとRNA

4 考察

4.1 OBS-12による不活性化

感染価が検出限界以下となったことから、FCVはOBS-12によって不活性化したことが示された。一方で、RNA量は3log検出された。よって、不活性化したFCVより溶出したRNAが溶液中で安定に存在していた、または不活性化したFCVのカプシド (ウイルスの殻) は形状を維持してその内部にRNAが安定して存在していたことが考えられる。

不活性化したFCVをRNA量より定量するためには、上述のRNAを分解する必要があると考えられる。

4.2 RNase処理の検討

RNaseの濃度が高いと定量を行うべきFCV内部より抽出したRNAも分解し、測定値は実際のRNA量よりも大幅に低下してしまったと考えられる。RNase処理の目的は、溶液中に溶出したRNAを分解し、不活性化されていないFCV内部のRNAのみを定量できるようにすることである。従って、RNaseは未処理のFCVに由来するRNAを分解せず、溶液中のRNAのみを分解する 1.25×10^{-4} mg/ml程度が好ましい濃度と考えられる。

5. 今後の方針

OBS-12と反応させたFCVを用いて、溶液中のRNA、および不活性化したFCVのカプシドの内部に存在すると推定されるRNAを分解し、感染能力を維持しているFCV中のRNAのみを定量可能とするRNase処理条件を見出していく。

5 参考文献

- 1) Erwin, et al, "Inactivation of Caliciviruses" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 4538-4543, (2004) vol.70, No.8
- 2) 戸部 聖一, 他, "漂白活性剤の示すカリシウイルス不活性化効果の特性" 日本防菌防黴学会, 第38回年次大会要旨集 pp. 80(2011)