

不活性化したカリシウイルスの感染価と Real-time RT-PCRにおけるRNA濃度との相関性の研究

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. 緒言

食中毒の原因となるノロウイルス (NV) の感染を予防するために、NV を不活性化させる必要がある。ウイルスに対する不活性化剤の効果は、細胞培養による感染価測定法から評価されている。NV は細胞培養系が確立していないため、同じカリシウイルス科に属するネコカリシウイルス(FCV) が代替ウイルスとして用いられ不活性化評価が行われている。しかし本評価法は代替ウイルスを用いていることや培養細胞の感染成立の有無によって判断するため、より信頼性が高く迅速な評価法が求められている。

Real-time RT-PCR は、ウイルス量の指標として RNA 量を測定するため、培養を行わなくてもウイルスの定量を可能とした。RNA 定量による不活性化評価の問題点は不活性化した FCV の RNA の残存であり、感染価と RNA 濃度の相関性が得られないことである¹⁾。Topping らは NV および FCV を熱による不活性化処理後、溶出した RNA を RNase 添加することで除去し、残存したウイルスの RNA を Real-time RT-PCR にて定量し、不活性化評価を行った²⁾。しかし本手法を用いた薬剤の不活性化評価の事例は少ない。

そこで本研究では、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) の、生成する有機過酸による不活性化効果を利用し、アルキル炭素鎖 6, 8, 10, 12 の OBS (OBS-6, 8, 10, 12) を用いて FCV を不活性化させ、培養細胞による感染価測定 (TCID₅₀ 法) と Real-time RT-PCR による FCV の RNA の定量を行い、感染価と RNA 濃度の相関性を評価する。

2. 実験

2.1 CRFK 細胞培養による FCV の増殖

本研究では FCV に F9 株 (ATCC 株 VR-782) を使用し、宿主細胞にネコ腎細胞(CRFK, ATCC 株 CCL-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、FCV を回収した。

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ない、Amicon Ultra-15 (Millipore)を用いて FCV を濃縮した。

2.3 FCV 不活性化

不活性化剤は、OBS-6,8,10,12を用いた。

各OBSと過炭酸ナトリウムを反応させて有機過酸を生成させ、FCV試料を添加し、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 法)を求めた。

2.5 RNase 処理

不活性化処理した FCV 溶液 200 μl に対して RNase を 1.25×10^{-4} mg/ml になるように加え 37°C で 30 min 反応させた。本 RNase 濃度は未処理の FCV 内部の RNA を分解せず、カプシドから溶出した RNA のみを分解する。

Study of the Correlation between Concentration of RNA by Real-time RT-PCR and Infectivity Titers in Inactivated Calicivirus

Marika HOSHI, Seiichi TOBE, Tomoe KOMORIYA, Kazuaki YOSHIMUNE 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 による不活性化

各アルキル炭素鎖長のOBSで10分間不活性化処理を行った結果をFig.1に示した。アルキル鎖が長くなると感染価は減少した。またRNase処理を行わなかった場合よりもRNase処理を行ったほうが、感染価とRNA濃度が近くなった。このことからRNase処理は重要であることが分かったためこれ以降のRNAの定量を行うFCVはRNase処理を行った。

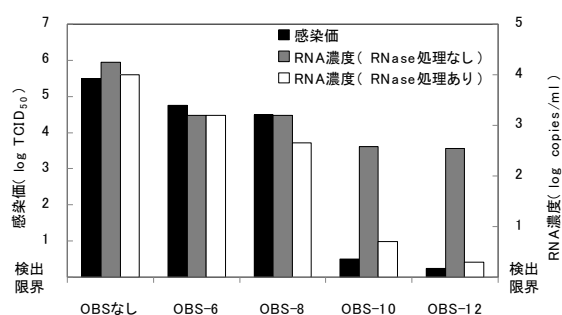


Fig. 1 OBS による FCV の不活性化と RNA 量

3.2 各 OBS によって不活性化した FCV の感染価と RNA 濃度の回帰直線と相関係数

各 OBS で FCV を 0-60 分間反応させ、その反応物の感染価と RNA 量を求めた結果を Fig. 2 に示した。OBS の不活性化効果の大きさを示すために、未反応の感染価から反応後の感染価の値を差し引いた値を Δ 感染価、そして同様に Δ RNA 濃度を求めた。各 OBS を反応させて Δ 感染価を高めていくと Δ RNA 濃度も高まった。

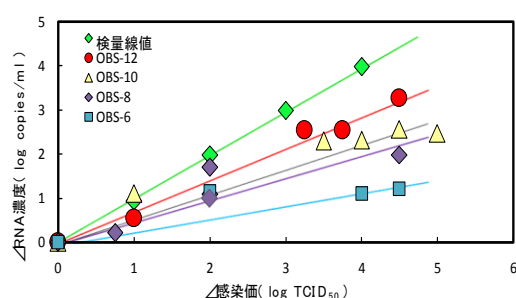


Fig. 2 OBS による不活性化された FCV の感染価と RNA 濃度の関係

Δ 感染価と Δ RNA濃度との関係に関して回帰直線と相関係数を求めTable 1に示した。各アルキル鎖で傾向は異なりアルキル鎖が長い程、回帰直線の傾きも相関係数も高まり、アルキル鎖が短い程回帰直線の傾きも相関性も低下した。

Table 1 回帰直線の傾きと相関係数

試料	傾き	相関係数
検量線値	0.994	0.999
OBS-12	0.722	0.995
OBS-10	0.568	0.966
OBS-8	0.509	0.905
OBS-6	0.302	0.858

4. 考察

4.1 RNase処理

不活性化によりカプシドが破壊されたFCVはRNase処理によりRNAは非検出となった。一方で、

カプシドが破壊されなかった場合、RNase処理によっても内部のRNAは残存し、不活性化されていないFCVとして検出される。このカプシドが破壊されなかったFCVによって Δ RNA濃度が下がり、傾きが小さくなったと考えられる。

4.2 各アルキル鎖のOBSによる不活性化

OBS-12は不活性化させたFCVのカプシドを良好に破壊していると考えられる。一方でOBSのアルキル炭素鎖長が短くなると、不活性化させたにも関わらず、カプシドの破壊が生じにくくなったと考えられる。

5. 参考文献

- 1) Erwin DuiZer et al. Applied and Environmental Microbiology 70, 4538-4543 (2004)
- 2) J.R. Topping et al. Journal of Virological Methods 156, 89-95 (2009)
- 3) Tobe et al. J. Oleo Science.61, 211-216 (2012)