

II-654

定量的RT-PCR法によるUV照射のウイルス不活化機構の解明

東京大学工学部	学生会員	片山浩之
横浜国立大学工学部	正会員	神子直之
東京大学工学部	正会員	大垣眞一郎

1. はじめに

近年の水処理手法の多様化の中で、大腸菌群など細菌レベルのモニタリングだけで微生物学的安全性を保障する現行の水質基準に疑問がでてきた。特に膜処理などを用いた水処理手法を施した水の微生物学的安全性を保障するためには、細菌レベルのみならずウイルスレベルのモニタリングが必要であると考えられる。

実際にウイルスをモニタリングするにはある程度短時間で測定する必要があるので、PCR法もしくはモデルウイルスの測定が有力な手段であると考えられる。いずれの場合でも直接ウイルスを測定する場合とは異なり、測定した結果がどういう病原性を代表しているかを評価する必要がある。特に水系の微生物学的安全性を評価するためには、消毒操作による病原性ウイルスの不活化をモニタリング結果からどのように評価するかが重要なポイントになると予想される。

そこで、本研究ではUV照射消毒によるウイルス不活化機構について実験した。実験に際しては、RNA大腸菌ファージQ β を用い、Q β の測定手段としてブラック法と定量的RT-PCR法を用いた。RT-PCR法においては不活化後のQ β をも陽性として検出する(片山ら、1994)ことを利用して、UV照射によるウイルス不活化機構に関して考察を加えた。

ここにRT-PCR法について簡単に説明を加える。PCRとは、任意のDNA断片を特異的・指数関数的に増幅する技術であり、DNAの検出・同定のための技法とされている。RNAに関してもRNAをDNAに転写する(RT, Reverse Transcription)ことによって同様に検出することが可能である。

2. 実験方法

実験装置は、UV照射装置は低圧水銀ランプ(100V, 0.34A)を用いた。内径60mm、深さ17mmのガラスシャーレに攪拌子を入れ、試料を満たして石英板で気泡が入らないように蓋をし、ランプから10cmの距離に静置してUVを照射した。UV照射の際には試料をスターラーによって攪拌する。試料に関しては、Q β 高濃度液は培養する際の養分等がUVを吸収するので、UVが透過するようにリン酸緩衝液(上水試験法 pp. 463)によって1000倍希釈したものを供試した。照射量は照射時間のみによって調節した。

UVを0分間、2分間、6分間、20分間および200分間照射した試料を、それぞれUV-0, UV-2, UV-6, UV-20, UV-200と呼ぶ。UV-0, UV-2, UV-6, UV-20についてはブラック法によってQ β 濃度を測定した。また、UV-0, UV-200については定量的RT-PCR法によってQ β 濃度を測定した。なお定量的RT-PCR法に関する詳細は、片山ら(1995)に示した。

3. 結果及び考察

ブラック法によるQ β 測定結果を表-1に示し、RT-PCR法を用いてQ β の検出結果を定量的に解析した結果を表-2に示した。また、表-1と表-2の結果から求めた生残率の自然対数をUV照射時間を図-1に示し、ブラック法の不活化係数と定量的RT-PCR法の不活化係数を比較した。

Q β のUV照射による不活化は一次反応であるとされているので、 $S = \exp(-kt) \cdots (1)$ と表される。
 S : 生残率(t分後のQ β 濃度/Q β 初期濃度)、 k : 不活化係数[1/min]、 t : UV照射時間[min]

表-1よりブラック法のQ β 不活化係数を求めると、6分～20分より $k = 0.38$ [1/min]、0分～20分より $k = 0.54$ [1/min]となる。

表-2よりRT-PCR法のQ β 不活化係数を求めると、 $k = 0.014$ [1/min]となる。

表-1 ブラック法による
Qβ測定結果

サンプル	PFU/ml
uv-0	2.7×10^7
uv-2	2.0×10^6
uv-6	9.6×10^4
uv-20	5.0×10^2

表-2 定量的RT-PCR法のQβ測定結果

サンプ ル	希釈倍率ごとの陽性検出率							MPN	95%信頼限界	
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷		Min	Max
UV-0	1/1	1/1	1/1	5/5	5/5	2/5	1/5	23	7.5	73
UV-200	2/2	5/5	5/5	5/5	0/5	2/5	-	1.4	0.48	4.3

分数は試験したサンプル数と陽性検出数を示す。
4/5とは5本のサンプル中4本が陽性であったことを示す。

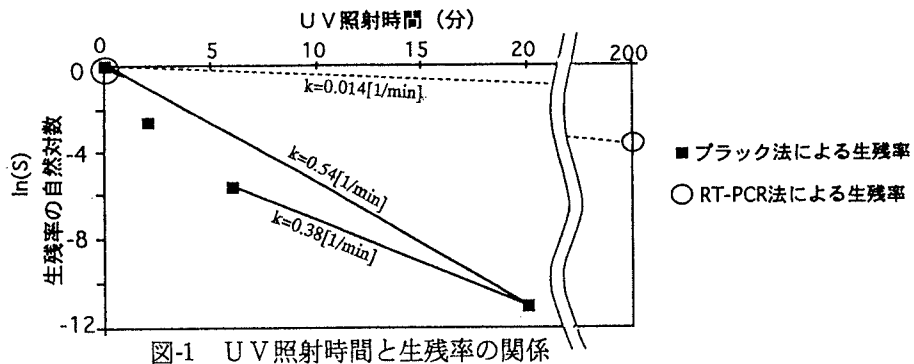


図-1 UV照射時間と生残率の関係

ここで、ブラック法とRT-PCR法のk値にこのような差が生じる理由に関する考察を以下に示す。

UV照射によるQβの不活化機構として、QβのRNA中に隣接して存在するウラシルが結合してウラシルダイマーが生じ、RNAに損傷が生じて感染力を失うという考え方が一般的である。

ここに1ヒットモデルを仮定する。ヒットとはUVによるウラシルダイマー生成のことであり、まったくのでたらめに起こる。QβRNAの全塩基配列4200bp中には隣接してウラシルが存在する部位は121個あり、ウラシルダイマーが生じるとQβのブラック形成能力が失われる。QβRNAのうちPCR反応に用いるプライマーによって挟まれる塩基配列150bp中にウラシルが隣接して存在する部位は4個あり、ウラシルダイマーが生じるとRT-PCR法によって検出されなくなる。

標的論より、標的数あたりの平均のヒット数をλとすると

$S = \exp(-\lambda) \cdots (2)$ と表される。λに関しては、ブラック法の標的(121個)はRT-PCR法の標的(4個)の30(=121/4)倍であるから、(1)式におけるk値も30倍になると想定される。RT-PCR法のk値の30倍は0.42[1/min]であり、ブラック法のk値の実測値(0.38[1/min]から0.54[1/min])にほぼ対応する。

4. まとめ

QβをUV照射により不活化した場合、ブラック法による測定に基づく不活化係数と定量的RT-PCR法による測定に基づく不活化係数に大きな違いがみられたが、不活化の機構としてウラシルダイマー生成を考えると両者の相違を説明できることがわかった。

参考文献

- 片山、神子、大垣： 紫外線によって不活化されたファージのPCR法による検出
第28回日本水環境学会年会講演集 pp.494-495 1994
- 片山、神子、大垣： RT-PCR法による水中の大腸菌RNAファージの定量的測定
第29回日本水環境学会年会講演集 pp.210 1995