

(11) UV照射により不活化されたRNAファージのRT-PCR法による定量

Quantitation of RNA coliphage inactivated by UV radiation using RT-PCR method

片山浩之* 大瀧雅寛* 大垣真一郎*

KATAYAMA Hiroyuki*, OTAKI Masahiro*, OHGAKI Shinichiro*

Abstract; PCR (polymerase chain reaction) is a useful method for viral monitoring because of its high sensitivity and short time detection. However, disadvantages of PCR method for viral monitoring are pointed out to be lack of quantification and no differentiation of infectious viruses from noninfectious viruses. MPN method using RT(reverse transcription)-PCR was applied for enumeration of RNA coliphage Q β , and nested PCR was applied to promote the sensitivity of RT-PCR. This method gave consistently the same order of values with plaque assay with double agar layer (host: *E.coli* K12 F⁺ A/ λ). The authors developed "long RT-short PCR method", which demands a longer RT region to be detected. The RT region was 1909bp, while total RNA of Q β is 4217bp. This method was also applied to Q β disinfectant by UV radiation which had no plaque forming ability. The results gave the same value with the MPN value of Q β sample which was not inactivated with UV radiation. These results were analyzed with one hit model.

KEYWORDS; RT-PCR, RNA coliphage, UV radiation, MPN method, long RT region

1. はじめに

水の微生物学的安全性に関しては大腸菌群、糞便性大腸菌群、一般細菌のモニタリングが義務づけられているが、それだけでは水系感染性のウイルスのリスクを正當に評価できていないことが指摘されている。ウイルスを培養することなくウイルスをモニタリングする方法の一つに、ウイルスの遺伝子を遺伝子工学的手法により検出する方法がある。中でもPCR法(特定遺伝子を増幅して検出する技法)は、高感度、短時間かつ安全な検出手法なので、ウイルスモニタリング手法として有望である。しかしながら、PCR法は定量性の欠如と不活化ウイルスを誤陽性と判定する欠点が指摘されている¹⁾。様々な消毒剤を用いて不活化したウイルスをPCR法で測定した研究²⁾では、定性的な知見しか得られていない。

本報告は、PCR法における定量性および不活化されたウイルスに対する検出の誤陽性の問題を扱った研究の成果である。手法の開発のため、取扱いが容易で情報が豊富であり、さらに活性のあるウイルス粒子数を容易に測定できるという利点を備えたファージQ β を用いた。

第一段階として、逆転写(RT)-PCR(増幅産物の長さは193bp)についてネステッドPCRをかけることにより、特異的かつ高感度でQ β の検出が可能であることを示した。その検出結果から得たMPN値をPFU値(溶菌斑数)と比較し、Q β 濃度のPCR法による定量を試みた。この定量法のことを本報告ではnormal RT-PCR定量法と呼ぶことにする。

第二段階として、逆転写領域を長く(1000-2000bp)設定し、PCRの増幅領域は通常の長さのRT-PCR法を開発した。この手法を本報告においてはlong RT-short PCR法と呼び、その検出結果からMPN値を得る手法をlong RT-short PCR定量法と呼ぶことにする。long RT-short PCR定量法の詳細については「2.5 long RT-short PCR定量法」において説明する。長い逆転写領域を持つこの手法を開発した目的は、「不活化され

*東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻

(Department of Urban Engineering, Faculty of Engineering, University of Tokyo)

たQ β がRT-PCR法で誤陽性になる理由は、標的部位のRNAには損傷ないからなのか、たとえ標的部位に損傷があっても逆転写反応がそのまま進むからなのか」を調べるためである。なお、長いRNAを調べる方法として、長い増幅領域を持つRT-PCR法とこのlong RT-short PCR法を比較した著者らの予備実験では、long RT-short PCR法の方がQ β を高感度で検出することができたので、ここではlong RT-short PCR法を用いている。

第三段階として、long RT-short PCR定量法およびRT-PCR法の特性を明らかにする試みとして、遺伝子損傷作用のあるUV照射消毒をウイルス不活化手法として選び、long RT-short PCR定量法およびnormal RT-PCR定量法によって、不活化後のQ β を定量した。加えて、PCR法自体のプロセスのうちのRNA抽出(90℃)中に、RNAの損傷が修復される心配があるので、あらかじめ抽出しておいたRNAにUV照射した液をlong RT-short PCR定量法に供した。以上の実験結果を考察し、不活化ウイルスを誤陽性と判定する問題について検証した。

2. 実験方法

2.1 対象ウイルス

大腸菌RNAファージQ β は、ブラック法によって活性のあるビリオンの濃度が容易に測定でき、物理化学的性質および遺伝子配列に関する情報が豊富であることから、モデルウイルスとしてQ β を用いた。Q β は、①RNA一本鎖を持ち、②サイズが小さく(20~30nm)、③エンベロープを持たないという物理化学的性質をもつが、この3つの性質は水系感染性ウイルスの多く(特にピコルナウイルス科)に共通している。そのため、水系感染性ウイルスの水処理システム内での挙動を推測するためのモデルウイルスとしてQ β は適している。

2.2 Q β 高濃度液の調製³⁾

古瀬浩介博士(当時東海大学医学部)より分与された大腸菌ファージQ β をモデルウイルスとして用いた。宿主菌としては*E.coli* K12 A/ λ (F⁺)を用いた。対数増殖期の宿主菌入り培地に単一のブラックから得たQ β を入れ、37℃で18~24時間培養し、公称孔径0.45 μ mのフィルターでろ過したろ液をQ β 高濃度液として実験に供試した。

2.3 ブラック法によるQ β の定量³⁾

(1) 0.1ml法および1ml法

ブラック法によるQ β の定量は、基本的には既報と同じ方法⁴⁾(重層寒天法)によった。滅菌済みシャーレに10ml程度の寒天培地を注いで下層培地を作り、この上に10段階希釈した試料0.1mlと上層培地4mlを全面に注いで静置、凝固させた後、37℃で18~24時間培養してブラックを計数した。その際、上層培地は、予め45~50℃に保温し、対数増殖期の宿主菌0.25mlを入れ攪拌しておく。なお、Q β 濃度10~200PFU/mlの場合は、含水量を減らした上層培地*を用い、試料1mlからのブラック数を測定した。ただし、Q β 濃度がさらに低い(10PFU/ml以下)と予期される試料に対しては、次に示す30ml定量法を用いて測定した。

(2) 30ml定量法

0.1ml法に用いる上層寒天培地の2倍濃度の培地を30ml用意し、48℃に保温する。この中に指数増殖期の宿主菌3mlを入れて攪拌した後、試料30mlを加えてゆるやかに攪拌する。直ちにこれをシャーレ6~8枚に約10mlずつ注ぎ、静置、凝固させた後、37℃で18~24時間培養してブラック数を計数し、その合計を

* 4ml中に含まれる培地成分を変えずに水量を3/4倍にしておき、3mlを1枚のシャーレに用いる。

30ml 中のブラック数で表す。なお、30ml 定量法において通常の方法と同等のプレート効率を得られることは実験によって確認済みである。本法は 100ml 単層寒天法⁹⁾を Q β 用および 30ml 用に改良したブラック法である。

2.4 normal RT-PCR 定量法

温度制御には DNA Thermal Cycler model PJ2000 (Perkin Elmer 社製)を用いた。その際、試料はすべて 0.5ml マイクロチューブにて反応に供した。

(1) RNA抽出法

Q β の RNA は直接加熱法により抽出した。0.5ml マイクロチューブに試料を 100 μ l とり、90℃で 10 分間加熱した。Q β のカプシドタンパクを高熱変性によって破壊することにより Q β RNA を抽出した。

(2) プライマー

逆転写反応にはプライマー setI⁻、PCR 反応には setI⁻と setI⁺を用いた。プライマー setI⁻は、Q β RNA 複製酵素をコードしている領域の 3'末端近傍を増幅し、増幅産物の長さは 193bp である。プライマー setII⁻は、プライマー setI⁻によって挟まれた内部の領域を増幅するプライマーであり、増幅産物の長さは 102bp である。Q β RNA 複製酵素は F 特異 RNA 大腸菌ファージのグループ III に特異的である⁹⁾。プライマー setI⁻、setII⁻の塩基配列は以下の通り。

setI⁻ : 5'TTTATTCAACAATTAGGCGCCAT3', setI⁺ : 5'CCATCGATCAGCTTATCTGTA3',
setII⁻ : 5'CTCGTGTAGAGACGCAACCTT3', setII⁺ : 5'GTCTACCGCAAATTCGATAT3'.

(3) 逆転写反応

直接加熱で得られた RNA 3 μ l を 17 μ l の RT ミックスに加えた。その上をミネラルオイル約 40 μ l で覆い、42℃で 30 分間維持した後 99℃で 3 分間加熱した。逆転写反応液の最終濃度は以下の通り。総量 20 μ l 中、10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KCl, 5mM MgCl₂, 1.0mM dNTPs, 1.0 μ M primer setI⁻, および 0.25U/ μ l AMV Reverse Transcriptase XL.

(4) PCR 反応

逆転写反応後のそれぞれのチューブに PCR ミックスを加え、総量 100 μ l とした。反応温度は、95℃3 分のあと、95℃30 秒、50℃30 秒、72℃30 秒を 1 サイクルとして 25 サイクルの温度変化を与え、続いて 72℃で 5 分間維持した後に 4℃で保存し、次のネステッド PCR に供した。なお、直ちにネステッド PCR を実施しない場合は -20℃にて保存した。PCR 反応液中の各組成の最終濃度は以下の通り。10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.0mM dNTPs, 0.2 μ M primer setI⁻, 0.2 μ M primer setI⁺, および 0.025U/ μ l Taq polymerase.

(5) ネステッド PCR 反応

PCR 反応液と同じ組成の緩衝液を作成し、50 μ l ずつチューブに分注した。ただし、用いるプライマーは setII⁺と setII⁻である。それぞれのチューブに PCR 反応後の溶液を 5 μ l ずつ注入した。反応温度は PCR 反応と同じで、サイクル数は 30 とした。

(6) 増幅結果の判定法

PCR 反応産物をゲル電気泳動にかけ、エチジウムブロマイド染色と UV エルミネイターにより感光し、102bp のバンドを Q β 陽性と判定した⁷⁾。

(7) PCR 検出結果の定量化

MPN* 法を用いて PCR の検出結果を定量化した。MPN 値は 3 段階もしくは 4 段階の 10 倍希釈 5 本法

* 最確数。検体数と検出結果から推定される。

の検出結果からコンピュータープログラム⁸⁾より算出した。

2.5 long RT-short PCR 定量法

long RT-short PCR 定量法の実験方法は、「(1)RNA抽出法」、「(3)逆転写反応」、「(6)増幅結果の判定法」、「(7)PCR検出結果の定量化」については、「2.4 normal RT-PCR 定量法」と同じである。「(4)PCR反応」では、primer setI+のかわりに primer setIII+と primer setIII-を用いた。「(5)ネステッドPCR反応」では、primer setII+と primer setII-のかわりに primer setIV+と primer setIV-を用いた。プライマー setIII は、Q β RNA複製酵素をコードしている領域の5'末端近傍を増幅し、増幅産物の長さは244bpである。プライマー setVI は、プライマー setIII によって挟まれた内部の領域を増幅するプライマーであり、増幅産物の長さは141bpである。プライマー setIII、setIV の塩基配列は以下の通り。

setIII- : 5'AGAGTTAAATGGCGACTGACCAT3'

setIII+ : 5'GTGCCATACCGTTTGACTTCACT3'

setIV- : 5'GTGCGAGGTTACCTTCAACCT3'

setIV+ : 5'CAAGCCGTGATAGTCGTTCT3'.

なお、増幅結果の判定方法は、「2.4(6)増幅結果の判定法」と同じであるが、141bp にバンドが現れたことをもってQ β 陽性と判定した。

long RT-short PCR 定量法のうち、逆転写反応とPCR法の概略を図1に示す。逆転写反応は primer setI- から始まり、cDNA が合成される。

primer setIII を用いたPCR反応の増幅領域は、逆転写反応の開始点から1909bp 離れたところにある。逆転写反応とPCR反応のプライマーをこのように適用することによって、long RT-short PCR 法で陽性と検出されれば、図1中の「Region confirmed through which cDNA was synthesized」と記した領域のRNAはすべてcDNAに逆転写されていたことがわかる。

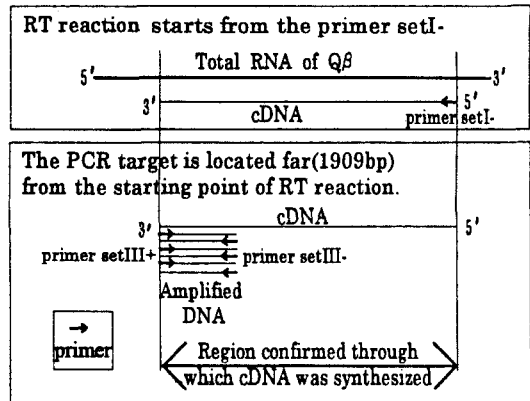


Fig.1 Outline of long RT-short PCR

2.6 UV照射

Q β 高濃度液0.5mlを滅菌 Milli-Q 水200mlに加えたものを原試料とした。内径5.6cmのガラスシャーレに原試料を35ml加え、15Wの低圧水銀ランプから10cmの距離に静置した。UV照射中はスターラーによって試料を攪拌し、試料は自由水面を形成している。原試料の260nm吸光度は0.15cm⁻¹であり、試料の水深が1.46cmであることから、UVは試料内部に十分照射されている。試料内部への平均紫外線照射強度はQ β の生残率から算出した⁹⁾。なお、この実験装置では、石英板で水面を覆ってUVを照射した場合のQ β 不活化速度(0.66[log/min])と自由水面でUVを照射した場合のQ β 不活化速度(0.63, 0.64, 0.67[log/min])は等しく、自由水面でのUVの反射による照射効率への影響は十分小さいことを確認した。

2.7 抽出RNAのUV照射

2.4の(1)のRNA抽出操作により、Q β 高濃度液からRNAを含む液を得た。その液を滅菌 Milli-Q 水で400倍に希釈してUV照射に供した。UVの照射条件は「2.6 UV照射」と同じである。初期サンプルとUV照射15分の試料を、long RT-short PCR 定量法(ピリオンではなくRNAを対象としているので2.4(1)のR

* 1分あたりの不活化量。1log/min は、1分間で90%の不活化を表す。

NA抽出操作はここでは行わない)で測定し、UV照射によるRNAの損傷が、RNA抽出の際の90℃において修復されてしまう可能性について調べた。

3. 実験結果

3.1 検出感度に関する実験結果

培養したQ β を対象として、normal RT-PCR 定量法による MPN 値および long RT-short PCR 定量法による MPN 値をブラック数とそれぞれ比較した。実験結果は、表 1 に各希釈段階のサンプル数とそのうちの陽性検出結果として分数の形で示している。表中の MPN/PFU とは MPN 値をそれぞれの試料の PFU 値で割った値である。upper および lower とは、MPN 値の 95%信頼区間の上限値および下限値を PFU 値で割った値を示している。

normal RT-PCR 定量法における MPN/PFU 比は、0.26 から 0.36 (平均 0.34、標準偏差 0.047) の値を示した。この結果から、normal RT-PCR 定量法は、ブラック法の PFU 値の約 1/3 の値を再現性よく与える定量方法であることがわかった。

一方、long RT-short PCR 定量法における MPN/PFU 比は 0.01 から 0.16 の値を示した。この結果は、long RT-short PCR 定量法が、検出感度および安定性の点で normal RT-PCR 定量法に比べてやや劣ることを示している。ただし、「4. 考察」では、この方法で得られる Q β 濃度を対数で評価しているので、long RT-short PCR 定量法は有効な定量方法であるといえる。

Table 1. Ratio of MPN value and PFU

	trial	¹⁾ 10 ⁻⁵	¹⁾ 10 ⁻⁶	¹⁾ 10 ⁻⁷	¹⁾ 10 ⁻⁸	MPN/ml	²⁾ MPN/PFU	³⁾ upper	³⁾ lower
normal RT-PCR	1	5/5	5/5	3/5	-	3.1×10 ⁹	0.26	0.82	0.080
	2	5/5	5/5	4/5	0/5	4.3×10 ⁹	0.36	1.0	0.13
	3	5/5	5/5	5/5	1/5	1.2×10 ¹⁰	0.33	0.94	0.11
	4	5/5	5/5	4/5	1/5	5.7×10 ⁹	0.36	0.96	0.14
long RT- short PCR	5	5/5	2/5	0/5	0/5	1.6×10 ⁸	0.01	0.031	0.0033
	6	5/5	3/5	0/5	-	2.6×10 ⁸	0.022	0.067	0.0073
	7	5/5	5/5	4/5	1/5	5.8×10 ⁹	0.16	0.41	0.061

1) Dilution factor.

2) Ratio of PCR determination and plaque assay of Q β . The Q β concentration was 1.2×10¹⁰ PFU/ml for trial 1, 2 and 6, 3.6×10¹⁰ PFU/ml for trial 3 and 7, and 1.6×10¹⁰ PFU/ml for trial 4 and 5.

3) 95% confidence limit of MPN/PFU.

3.2 long RT-short PCR 定量法のプライマー特異性に関する検証

long RT-short PCR 定量法では、逆転写反応で転写される逆転写領域の長さが重要であり、転写の際に鋳型となる RNA に損傷がなかったことを確かめる点に意味がある。実際に逆転写反応が行われた長さを知るためには、設定したプライマーに特異的な部位を逆転写反応の開始点として合成された cDNA のみを、PCR において検出していることを確認する必要がある。そこで、プライマー setI- に特異的な部位を開始点として逆転写されるもの以外の cDNA の合成により、誤って陽性と判定されるバックグラウンドを測定した。

9 種類の異なる逆転写反応を Q β 高濃度液の希釈列に対して行い、それぞれに対して同一の条件の PCR から得られる検出感度を測定した。PCR ではすべてプライマーとして setIII を使い、ネステッド PCR ではプライマー setIV を使用した。これらのプライマーは long RT-short PCR 法で用いる PCR 用プライマーと同じである。

逆転写の実験方法および実験結果を表2に示す。Method of RT reaction には、逆転写反応に用いたプライマーを記した（ただし、逆転写反応をしていない①の実験はのぞく）。Sensitivity [PFU/tube]とは、RT-P CR法に用いた試料3 μ l 中に存在するQ β のPFU値であり、その1/10量では検出されなかったことを示している。希釈列におけるQ β の最大量は10⁷PFU/tubeであり、希釈列のすべてにおいてQ β が検出されなかった場合は「>10⁷」と表記した。

①では逆転写反応を行わずにQ β RNAに対して直接PCRをかけた。逆転写反応によらずに検出されてしまうバックグラウンドは、10⁵PFU/tubeであることがわかった。ただし、long RT-short PCR 定量法では十分希釈された試料を用いるので、そのQ β 濃度領域ではバックグラウンドからの検出はないといえる。

②ではプライマーを加えないで逆転写反応操作を行い、その反応液でPCRを行った。Q β RNA自身が二次構

造をとってRNA同士がアニーリングし、そこが自己プライマーの役割を果たして逆転写反応が開始される可能性を調べた。10⁶ という検出感度は①の結果（10⁵）とあまり差がないといえる。従って、自己プライマー由来のcDNAは十分少量であり、long RT-short PCR 定量法の測定結果に対して影響を与えないといえる。

③から⑦ではQ β RNAに相補的でない5種類のプライマーを加えてそれぞれ逆転写反応を行い、その反応液でPCRを行った。非特異的プライマーとはQ β RNAに対して相補的でないプライマーである。これらの実験により、プライマーが逆転写反応において非特異的にQ β RNAにアニーリングし、逆転写反応が非特異的に開始される可能性について調べた。すべての非特異的プライマーにおいて、検出感度は10⁵PFU/tube 以上であった。従って、プライマーが相補的でない場合は逆転写反応がほとんど起こっていないことがわかる。

⑧ではlong RT-short PCR 定量法のPCRに用いるプライマー（setIII-）を逆転写反応にも用いた。この方法（逆転写にsetIII-、PCRにsetIII、ネステッドPCRにsetIV）は、normal RT-PCR 定量法のターゲット部位を変更し、その他はすべてnormal RT-PCR 定量法と同じ条件になる。この方法の検出感度はnormal RT-PCR 定量法の検出感度とほぼ同等であった。この結果より、PCRに用いるプライマーがsetIII、setIVに変わることによって検出感度が変わることはないことがわかった。

⑨ではlong RT-short PCR 法、すなわち逆転写反応にプライマー-setI-を用い、PCRにはプライマー-setIII、setIVを用いている。検出感度はnormal RT-PCR 定量法より1log* 程度低い。③～⑦の実験結果と⑨の結果の比較から、逆転写反応にプライマー-setI-を用いるlong RT-short PCR 定量法において合成されるcDNAのうち、プライマー-setI-が非特異的にアニーリングして合成されるcDNAは十分少量であると推定できる。

以上①から⑨の結果から、long RT-short PCR 定量法ではプライマー-setI-が特異的にアニーリングした部位から少なくともプライマー-setIIIの領域まで合成されたcDNAを検出していることが確かめられた。

3.3 UV照射されたQ β の検出

* 一桁。検出感度が10倍異なることを示す。

Table 2. Comparison of sensitivity among various RT methods

	Method of RT reaction	Sensitivity [PFU/tube]
①	no RT reaction	10 ⁵
②	without primer	10 ⁶
③	non-specific primer A	>10 ⁷
④	non-specific primer B	>10 ⁷
⑤	non-specific primer C	10 ⁵
⑥	non-specific primer D	10 ⁵
⑦	non-specific primer E	10 ⁵
⑧	primer for short RT	0.2
⑨	primer for long RT	10

図2にブラック法を用いて測定したUV照射によるQβ不活化曲線を示す。縦軸はQβ濃度を示し、横軸はUV照射時間を示している。UV照射30分のブラック法は検出限界以下のため検出できなかった。なお、ブラック法の検出限界以下とは、30ml中にブラックがなかったことを示す(<0.03PFU/ml)。黒丸のnormal RT-PCRとは、normal RT-PCR定量法によって得られた1mlあたりのMPN値である。また、白丸のlong RT-short PCRとは、long RT-short PCR定量法によって得られた1mlあたりのMPN値である。

UV照射15分までのブラック法のQβ生残曲線の傾きから、試料内部の平均UV照射線強度は $113\mu\text{W}/\text{cm}^2$ と算出された。UV照射15分の照射線量は $102000\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ 、UV照射30分の照射線量は $204000\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ であった。

normal RT-PCR定量法によるQβのMPN値は、原試料に対して $5.7\times 10^6/\text{ml}$ 、UV照射15分の試料に対して $5.7\times 10^6/\text{ml}$ 、UV照射30分の試料に対して $1.1\times 10^6/\text{ml}$ であった。MPN法の95%信頼区間は $\pm 0.5\log$ であることを考慮すれば、これらの値はほぼ等しいといえる。

long RT-short PCR定量法によるQβのMPN値は、原試料に対して $1.6\times 10^6/\text{ml}$ 、UV照射15分の試料に対して $1.1\times 10^6/\text{ml}$ 、UV照射30分の試料に対して $1.1\times 10^6/\text{ml}$ であった。これらの値もほぼ等しいと考えられる。

この実験結果の意味については、4.考察において詳しく説明する。

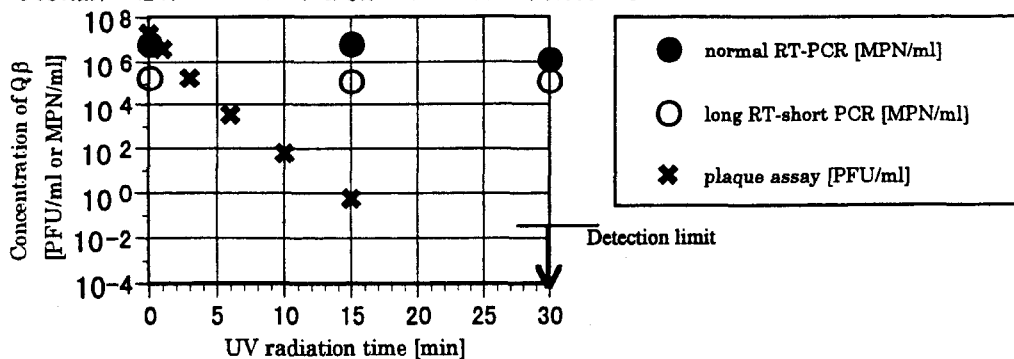


Fig.2 Comparison between PCR and plaque assay for RNA phage disinfected by

3.4 抽出RNAのUV照射実験

Qβ RNAを抽出してUVを照射する実験では、UV照射後にRNA抽出を行わずに逆転写反応がすすめられるので、RNA抽出操作の90℃で損傷RNAが修復される可能性のないQβ RNAをRT-PCR法で検出することができる。

UV照射前の試料およびUV照射15分の試料をそれぞれlong RT-short PCR定量法にかけ、そのMPN値(4段階5本法)を求めた。UV照射前の試料のMPN値は $3.6\times 10^7/\text{ml}$ 、UV照射15分の試料のMPN値は $1.1\times 10^7/\text{ml}$ であった。UV照射前とUV照射15分の試料のMPN値はほぼ等しいと考えられ、この傾向はQβのビリオンを使った図2の白丸で示された傾向と同じである。

UV照射後にRNA抽出をしてもなくても、UV照射前後のMPN値が同じ傾向を示すことから、90℃のRNA抽出は、損傷RNAを修復していないと考えられる。したがって、図2の白丸および黒丸の値は、90℃のRNA抽出によって損傷RNAが修復されたことに起因して得られた値ではないといえる。

4. 考察

UV照射によるファージおよびウイルスの不活化は、ファージのRNA(もしくはDNA)にウラシルダイマー等の二量体を形成することによって生じるとされている。また、二量体が1ヒットモデルに従って形

成されると仮定して、UV照射時間とQβ生残率の関係が一次反応に従うことを説明できる。この1ヒットモデルの標的はファージの全RNAである。ここでは、標的を細分化し、RNAの小片を標的とみなす1ヒットモデル（ヒット＝二量体の形成）を用いる。

新たな仮定として、二量体が逆転写領域に存在すれば、RT-PCR法で検出されないこととする。この仮定下においても、RT-PCRのターゲット部位以外の場所でQβのRNAに二量体が生じた場合には、ブラック形成能がないにも関わらずPCR法では検出されるという結果になる。この仮定とRNAの小片を標的とみなす1ヒットモデルを組み合わせたものを、ここでは「1ヒット・逆転写阻害モデル」と呼ぶことにする。

標的論より、次の式が成り立つ。

$$S = \exp(-\lambda) \quad \text{—————(1)}$$

S：生残率、λ：標的あたりの平均のヒット数＝全ヒット数／標の数

ここで標の数とは、例えば標的の大きさがQβRNAの1/20の場合、Qβ1個あたり標的が20個あるとみなし、標の数はQβの個体数の20倍になる。より一般的には、

標の数＝Qβの個体数 × (Qβの全RNA長／ターゲットのRNA長)

と表される。λは標の数に反比例し、標の数はターゲットのRNA長に反比例することから、λの値はターゲットのRNA長に比例することになる。測定方法の違いとターゲットのRNA長を表3に示した。methodに測定方法、length of the targetには検出に要するRNAの長さ（ターゲットのRNA長）、ratio to the total Qβ RNAには、ターゲットのRNA長のQβの全RNA長に対する比をそれぞれ示している。

Table 3. Length of the targets		
method	length of the target[bp]	ratio to the total Qβ RNA
plaque assay	4217	1
normal RT-PCR	193	1/22
long RT-short PCR	1909	1/2.2

normal RT-PCR 定量法及び long RT-short PCR 定量法によって測定する場合には、λ値はブラック法によって得られるλ値のそれぞれ1/22(193/4217)倍および1/2.2(1909/4217)倍の値をとることがわかる。

一方、1ヒットモデルの不活化反応は一次反応であるから

$$S = \exp(-kt) \quad \text{—————(2)}$$

ここでkは反応定数、tは時間[分]である。(1)式と(2)式を比較して明らかなようにkt値はλ値に等しい。ゆえにλ値に対する考察はkt値にも適用できるので、normal RT-PCR 定量法及び long RT-short PCR 定量法によって測定されるみかけのk値はブラック法によって得られるk値のそれぞれ1/22倍および1/2.2倍となることが予想される。図2から得られたブラック法によるk値は1.15であるから、normal RT-PCR 定量法および long RT-short PCR 定量法によって測定されるk値は0.05および0.52であると算出される。

normal RT-PCR 定量法に対しては、以上の1ヒット・逆転写阻害モデルから導かれる推論から、不活化量は、UV照射15分においては0.3log、UV照射30分においては0.7logと計算される。一方、UV照射15分において実測された不活化量は0.0log（UV照射15分の試料と初期試料のMPN値が同じ）、UV照射30分において実測された不活化量は0.72logであった（図2）。なお、MPN値の95%信頼区間はほぼ±0.5log（表1）であることから、0.72logの不活化量が、1ヒット・逆転写阻害モデルにそって得られた値であるか、もしくはMPN法の誤差範囲内の変動として現れたのかは断定できない。

一方、long RT-short PCR 定量法に対しては、1ヒット・逆転写阻害モデルから導かれるk値から得られる不活化量は、UV照射15分において3.4log、UV照射30分において6.8logと計算される。しかしながら、UV照射15分、UV照射30分での実測された不活化量はともに0.17logであった（図2）。1909bp

という長い逆転写領域を用いたことにより、実測された不活化量にたいして、1 ヒット・逆転写阻害モデルは過大な不活化量を算出していることになる。ゆえに、1 ヒット・逆転写阻害モデルの仮定に誤りがあることがわかる。この考察から、normal RT-PCR 定量法において実測された不活化量は、1 ヒット・逆転写阻害モデルにそって得られた値ではなく、MPN 法の誤差範囲内の変動として現れていたことがわかった。

1 ヒット・逆転写阻害モデルの仮定の中で、誤りは、「UV 照射によって二量体が形成されれば RT-PCR によって検出されない」という仮定である。UV 照射によってウラシルダイマー等の二量体を有する損傷 RNA は、逆転写反応において cDNA に転写されていることが分かった。この際、二量体の部位を正確には転写していない可能性があるが、次のステップの PCR 反応においては、プライマー対に挟まれた領域の長さしか問題とならないので、RT-PCR 法の結果としては、陽性と判定されることになる。

以上の結果から、ウイルスの RNA を逆転写反応によって cDNA を合成し、cDNA を PCR 法で増幅するウイルス検出手法においては、UV 照射によって不活化されたウイルスを陽性として検出することになるといえる。したがって、RT-PCR 法は、UV 照射で不活化された水中 RNA ウイルス濃度を過大に評価するおそれがある。すなわち、RT-PCR 法は、UV 照射消毒された水の微生物学的安全性を評価するためのモニタリング手法としては、限界があるといえる。

5. 結論

- (1) 培養した大腸菌 RNA フェージ Q β を対象とした場合、RT-PCR 法の検出結果に MPN 法を適用した方法は、ブラック法の PFU 値の約 1/3 の値を再現性よく与える定量方法であることがわかった。
- (2) 比較的長い RNA (1909bp) を逆転写する long RT-short PCR 定量法を開発した。
- (3) long RT-short PCR 定量法を用いて実験した結果から、UV 照射によりウラシルダイマー等の二量体が形成されても、逆転写反応はそこで停止せずに cDNA を合成し続けることが明らかとなった。したがって、UV 照射によって不活化された RNA ウイルスのほとんどが陽性として検出されることになる。
- (4) RT-PCR 法は、UV 照射で不活化された水中 RNA ウイルス濃度を過大に評価するおそれがあり、UV 照射消毒のモニタリング手法としては限界がある。

参考文献

- 1) Alexander L. M. and Morris R. (1991) PCR and Environmental Monitoring ---- The Way Forward?, *Wat. Sci. Tech.*, 24, No.2, pp. 291-294.
- 2) Ma J. F., Straub T. M., Pepper I. L. and Gerba C. P. (1994) Cell Culture and PCR Detection of Poliovirus Inactivation by Disinfectants, *Appl. Environ. Microbial.*, Vol. 60, No.11, pp.4203-4206.
- 3) 神子直之、大垣眞一郎 (1993) 環境微生物工学研究法、技報堂出版、土木学会衛生工学委員会編、pp.233-236, pp.309-312
- 4) 大垣眞一郎、Ketratanakul A., 橋本光雄 (1989) 生活環境中に存在する大腸菌フェージの定量, 浄化槽研究, 1, 1, p.19
- 5) Grabow W.O.K. and Coubrough P. (1986) Practical Direct Plaque Assay for Coliphage in 100ml Samples of Drinking Water, *Appl. Environ. Microbial.*, Vol. 52, No.3, pp.430-433.
- 6) Danteravanich S. (1992) Application of polymerase chain reaction for health-related viral indicators detection in wastewater, Doctoral dissertation, The Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan.
- 7) Sunun L., Kamiko N. and Ohgaki S. (1995) Application of polymerase chain reaction to detect coliphage Q β in environmental water sample, *Wat. Sci. Tech.*, 31, No. 5-6, pp. 383-390.
- 8) Hurley M.A. and Roscoe M.E. (1983) Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series, *Journal of Applied Bacteriology*, 55, pp159-164.
- 9) Kamiko N. and Ohgaki S. (1989) RNA coliphage Q β as a bioindicator of the ultraviolet disinfection efficiency, *Wat. Sci. Tech.*, 21, No.3, pp. 227-231.