

(50) 培養できない腸管系ウイルスの不活化評価 を目的とした外殻タンパク質酸化傷害 検出手法の開発

佐野 大輔^{1*}・Rosa M. Pintó²・大村 達夫³・Albert Bosch²

¹北海道大学大学院工学研究科環境創生工学専攻 (〒060-8628 北海道札幌市北区北13条西8丁目)

²バルセロナ大学生物学部微生物学科 (Av. Diagonal, 645, 08028, Barcelona, Spain)

³東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06)

* E-mail: dsano@eng.hokudai.ac.jp

世界中で急速に被害を拡大させているノロウイルスは、組織細胞を用いた培養法が確立されていないため、ウイルス粒子の感染能力に基づいたリスク管理を行うことが著しく困難であった。本研究では、酸化ストレスによりタンパク質分子上にカルボニル基が発生する現象に着目し、ウイルス外殻タンパク質における酸化損傷指標としてのカルボニル基蓄積量を定量することを試みた。その結果、遊離塩素処理によってアストロウイルス及びノロウイルス粒子表面上にカルボニル基が蓄積すること、さらにはアストロウイルス粒子上のカルボニル基蓄積量が増加すると共にウイルス粒子の感染価が低下することが示された。本研究の結果から、酸化傷害部位の検出による培養できない腸管系ウイルスの不活化評価という全く新しいアプローチを提案することが可能となった。

Key Words : norovirus, non-cultivable enteric viruses, capsid protein, oxidative damage, biotin hydrazide, avidin column

1. はじめに

本邦を含む先進国社会においては、上下水道整備による衛生環境の向上及び医学的知見の蓄積により、コレラや赤痢といった古くから猛威を奮っていた水系感染症はほぼ封じ込められたと言って過言ではない。ところが、そのような古くからの水系感染症とは異なり、腸管系ウイルスによる感染症は、衛生状態の良い先進国社会においてもほとんど制御不可能であるのが現状である。このことは、腸管系ウイルスが個人の衛生レベルでの対処や地域社会における従来の上下水道整備によっては制御しがたい生存戦略を有していることに起因すると推測されるが、その具体像は現段階で全く明らかにされていない。公衆衛生環境が著しく改善している先進諸国において、これほどまでに腸管系ウイルスが蔓延する理由を明らかにすることで、より効果的な対抗策を講じることが現在強く求められている。

腸管系ウイルスの中でも現在最も大きな被害をもたら

しているのがノロウイルスである。日本国内においては、胃腸炎患者からのノロウイルス分離報告数が2007年度には4000件を超えた。これは10年前の1997年度と比べて15倍超の値であり、近年の被害増加が著しいものであることを如実に物語っている。また、2002年度以降はノロウイルスを起因とする食中毒患者数が病因物質別で第1位となっており、特にノロウイルス汚染海域で養殖された生ガキによる被害が多く報告されている¹⁾。

このようなノロウイルスによる被害を封じ込めていくためには、人間社会におけるノロウイルスの生活環を解明し、その感染ルートを遮断することが最も有効であると考えられる。しかしながら、このノロウイルスに関しては実験室内における組織細胞を用いた培養手法が確立されていないため、感染能力を有したノロウイルスの人間社会における分布状況を把握することは不可能であるのが現状である。これまで様々な組織細胞や動物モデルを用いて実験室内でのノロウイルス増殖が試みられてきたが²⁾、1件を除いてすべて失敗に終わっている。組織細胞を用いた実験室内での培養に成功したとの報告をした1件³⁾についても、発表後2年以上が経過した現段階

Table1 ノロウイルスGII/4及びアストロウイルス4型の1ステップ定量RT-PCRに用いたプライマー及びプローブ配列

Primer and probe	Sequence (5'-3')	Polarity	Reference
Norovirus GII/4			
QNIF2	ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA	positive	13
COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCA	negative	14
QNIFS	6-carboxyfluorescein-AGCACGTGGGAGGGGATCG-6-carboxytetramethylrhodamine	-	13
Astrovirus 4			
AstVorflb+	AAGCAGCTTCGTGACTCTGG	positive	This study
AstVorflb-	AGCCATCACACTTCTTTGGTC	negative	This study
AstVorflbp	FAM-AGAGCAACTCCATCGCATTT-TAMRA	-	This study

においても他研究機関による再現が成功しておらず、その汎用性に疑問が持たれているのが現状である。さらに、この実験室内培養が不可能であることによる問題はノロウイルスに限られたものではない。近年感染症報告数が増加しているサポウイルス⁹⁾など、比較的近年になって被害が顕在化してきたウイルスの中に培養できないウイルスが存在している。多くの研究者が多様な組織細胞を用いて腸管系ウイルスをスクリーニングしてきた歴史を鑑みると、今後新たに腸管系ウイルスが見出されるとすれば、それらは培養できない可能性が高く、現在のノロウイルスと同様の問題が引き起こされることが容易に予想される。

この培養できない腸管系ウイルスによる水系感染症問題に対し、公衆衛生工学の立場から見れば、問題のウイルスに対する培養系の確立を座して待つことはできず、培養が不可能であれば不可能なものとして対処していくことが要求される。つまり、従来の組織細胞への感染能力に基づいたリスク管理ではなく、組織細胞を用いずにリスク評価を可能とする方法論を確立していくことが、最善且つ現実的な対応であると考えられる。

以上の背景のもと、本研究グループは、腸管系ウイルス粒子上の酸化傷害指標としてのカルボニル基蓄積に着目した。本来タンパク質分子上にカルボニル基は存在しないが、次亜塩素酸や活性酸素による酸化によって発生し、不可逆的酸化産物として蓄積する⁵⁹⁾。この酸化傷害の蓄積がタンパク質の機能喪失をもたらすことから³⁾、細胞感染時におけるレセプターへの特異的結合能を機能として有するウイルス粒子外殻タンパク質におけるカルボニル基の蓄積は、ウイルス粒子のレセプターへの結合能力すなわち感染能力の喪失へと繋がることが強く推測される。本研究では、ウイルス粒子外殻タンパク質におけるカルボニル基の蓄積を検出することにより、組織細胞を用いることなくウイルス粒子の感染能力を評価する新たな手法を開発することを試みた。以下に具体的な実験方法および結果を示す。

2. 実験方法

(1) テストウイルス

テストウイルスとしては、培養できない腸管系ウイルスとしてノロウイルスGII/4 (2006a cluster, Dr. M. B. Taylor から分与) を採用し、その対照として感染価測定が可能なアストロウイルス4型 (Dr. W. B. Cubbit から分与) を用いた。ノロウイルスGII/4の遺伝子定量はda Silva⁹⁾に従い1ステップ定量RT-PCRにより行った。アストロウイルス遺伝子の定量は、RNA依存性RNAポリメラーゼがコードされているorf1b領域をターゲットとした1ステップ定量RT-PCR系を構築して行った。ノロウイルス及びアストロウイルス遺伝子の定量に用いたプライマー配列及びプローブ配列を表1に示した。アストロウイルス遺伝子定量RT-PCRにおける反応試薬組成は、12.5μLの2x Thermoscript reaction mix (Platinum One-step qRT-PCR system, Invitrogen), 0.125μLの100μM AstVorflb+, 0.25μLの100μM AstVorflb-, 0.125μLの50μM AstVorflbp, 0.5μLのThermoscript Plus/Platinum Taq, 6.5μLのRNase/DNase-free dH₂O, そして5μLの抽出ウイルスRNAである。アストロウイルスの1ステップ定量RT-PCRにおける温度プロファイルは、55°C60分, 95°C5分に続いて95°C15秒, 58°C1分, 65°C1分を45サイクルである。アストロウイルス感染価測定はAbid⁹⁾に従って行った。具体的には、まずアストロウイルスを含むサンプルを10μg/mLのブタ脾臓由来トリプシンで37°C, 30分間処理し、細胞用培地で希釈列を作成して、24-well plateに培養したCaCo-2細胞に100μL/well接種した。サンプル接種後37°Cで60分培養した後、5μg/mLのブタ脾臓由来トリプシンを含む細胞用培地500μLを各wellに添加した上で、5%CO₂, 37°Cの条件下で5日間培養した。培養後、凍結(-80°C)及び融解(37°C)を3回繰り返すことでCaCo-2細胞を破壊し、細胞破壊後の上清を95°C, 5分処理することでアストロウイルス遺伝子を抽出した。アストロウイルス遺伝子の検出・定量は、表1に示したプライマー(AstVorflb+, AstVorflb-)を用いたend-point RT-PCRにより行った。

(2) ウイルス粒子の遊離塩素処理及びビオチン修飾処理

ウイルス粒子に損傷を与える酸化剤として、水などの消毒に広く用いられている次亜塩素酸ナトリウム由来の遊離塩素を用いた。アストロウイルスをテストウイルスとして用いた場合、酸化条件は遊離塩素初期濃度 0.05mg/L もしくは 0.5mg/L、反応時間 5 分もしくは 15 分、暗条件とした。遊離塩素濃度の測定には Chlorine and pH test kit (MERCK) を用いた。チオ硫酸ナトリウムによる遊離塩素中和の後、25 μ L の 50mM ビオチンヒドラジド (DMSO 中に溶解) を 1mL のサンプルに加え、室温で 2 時間攪拌することにより、酸化によって生じたウイルス粒子上のカルボニル基部位をビオチン標識した。最後に未反応ビオチンヒドラジドをカラム精製により除去した。同様の実験をノロウイルスに対しても試みたが、その場合にはウイルス粒子を 0.5mg/L もしくは 1.0mg/L の遊離塩素初期濃度で処理した。

(3) アビジンカラムクロマトグラフィ

ビオチンヒドラジド処理後のウイルス粒子をアビジンカラムに投入し、アフィニティクロマトグラフィを行った。まず 12mL の PBS (0.1M リン酸ナトリウム, 0.15M 塩化ナトリウム, pH 7.2) を投入してカラムを平衡化した後、ウイルスサンプル (PBS で 2mL に希釈し、その後 0.22 μ m フィルター (Millipore) によりろ過したもの) を投入した。サンプルがゲル中に浸透したことを確認した後、0.25mL の PBS を投入した。追加投入した PBS もゲル中に浸透した後、16mL の PBS を 2 回投入してカラム内を洗浄した。ウイルスサンプル投入後から洗浄までにカラム出口で得られたサンプルを「untrapped fraction」として -20 $^{\circ}$ C で保存した。次に 12mL の溶出バッファー (2mM ビオチン, 0.1M リン酸ナトリウム, 0.15M 塩化ナトリウム, pH 7.2) を投入してアビジンに捕捉されていたウイルス粒子をカラムから溶出し、さらに溶出されずにカラム中に残ったウイルス粒子を 8mL のグリシンバッファー (0.1M グリシン, 0.1M リン酸ナトリウム, 0.15M 塩化ナトリウム, pH 2.8) を投入して回収した。溶出バッファー及びグリシンバッファー投入時にカラム出口で得られたサンプルを「trapped fraction」として -20 $^{\circ}$ C で保存した。カラムへの投入サンプル, untrapped fraction 及び trapped fraction 中のウイルス遺伝子量は上述の方法により 1 ステップ定量 RT-PCR により測定した。最後に、ウイルス粒子のアビジンカラムによる回収率を計算した ($(\text{trapped fraction 中のウイルス遺伝子量測定値}) \times 100 / (\text{untrapped fraction 中のウイルス遺伝子量測定値} + \text{trapped fraction 中のウイルス遺伝子量測定値})$)。

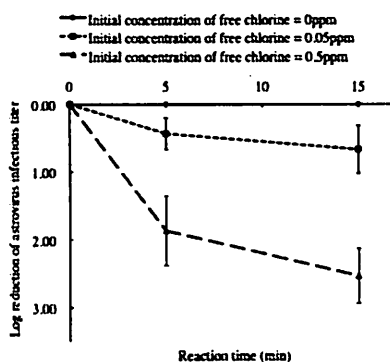


Fig.1 遊離塩素処理によるアストロウイルス 4 型感染価の経時変化 (3 回の試行の平均値。Error bar は標準偏差)。

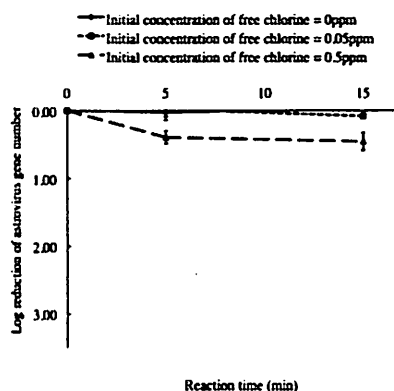


Fig.2 遊離塩素処理によるアストロウイルス 4 型遺伝子量測定値の経時変化 (3 回の試行の平均値。Error bar は標準偏差)。

3. 実験結果及び考察

(1) 遊離塩素処理によるアストロウイルス感染価及び遺伝子量測定値の経時変化

Fig.1 にアストロウイルス 4 型を遊離塩素で処理した場合の感染価遷移を示した (図中の値は 3 回の試行における平均値)。アストロウイルス 4 型を 0.05ppm の遊離塩素で 5 分間及び 15 分間処理した場合、感染価の低下はそれぞれ 0.43 log₁₀ (標準偏差 SD: 0.23) 及び 0.67 log₁₀ (SD: 0.35) であった。また 0.5ppm の遊離塩素で 5 分間及び 15 分間処理した場合には、感染価の低下はそれぞれ 1.87 log₁₀ (SD: 0.51) 及び 2.53 log₁₀ (SD: 0.40) であった。これらの結果は、本実験における遊離塩素処理によってアストロウイルスの感染価が有意に低下したことを示している。

Fig.2 には、アストロウイルス 4 型を遊離塩素で処理した場合の遺伝子量測定値の遷移を示した (図中の値は 3

回の試行における平均値)．0.05ppmの遊離塩素で5分間及び15分間処理した場合、感染価の低下はそれぞれ $-0.02 \log_{10}$ (SD: 0.11)及び $0.08 \log_{10}$ (SD: 0.03)であった．遊離塩素を添加しないネガティブコントロールと比べ、統計的に有意な遺伝子量の低下は見られなかった．それに対して0.5ppmの遊離塩素で5分間及び15分間処理した場合、感染価の低下はそれぞれ $0.39 \log_{10}$ (SD: 0.09)及び $0.45 \log_{10}$ (SD: 0.13)であった．

(2) アビジンカラムクロマトグラフィによるビオチン化アストロウイルス粒子の分離

Fig3にビオチン化処理後のアストロウイルス粒子のアビジンカラムによる回収率を示した(図中の値は2回の試行の平均値)．まず遊離塩素で処理していないアストロウイルスに対してビオチン化処理を行った場合、アビジンカラムにトラップされたアストロウイルスに由来する遺伝子量測定値は全体の13.0(±7.2)% (遊離塩素無し静置時間5分)及び13.5(±3.2)% (遊離塩素無し静置時間15分)であった．酸化を受けていないアミノ酸は本来カルボニル基を有していないが、遊離塩素処理を受けていないのにも関わらず約13%のアストロウイルスがアビジンカラムにトラップされたことは、アストロウイルスの準備段階(細胞による培養及び精製過程)で何らかの理由によりカルボニル基が生成したことが考えられるが、この点についてはさらなる精査が必要である．

一方、遊離塩素処理を受けたアストロウイルス粒子に対しビオチン化処理を行ってアビジンカラムに導入したところ、アビジンカラム内へのトラップ量が遊離塩素処理無しのアストロウイルス粒子に比べて有意に増加した．まず0.05ppmの遊離塩素で5分処理した場合、29.8(±5.1)%のアストロウイルス粒子がアビジンカラムにトラップされていた．アビジンカラムへのトラップ量は遊離塩素処理時間を15分に延ばした場合にさらに増加し、38.6(±2.5)%に達した．これらの結果は、0.05ppmの遊離塩素による5分以上の処理によって、アストロウイルス粒子上のカルボニル基が有意に増加したことを示していると言える．ここで注目すべきは、0.05ppmの遊離塩素による5分及び15分の処理では、アストロウイルス感染価の低下は見られたものの、アストロウイルス遺伝子量測定値の低下は観察されなかった点である(Fig1及びFig2)．すなわち、ウイルス粒子上の酸化傷害はウイルス遺伝子のそれよりも先行して生じており、カプシドタンパク質上の損傷がウイルスの感染能力を議論する上でより重要であることを示していると考えられる．

アストロウイルス粒子を0.5ppmの遊離塩素で処理した場合、アビジンカラムへのトラップ量はさらに増加した．まず0.5ppmの遊離塩素で5分処理した場合、41.4

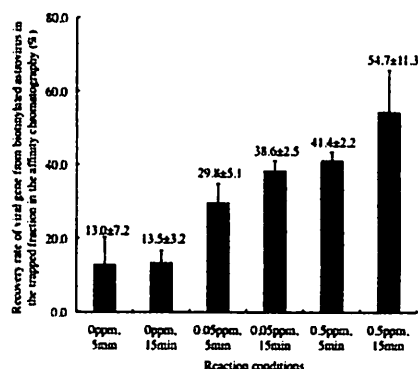


Fig3 アビジンカラムによるビオチン化アストロウイルス粒子の回収率(図中の値は2回の試行の平均値．Error barはデータ範囲を表す)．

(±2.2)%のアストロウイルス粒子がアビジンカラムにトラップされ、15分処理した場合には54.7(±11.3)%のアストロウイルス粒子がトラップされた．これらの結果は、遊離塩素による酸化ストレスによりウイルス粒子上にカルボニル基が蓄積され、その蓄積量を定量的に評価することが可能であることを示していると考えられる．

(3) 遊離塩素処理によるノロウイルス遺伝子量測定値の経時変化

培養できない腸管系ウイルスへの本手法の適用可能性を議論するため、上述と同様の実験をノロウイルス(GII/4, 2006a cluster)に対して行った．ノロウイルス粒子に対する遊離塩素処理の結果、Fig4に示すようなノロウイルス遺伝子量測定値の経時変化が得られた(図中の値は2回の試行の平均値)．遊離塩素を添加しないコントロール系では15分の静置時間でもノロウイルス遺伝子量測定値の低下は見られなかった．0.5ppmの遊離塩素による5分及び15分間の処理の場合には $0.11 \log_{10}$ (±0.10)及び $0.45 \log_{10}$ (±0.15)の低下が見られたものの、データ範囲を考えると0.5ppmの遊離塩素による5分間の処理ではノロウイルス遺伝子量測定値の低下はほとんど生じていなかったと考えられる．それに対して遊離塩素濃度を1.0ppmに上昇させた場合には、5分及び15分の処理によって $2.03 \log_{10}$ (±0.22)及び $2.27 \log_{10}$ (±0.10)の低下が見られた．

(4) アビジンカラムクロマトグラフィによるビオチン化ノロウイルス粒子の分離

Fig5にビオチン化処理後のノロウイルス粒子のアビジンカラムによる回収率を示した(図中の値は2回の試行の平均値)．遊離塩素を添加しないネガティブコント

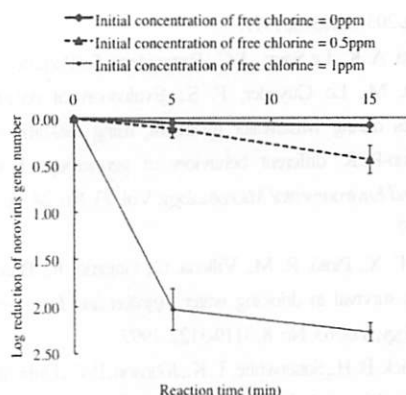


Fig.4 遊離塩素によるノロウイルス GII/4 の遺伝子量測定値の経時変化 (図中の値は2回の試行の平均値. Error bar はデータ範囲を表す) .

ロールの場合、5分及び15分間の静置時間に対して、 $1.6(\pm 1.2)\%$ 及び $1.0(\pm 1.0)\%$ のノロウイルスがアビジンカラムにトラップされた。この結果は、胃腸炎患者の糞便サンプルから精製されたノロウイルス粒子上には、ほとんどカルボニル基が存在していないことを示している。

次に0.5ppmの遊離塩素で5分間処理したノロウイルスをアビジンカラムに投入したところ、トラップされたノロウイルスは全体の $1.0(\pm 0.3)\%$ であり、遊離塩素添加無しのネガティブコントロールと比べて有意な差は生じなかった。同じ条件下でノロウイルス遺伝子量測定値の低下も観察されなかったことから (Fig4) , 0.5ppm, 5分の遊離塩素処理では十分にノロウイルスカプシドタンパク質に損傷を与えることが出来なかったことが原因であると考えられた。

それに対し0.5ppmの遊離塩素で15分間処理した場合、 $10.0(\pm 2.5)\%$ のノロウイルスがアビジンカラムによってトラップされた。この結果は、遊離塩素処理によってノロウイルス粒子表面上にカルボニル基が生成されたことを示している。ノロウイルス粒子を1.0ppmの遊離塩素で処理した場合には、アビジンカラムにトラップされる量はさらに増加し、5分及び15分の処理を経ることにより $21.4(\pm 3.5)\%$ 及び $49.4(\pm 2.4)\%$ のノロウイルス粒子がアビジンカラムにトラップされた。これらの結果は、遊離塩素処理によってノロウイルス粒子表面上に蓄積するカルボニル基は、本研究で提案した手法によって定量的に評価可能であることを示していると言える。

(5) 従来手法との比較

本研究以外にもウイルスカプシドタンパク質の構造完全性を評価するための手法は存在する。一つはRT-PCR

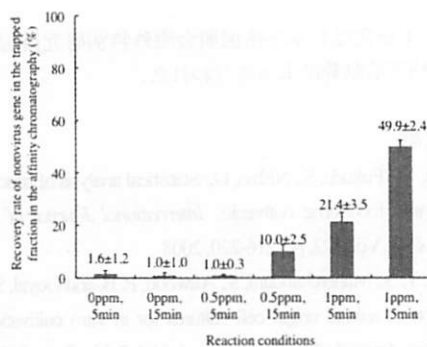


Fig.5 アビジンカラムによるビオチン化ノロウイルス粒子の回収 (図中の値は2回の試行の平均値. Error bar はデータ範囲を表す) .

法によるウイルス遺伝子検出の前にプロテアーゼ及びヌクレオチダーゼ (RNase) による処理を加えた方法^{12,13)}であり、もう一つは抗体もしくは組織細胞表面レセプターに結合したウイルス粒子のみに対してRT-PCR法を適用する方法¹⁴⁾である。前者の方法は、感染能力を有するウイルス粒子はプロテアーゼ耐性であり、プロテアーゼ及びRNase処理後もRT-PCRによってウイルス遺伝子が検出可能であるとの仮定に基づいた手法である。また後者の方法は、感染能力を有するウイルス粒子は抗体もしくはレセプター認識能力を喪失していないという前提に基づいた手法である。本研究で提案した手法の既存手法に対する利点は、証明の難しい前提を用いておらず、さらにカルボニル化という不可逆的な酸化傷害を検出対象としている点にある。本手法は操作自体も簡便であることから、組織細胞を用いない腸管系ウイルス感染症発生リスク評価の実現に貢献することが可能であると考えられる。

5. まとめ

遊離塩素による消毒処理により、ノロウイルス及びアストロウイルス粒子表面上にカルボニル基が蓄積されることが明らかとなった。さらに、アストロウイルス粒子表面上のカルボニル基蓄積量が増加すると共にウイルス粒子の感染価が低下することも示された。ウイルス外殻タンパク質表面上は消毒剤が初めに接触する場であることから、本研究で提案したウイルス外殻タンパク質上のカルボニル基検出手法は、培養できない腸管系ウイルスによる感染症発生リスク評価や不活化効率評価等に応用可能であると考えられる。

謝辞：本研究は日本学術振興会海外特別研究員制度における研究活動費によって行われた。

参考文献

- 1) Noda, M., Fukuda, S., Nishio, O.: Statistical analysis of attack rate in norovirus foodborne outbreaks. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 122, pp. 216-220, 2008.
- 2) Malik, Y. S., Maherchandani, S., Allwood, P. B. and Goyal, S. M.: Evaluation of animal origin cell cultures for in vitro cultivation of noroviruses, *Journal of Applied Research*, Vol. 5, No. 2, pp. 312-317, 2005.
- 3) Straub, T. M., Honer zu Bentrup, K., Orosz-Coghlan, P., Dohnalkova, A., Mayer, B. K., Bartholomew, R. A., Valdez, C. O., Bruckner-Lea, C. J., Gerba, C. P., Abbaszadegan, M. and Nickerson, C. A.: In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 13, No. 3, pp. 396-403, 2007.
- 4) Hansman, G. S., Saito, H., Shibata, C., Ishizuka, S., Oseto, M., Oka, T., Takeda, N.: Outbreak of gastroenteritis due to sapovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 45, No. 4, pp. 1347-1349, 2007.
- 5) Mirzaei, H., Regnier, F.: Affinity chromatographic selection of carbonylated proteins followed by identification of oxidation sites using tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, Vol. 77, No. 8, pp. 2386-2392, 2005.
- 6) Reverter-Branchat, G., Cabisco, E., Tamarit, J., Ros, J.: Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 30, pp. 31983-31989, 2004.
- 7) Berlett, B. S., Stadman, E. R.: Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272, No. 33, pp. 20313-20316, 1997.
- 8) da Silva, A. K., Le Saux, J.-C., Pamaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M., Le Guyader, F. S.: Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, No. 24, pp. 7891-7897, 2007.
- 9) Abad, F. X., Pintó, R. M., Villena, C., Gajardo, R., Bosch, A.: Astrovirus survival in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, No. 8, pp. 3119-3122, 1997.
- 10) Keswick, B. H., Satterwhite, T. K., Johnson, P. C., DuPont, H. L., Secor, S. L., Bitsura, J. A., Gary, G. W., Hoff, J. C.: Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 50, pp. 261-264, 1985.
- 11) Shin, G.-A., Sobsey, M. D.: Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water Research*, Vol. 42, pp. 4562-4568, 2008.
- 12) Simonet, J., Gantzer, C.: Degradation of the poliovirus 1 genome by chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 100, pp. 862-870, 2006.
- 13) Simonet, J., Gantzer, C.: Inactivation of poliovirus 1 and F-specific RNA phages and degradation of their genomes by UV irradiation at 254 nanometers. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, pp. 7671-7677, 2006.
- 14) Lamhoujeb, S., Fliss, I., Ngazoa, S. E., Jean, J.: Evaluation of the persistence of infectious human noroviruses on food surfaces by using real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, No. 11, pp. 3349-3355, 2008.

(2009.5.22受付)

Development of an evaluation method for infectivity of non-cultivable enteric viruses with the detection of oxidative damages on viral capsid protein

Daisuke Sano¹, Rosa M. Pintó², Tatsuo Omura³ and Albert Bosch⁴

¹Div. of Built Environment, Graduate School of Engineering, Hokkaido University

²Dept. of Microbiology, School of Biology, University of Barcelona

³Dept. of Civil and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University

Infectivity evaluation of non-cultivable viruses, such as norovirus, is crucial to address recent needs for ensuring the safety in usage of water and marine products. In this study, we proposed a new approach to evaluate viral particle integrity, which has a significant relationship with viral infectivity. It was demonstrated here that oxidatively produced carbonyl groups on capsid protein of norovirus GII/4 and astrovirus type 4 were quantitatively detected by using biotin hydrazide and avidin column. When norovirus was treated by 0.5 and 1ppm free chlorine for 15min, 10.0% and 49.9% of virions were recovered as oxidatively damaged particles, respectively. Since viral capsid protein is the first place to contact with any types of oxidants, the detection of the damaged viral particles with oxidized capsid protein could be a powerful tool for the evaluation of the infectivity loss of non-cultivable viruses.