

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550081

研究課題名(和文)細菌添加培養処理による感染性ウイルス選択的遺伝子定量法の開発

研究課題名(英文)Development of a selective detection method of infectious viruses using pre-incubation with bacteria

研究代表者

片山 浩之(KATAYAMA, Hiroyuki)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00302779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：PCR法ではウイルスの感染性の有無について判定できない。本研究では、PCR法の前処理として、感染性のあるウイルスを選択的に残す手法の開発を行った。様々な菌株を用い、RNAの分解を試みたが、短時間で9%以上のRNA分解(RT-PCRによる定量ベース)を達成することが困難であることが分かった。そこで、細菌処理に代わり、がん治療等で遺伝子に働く治療薬としても用いられているプラチナに着目し、研究を行った。cis-DDPを用いた方法はウイルスの不活化を評価するために効果的な方法であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：PCR based detection cannot distinguish between infectious and non-infectious viruses. This research aimed to develop such a method to selectively remain infectious virion prior to PCR based detection. Various bacterial strains were applied to decompose naked viral RNA. However, no bacteria achieved a good performance to degrade RNA in a short time, determined by RT-PCR. Then, instead of bacteria, platinum reagents were tested for the same purpose. As a result, cis-DDP, one of platinum reagents, worked to remove RNA but remain intact virus RNA.

研究分野：環境工学

キーワード：ウイルス PCR 不活化

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 28 年 5 月 5 日現在

## 1. 研究開始当初の背景

PCR 法ではウイルスの感染性の有無について判定できないとされてきている。環境水中に含まれるウイルスには、さまざまな要因によりダメージを受けたウイルス粒子が存在し、感染性のあるウイルス数を定量するのが困難な状況となっている。本研究では、PCR 法の前処理として、感染性のあるウイルスを選択的に残す手法の開発を行う。すなわち、細菌を用いた前処理により、ウイルスゲノムである RNA・DNA を効率的に分解し、なおかつその間に感染性のあるウイルスが感染性を失わない条件を見出す。この手法は、細菌添加培養処理による感染性ウイルス選択的遺伝子定量法であり、ウイルスの感染リスクに関して実際のリスクを反映した評価手法として、レクリエーション水利用や上水道などの分野において、検査法として受け入れられる可能性がある。

## 2. 研究の目的

浄水後の水におけるウイルス測定においては、不活化したウイルスの測定について偽陽性の課題がある。近年、EMA や PMA などの前処理と組み合わせて PCR を行うことで、損傷したウイルスと完全なウイルスの識別をする方法が使用されているが、培養法との結果を表せていない。

ウイルスはタンパク質と核酸で構成されており（注：水系感染するウイルスはエンベロープを持たない）特に難分解性の有機物質とは考えにくい、水環境中に長期間にわたって残存している現象も見られる。浮遊物質との相互作用による捕食からの保

護など、様々な要因が考えられるが、ウイルスを構成する分子そのものよりは、ウイルスの高次構造の安定性がこのような環境ストレス耐性の要因になっている可能性が高い。少なくとも、遺伝子である RNA あるいは DNA などの核酸はウイルスのカプシドタンパクの高次構造に守られていなければ短時間で分解されるはずである。環境中において、完全でないウイルス粒子の RNA がどのような経路で分解するのかについては、まだ明らかでないが、様々な要因が考えられる。水中の RNA 分解酵素も一つであるが、それ以外にも様々な可能性がある。ここでは、ウイルスゲノム RNA が分解される環境ストレスを再現性よく実施するための前処理系を開発することができれば、完全なウイルスは維持したままで、ダメージを受けているウイルスの RNA を分解することが可能となり、感染性を有するウイルスを選択的に検出できると考えた。この手法は、実際の環境中で起きることを試験管内で実現していることから、他の化学的修飾による方法（EMA、PMA）や、酵素を用いた方法（RNase など）に比べて、ウイルスを分解しすぎたりする可能性が低いことが期待される。実際には、環境中で比較的ゆっくりと進行する分解反応を加速したいという点と、感染性のある完全なウイルス（Intact ウイルス粒子）は分解してはいけない・感染性を失わせてはいけないという点が、処理条件の背反する陽性となっているため、適切な条件を見つけるのは容易でないと考えられる。また、ウイルスの種類ごとに環境ストレス

に対する耐性が異なるため、実験条件の設定は大いに困難が予想される。

本研究では、細菌の添加や、プラチナ化合物を利用することによってカプシドで守られていない RNA を分解することにより、その後の逆転写 PCR 法と組み合わせることによって、完全なウイルスを選択的に検出する手法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

Test ウイルスとして、ポリオウイルスワクチン株を用い、RNA および感染性を維持したウイルスの両方を用意した。また、様々な細菌の単離株を購入・単離し、試験に用いた。さらに、プラチナ化合物として cis-DDP および Pt(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(0) (Sigma-aldrich) を用い、DMSO にいったん溶かして所定の濃度となるように調整して用いた。なお、プラチナの効果については、2015 年にあらたに論文が発表されており (Soejima, T., Minami, J. I., Xiao, J. Z., & Abe, F. (2015). Innovative use of platinum compounds to selectively detect live microorganisms by polymerase chain reaction. *Biotechnology and bioengineering.*) 本研究の当初の目的を達成するために有用な方法が研究開始後に示されたため、研究方針として新たにプラチナの使用を加えたものである。

### 4. 研究成果

細菌を用いた方法においては、RNA の分解において、再現性良く高い効率を発揮する細菌株を見つけることができなかった。

プラチナを用いた実験では、ポリオウイルスを用い、遊離塩素 1 mg/L で 4 分接触し、

3Log (99.9%) 程度の不活化を行った。定量 PCR においては不活化は 0.3Log 以下に過小評価され、EMA-PCR においても 0.5Log 程度の不活化と過小評価されたが、cis-DDP を用いた方法では 2.3Log の不活化が観察され、より培養法に近い結果を得ることができた。このことから、cis-DDP を用いた方法はウイルスの不活化を評価するために効果的な方法であることが分かった。

この方法は、RT-PCR 法の前処理として用いることにより、感染価のあるウイルスを選択的に検出する手法に用いることが可能となる。感染性の有無を判定する染色法については環境中の細菌を測定する分野では汎用的な方法であるが、比較的小さい分子サイズの化合物を用いていることから、より小さいウイルスカプシドタンパク上の損傷に対しても効果がある可能性がある。本手法により、水の安全性評価に直接応用することが可能であると考えられる。これまで、培養法によるウイルス数の評価においては、実際に感染性のあるウイルスがあってもブラックを形成することはあまりなく、感染性粒子が多く必要であるとされている。とくに環境試料などにおいては、培養によるウイルス計測ではウイルス粒子数を過小に評価し、結果としてリスクの過小評価になることが指摘されている。一方、ウイルスの遺伝子を検出する PCR 法による測定では、不活化したウイルスゲノムを検出してしまうため、リスクの過大評価になることが指摘されてきている。このことは、リスクコミュニケーションが貧弱な我が国において、見掛け上の過大なリスクを示すデータが表に出ることを嫌う利益関係者が多いため、検査法として受け入れにくく、結果として検査自体がなされないという状況に陥っている。本手法により、ウイ

ルスの感染リスクに関して実際のリスクを反映した評価手法として受け入れられる可能性がある。特に、塩素消毒を行って安全を確保している上水道において、ウイルス測定に活用できる可能性があり、広く検査を行う体制が築かれる可能性を秘めている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計2件)

J. Torrey, J. Sangsanont, V.D. Canh, H. Katayama, H. Furumai  
Novel Method For Estimation Of RNA Virus Inactivation Utilizing Platinum-containing Compounds  
IWA World Water Congress and Exhibition to be held in Brisbane, Australia, 9-14 OCTOBER 2016

Canh VD, Katayama H., Osawa H, Takizawa, S and Furumai H,  
Application of ferrihydrite (Fh) to remove the inhibition of humic acids in molecular-based detection methods,  
5th Food and Environmental Virology conference (FEV) to be held in September 13-16, 2016, organized by ISFEV, Kusatsu, Japan.

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者 片山 浩之 (Katayama Hiroyuki)  
東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号： 00302779

(3)連携研究者 栗栖 太 (Kurisu Futoshi)  
東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：30312979