

13 豚熱ウイルス不活化処理条件と

遺伝子検査への影響評価

○八町 慶史

要 約

豚熱はウイルス血症を引き起こすため血清サンプルにウイルスが含まれる。竹内の発表¹⁾にて、交差汚染を防止し抗体検査するための措置として、ポリプロピレン製チューブを用いて60分間UV-C照射を実施してから非働化を実施するという結論を導いたが、今回、ウイルス不活化条件最適化のための追加検証及び遺伝子検査への影響を評価した。ウイルス不活化条件の検証では、①血清の溶血程度によるUV-C透過率の検証、②安全キャビネット内でのUV-C照射距離を検証した。①では、血清サンプルのUV-C透過率を測定し、血清サンプルに豚熱ウイルスワクチン株(GPE-株)を混和しUV-Cを照射しウイルス力価を測定した。②では、安全キャビネット内での位置、光源からの距離を変えてUV-Cを照射しウイルス力価及び中和抗体価の変化を測定した。遺伝子検査への影響の評価では、UV-C照射後に核酸抽出し、5' -NTR領域のコンベンショナルPCR(以下「cPCR」という。)、リアルタイムPCR(以下、「qPCR」という。)、ウイルスゲノム全長を標的としたPCR(以下、「Long PCR」という。)を実施した。①は、溶血検体ではUV-Cの透過率は著しく低下しUV-C照射でウイルスを完全に不活化することは困難であった。②は、UV-C直下、45cmの位置で15分間UV-C照射することで、中和試験への影響なくウイルスを不活化できた。遺伝子検査への影響は、cPCR及びqPCRでは認めなかったが、Long PCRではゲノムの損傷を認めた。以上より、UV-C照射を有効的に活用し、交差汚染防止を徹底した検査体制の構築に努めていく。

豚熱は豚熱ウイルスの感染による豚とイノシシの家畜伝染病で、高い致死率と強い伝染力が特徴である。豚熱ウイルス感染豚は、41℃以上の発熱と食欲不振やうずくまりといった症状に加えて、発熱時には血液中にウイルスが出現する。当所では、豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針に基づき、豚での浸潤状況調査及び病性鑑定、野生イノシシでの浸潤状況調査及び経口ワクチンの有効性評価のため、豚熱ウイルスの抗体検査を実施している。抗体検査では非特異反応低減のため、血清を56℃30分の非働化処理をしたのちELISA法及び中和試験を実施するが、豚熱ウイルスを完

全に不活化するためには68℃30分の加熱が必要との報告もあり²⁾、56℃30分の非働化処理では完全にウイルスは不活化されない。ELISA法は一般的な検査室で行われることが多く、デカンテーションでプレートを洗浄する過程でウイルスが周囲に飛散することが危惧された。中和試験では血清サンプル中にウイルスが存在すると溶液全体のウイルス力価が100TCID₅₀を超え、求める中和抗体価が低くなることが危惧された(図1)。

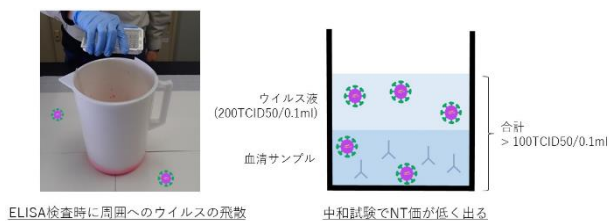


図1 血清中のウイルスが抗体検査へ与える影響

以前、竹内の発表¹⁾で、UV-Cを60分間照射した後に非働化処理を実施する、もしくは60℃60分加熱することで、抗体検査へ影響を与えずウイルス力価を検出限界以下へ低減できることが報告された。UV-Cは波長100-280nmのUVであり、細菌やウイルスへの殺菌効果を有する。UV-C照射は簡便かつ水中・大気中・固体表面の豚熱ウイルスの殺菌に活用でき、血清サンプルに事前にUV-Cを照射しウイルスを不活化した上でサンプルの分注及び検査に用いることで、より安全に検査を実施することもできる。UV-Cを活用したウイルスの不活化について、UV-Cを30秒照射することでSARS-CoV2を不活化する論文が報告された³⁾。一方、UV-Cを照射する場合、血清サンプルの状態によってはUV-C透過率に差が出る可能性がある。また、UV-C照射後に遺伝子検査を行う場合、検査への影響も懸念される。以上より、UV-Cを使用する場合の、ウイルスを不活化するための最適条件の追加検証及び遺伝子検査への影響を評価した。

材料と方法

竹内の報告¹⁾では、ポリプロピレン製の容器にウイルス液を入れ、蓋をして安全キャビネット内でUV-Cを照射した。プラスチックの種類によって吸収しやすい波長は異なり、ポリプロピレンの場合、254nmの波長は一定量吸収される可能性がある⁴⁾(図2)。そこで、溶液を96ウェルプレートにて蓋をせずに直接UV-Cを照射することとした。ウイルス力価はTCID₅₀法で測定した。

ウイルス不活化条件の検証では、血清溶血の程度によるUV-C透過率の検証及び安全キャビネット内でのUV-C照射距離を検証し、遺伝子検査への影響の評価では、複数種の遺伝子検査を実施した。

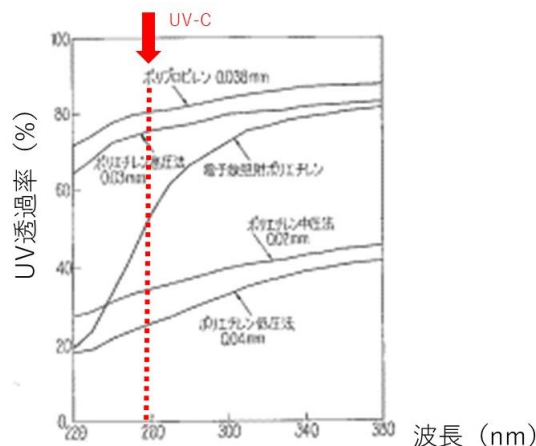


図2 プラスチックのUV透過率

1 血清の溶血の程度によるUV-C透過率の検証

材料は、溶血度合いの異なるAからEまでの豚の血清5検体である。検体Aが最も溶血をしており、検体Eはほぼ溶血していない検体である(図3)。

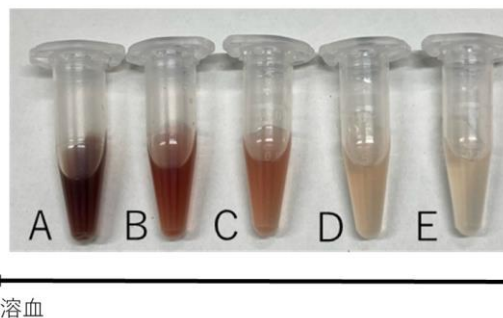


図3 溶血血清サンプル5検体

56℃30分の加熱処理後、UV-C可視分光光度計でUV-C透過率を測定した。使用したセルは光路長5mmの石英セル、測定波長は200nmから400nmである。そして、溶血の著しい検体A, B 2検体に、10^{3.67}TCID₅₀/0.1mlのGPE-株を10倍希釈で混和

し、照射距離 60cm、照射時間 30 分で UV-C 照射し、ウイルス力価を測定した。

2 安全キャビネット内での UV-C 照射距離の検証

材料は、 $10^{7.17}$ TCID₅₀/0.1ml、 $10^{5.5}$ TCID₅₀/0.1ml の GPE-株である。安全キャビネット内の設置場所により UV-C の照射量に差が出る可能性があるため、光源の真下となる奥と中央に 96 ウェルプレートを設置して、照射距離 45cm、照射時間 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30 分で UV-C を照射し、ウイルス力価を測定した。

また、光源からの距離により UV-C 照射量に差が出る可能性があるため、96 ウェルプレートを台に乗せた場合と床に置いた場合で高さを変えることで照射距離を 45cm、60cm とし、奥に 96 ウェルプレートを配置、照射時間 30 分で UV-C を照射し、ウイルス力価を測定した (図 4)。

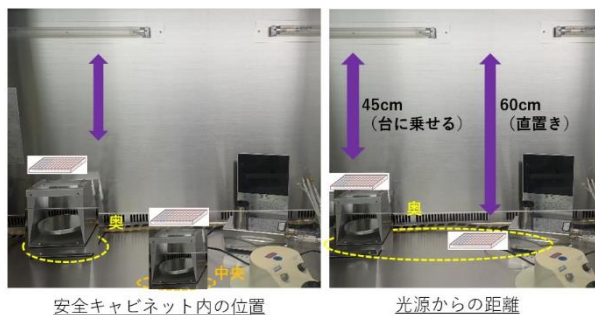


図 4 設置場所の検討

2 つの検証より UV-C 照射の最適条件を求め、中和抗体価 2~1,024 倍までを示す豚血清 7 検体に最適条件で UV-C 照射し、中和試験への影響を評価した。

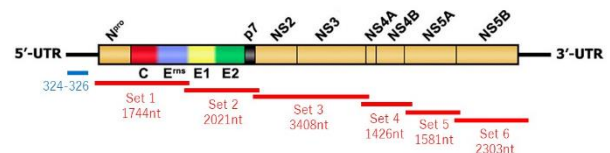
3 遺伝子検査への影響の評価

材料は豚熱 GPE-株である。照射時間による差を比較するため照射時間を 0~45 分内で変化させ、照射距離 45cm で UV-C 照射し、核酸抽出キット (High Pure Viral RNA Kit, ロシュ・ダイアグノスティックス株, ドイツ) にてウイルス RNA を抽出後、以下の検証を実施した。

(1) 材料は、非働化、照射 30 分、非働化後照射 30 分の 3 検体である。豚熱診断で用いる 5' -NTR 領域を標的とした cPCR を実施し、電気泳動像を確認した。また、同一プライマーを用いてダイレクトシーケンス法を実施し、得られた塩基配列の波形を、塩基配列解析ソフトウェア (MEGA 11) にて確認した。

(2) 材料は、未処理、非働化、照射 15 分、30 分、45 分の 5 検体である。豚熱診断で用いるリアルタイム PCR キット (豚熱ウイルス・アフリカ豚熱ウイルス検出試薬, タカラバイオ (株), 滋賀) で定量を行い、差を比較した。

(3) 材料は、未処理、非働化、照射 15 分、30 分、45 分の 5 検体である。Long PCR でウイルスゲノム全長を増幅し電気泳動像を比較した。豚熱ウイルスの ORF を 6 か所に区切って、それぞれプライマーを作成して PCR を実施した (図 5)。また、大金ら⁵⁾の方法を基に、検出されたバンドを画像処理ソフトウェア (Image J, アメリカ国立衛生研究所, アメリカ) で定量した。未処理ウイルスの定量値を 1 として相対値を求めグラフ化し、結果を比較した。



参照配列	Hog cholera virus (strain GPE-) アクセッション番号: D49533.1
プライマー設計	Primer-BLAST (NCBI)
ドライチェック	特異性: Primer-BLAST (NCBI) In-Silico PCR (UCSC) プライマーダイマー: Multiplex Primer Analyze (サーモフィッシャー) GC含量: GC含有率計算 (ベクタービルダー)
ウェットチェック	Tm値: グラジエントPCRでの検証 サイクル数: 25回

図 5 ウイルスゲノム全長のプライマー設計

結果

1 血清の溶血の程度による UV-C 透過率の検証

最も UV-C を透過した検体 C でも UV-C の透過率は約 20%程度であり、全検体がほぼ UV-C を透過しなかった (図 6)。溶血のない検体 E で UV-C の透

過率が5%以下となり、溶血の程度に関わらず血清へUV-C照射すると大半が吸収されることが明らかとなった。

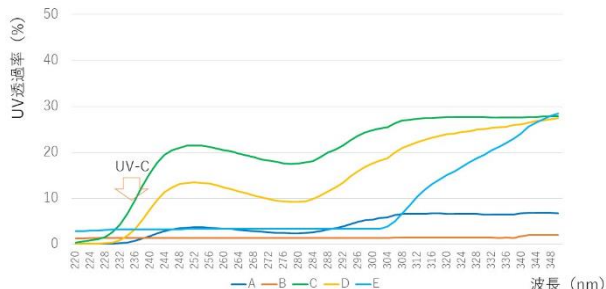


図6 溶血の程度によるUV透過率の違い

検体A、Bにウイルス液を混和しUV-C照射後ウイルス力価を測定した結果は、UV-Cを照射していない未処理ウイルスと比較しウイルス力価の低下はほぼ確認されず、UV-C照射効果は低かった（未処理ウイルス： $10^{3.67}$ TCID50/0.1ml、検体A： $10^{3.0}$ TCID50/0.1ml、検体B： $10^{3.17}$ TCID50/0.1ml）。

2 設置場所によるウイルス不活化の検討

結果は図7のとおり。安全キャビネット内の位置の検証では、奥に配置した場合は照射時間10分、中央に配置した場合は照射時間30分でウイルスが不活化された。光源からの距離の検証では、照射距離45cmにてウイルスが不活化された。以上より、安全キャビネット内の奥に配置し、光源からの距離が近いほどウイルスが不活化された。



図7 設置場所によるウイルス不活化の違い

以上より、奥に設置、照射時間30分、照射距離45cmで7検体にUV-C照射し中和試験への影響を確認したが、いずれも中和抗体価に大きな差は認めなかった（図8）。

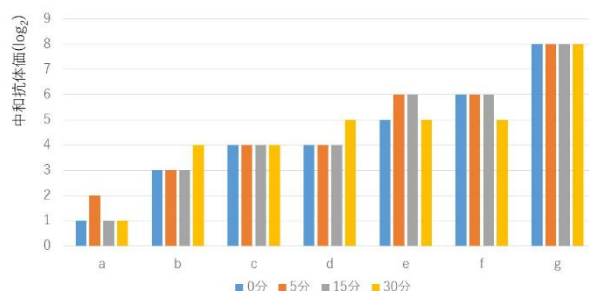


図8 中和試験への影響

3 遺伝子検査への影響の評価

(1)では、3検体すべてで同等のバンドを検出された。ダイレクトシーケンス法の結果は3検体ともGPE株と相同性100%で、同等のシングルピークの波形が確認された（図9）。

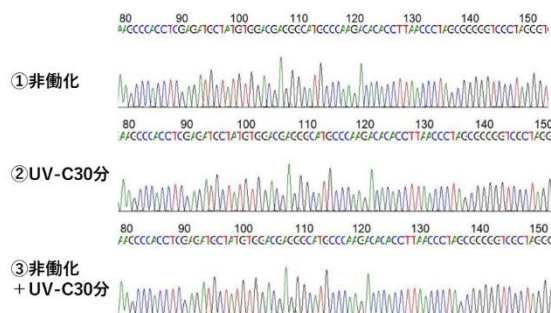


図9 シークエンス解析の波形データ

(2)では、未処理、非働化、照射15分、30分、45分の5検体を比較した。qPCRの波形はほぼ重なっており、照射時間に関わらず、コピー数に明確な変化を認めなかった（図10）。

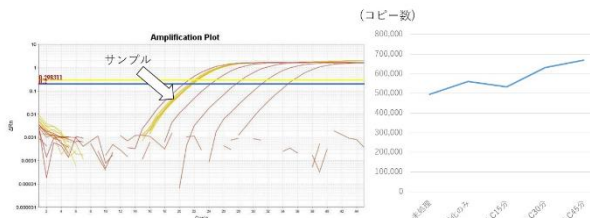


図10 リアルタイムPCRによる定量

(3)では、プライマーset1, 2, 3, 6はUV-C照射時間依存的にバンドの退色及び定量値の減少を確認したが、プライマーset4, 5は他のプライマーsetと比較し、大きな変化を認めなかった（図11）。

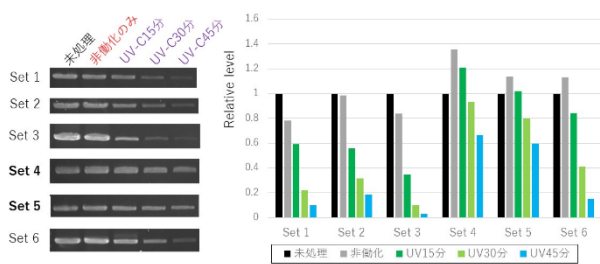


図11 ウイルスゲノム全長への影響

考察

血清に UV-C を照射すると、UV-C は血清中を透過する際に様々な物質に吸収され減衰していく。著しく溶血した検体で UV-C の透過率低下を確認したが、溶血のない検体でも UV-C 透過率の低下を確認したため、溶血以外の要素も UV-C 透過率に影響を与えている可能性がある。本試験では UV-C を 30 分照射したが、ウイルス力価は微減であったため、UV-C 透過率に影響を与える要因を明らかにし、検体の状態によっては UV-C 以外の不活化方法を選択する必要もある。

安全キャビネット内での設置場所の検証により、開放状態、照射距離 45cm、奥に設置することで、非働化込みで照射時間は 10 分に短縮された。この照射条件では中和試験への影響を認めなかったことから、本条件は有用であることが示唆された。なお、前述の論文³⁾ほどの照射時間でウイルスが不活化されなかった原因として、今回使用した殺菌灯の UV-C 強度は $51 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ であり、前述の論文の殺菌灯の UV-C 強度は $500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ であったことが想定される。

遺伝子検査への影響の評価では、豚熱の診断に用いる cPCR 及び qPCR への影響がないことが確認され、ウイルスに UV-C 照射後に豚熱診断のための遺伝子検査を行うことは可能であることが明らかとなった。これは、豚熱診断のための遺伝子検査では増幅するヌクレオチドが短いため、差を認めなかったことが想定される。一方、Long PCR

ではプライマー set1, 2, 3, 6 の領域で増幅産物の減少を認めたが、これらプライマー領域は比較的ヌクレオチドが長かったため、UV-C の影響を認めた可能性がある。また、ウイルスの不活化がゲノムの損傷が原因であることも示唆された。

今回は試験ごとに様々な力価のウイルスを使用したが、ウイルス力価が高まれば、その分不活化までに要する照射時間の延長が想定されるため、試験回数を増やし、複数のウイルス力価で試験を行い、ウイルス力価ごとに不活化までの所要時間を明らかにしていく必要がある。そしてスライドのとおり今回の試験より UV-C 照射条件を明らかにできたため、UV-C 照射を有効に活用し、交差汚染防止対策を徹底した検査体制を構築していく。

引用文献

- 1) 竹内美穂：CSF 抗体検査における非働化条件の検討, 令和元年東京都家畜保健衛生所業績発表会集録, (2020)
- 2) 社団法人全国家畜畜産物衛生指導協会：豚コレラ (Classical swine fever). (社)全国家畜畜産物衛生指導協会, 東京 (2006)
- 3) Chieh-Wen Lo, Ryosuke Matsuura, Kazuki Iimura, Satoshi Wada, Atsushi Shinjo, Yoshimi Benno, Masaru Nakagawa, Masami Takei, Yoko Aida: UVC disinfects SARS-CoV-2 by induction of viral genome damage without apparent effects on viral morphology and proteins, *scientific reports*, 13804, (2021)
- 4) 松井悦造:プラスチックフィルムの UV-C 透過性, 高分子, 16(82), 591-595, (1967)
- 5) Kenji Ohgane, Hiromasa Yoshioka: Quantification of Gel Bands by an Image J Macro Band/Peak Quantification Tool, protocols. io, (2019)