

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 金 京柱

本論文は、*Cryptosporidium* and Virus Concentration Method with Hydroxylapatite and Ethidium Monoazid-PCR for Selective Detection of Intact Virus (ハイドロキシアパタイトを用いたクリプトスポリジウムとウイルスの濃縮およびエチヂウムモノアザイド PCR を用いたウイルスの選択的検出)と題し、水中病原微生物の濃縮法の開発ならびに感染力のあるウイルスの選択的検出法について研究したものである。6章で構成されている。

第1章では、水系感染の原因となる病原微生物であるクリプトスポリジウムおよび腸管系ウイルスの水からの濃縮法ならびに検出法について研究する必要性とその目的、ならびに研究の流れを示している。

第2章では、本研究で取り扱う微生物についての概論と、これらの微生物の水中からの検出法および消毒耐性に関する既存の知見をまとめている。また、エチヂウムモノアザイドを用いた選択的遺伝子検出に関する既存の研究についてもとりまとめている。

第3章では、クリプトスポリジウムの顕微鏡による計測法、ポリオウイルスおよびバクテリオファージ Q β の培養法および RT-PCR 法による測定法、ノロウイルスおよびマウスノロウイルスの RT-PCR 法による検出法を示している。

第4章では、ハイドロキシアパタイト (HAP) を用いたクリプトスポリジウムとウイルスの同時濃縮法の開発を行っている。最初に既報に則して、ハイドロキシアパタイトの 20 μ m 径の均質粒子を用いて成層し、その粒子サイズによる排除機構を利用してクリプトスポリジウムの捕捉回収を試みている。クリプトスポリジウムの代替指標として同じ大きさ (4 \pm 1.4 μ m) の磁気ビーズを用いて HAP 層における回収率を調べ、72% ~ 98.8% の高い回収率を得ている。次に、同じ装置を用いて吸着・脱着機構を利用してウイルスを濃縮するため、マグネシウム添加および pH によりウイルス粒子の荷電を変化させ、その挙動を調べている。バクテリオファージ Q β 、ポリオウイルス、マウスノロウイルスを対象試料とし、マグネシウムを加えて HAP 層に吸着させ、その後、酸性溶液およびアルカリ性溶液を HAP 層に通した結果、アルカリ性溶液のろ液に多くのウイルスが含まれていたものの、初期の添加量に比して十分な回収率が得られなかったとしている。次に、既存のウイルス濃縮法で用いられている陰電荷膜 (孔径 0.45 μ m、ミリポア社 HA 膜) の上に HAP 層を形成させ、クリプトスポリジウムおよびウイルスの同時濃縮を試みた。その結果、クリプトスポリジウムおよびポリオウイルスは添加した

量に対し $74 \pm 22\%$ および $140 \pm 49\%$ の回収率が得られたとしている。以上の結果より、陰電荷膜と HAP を組み合わせた方法により、クリプトスポリジウムとウイルスの同時濃縮が可能であるとの結論を導いている。

第5章では、エチデウムモノアザイド (EMA) を用いて損傷を受けたウイルスを排除してから PCR 法による定量を行う手法を開発している。EMA は可視光照射により DNA および RNA と不可逆的に反応することを利用した手法である。最初に、EMA による PCR の阻害、可視光によるウイルス測定結果に対する影響がないことを確認している。次に、むき出しの RNA が PCR により検出されなくなる EMA 処理条件を実験的に求め、EMA 濃度として $10 \mu\text{g/L}$ 、光照射条件として 650W ハロゲンランプと試料の距離 15cm において 180 秒の照射において、99.99% 以上の RNA が検出されなくなることを見出している。また、同じ条件で精製したバクテリオファージ Q β 、ポリオウイルスおよびノロウイルスを EMA 処理し、培養法及び PCR 法によりウイルス濃度を測定し、その結果、PCR 法においては、EMA 単独あるいは光照射単独では濃度低下が見られなかったものの、EMA 処理後には 10 分の 1 程度までの濃度低下がみられたとしている。一方、Q β およびポリオウイルスの培養法においては EMA 処理においても濃度低下がみられなかったことから、ウイルス精製試料には完全な形のウイルス以外にもウイルスの RNA が存在し、それら活性のないウイルス RNA が EMA 処理によって低減されたものの、完全なウイルスの RNA はその周囲にカプシドタンパクが存在するために EMA 処理によって影響を受けなかったと考察している。また、この考察は、PCR 法による測定値が培養法による測定値よりも大きくなるという従来からの知見と一致することも指摘した上で、EMA 処理によって活性のあるウイルスを保持したまま損傷を受けたウイルスの遺伝子を排除することができるため、EMA-PCR 法によって感染価のあるウイルスの選択的測定が可能になったとしている。

さらに、ウイルスの熱処理による不活化効果を EMA - PCR 法により調べている。ポリオウイルスおよびバクテリオファージ Q β を 45°C、55°C、65°C および 75°C にて 10 分間保持した試料に対し、PCR 法、EMA-PCR 法ならびに培養法によりポリオウイルスを測定し、その結果、従来の PCR 法においてはウイルス濃度の低減が全く見られなかったものの、EMA-PCR 法においては培養法と同じ条件でウイルス濃度の低下が観察されたとしている。このことから、熱処理によるウイルスの不活化において、EMA-PCR 法の有用性が確認できたとしている。

第6章は総括であり、本論文の成果を取りまとめて示してある。

以上のように、本論文は、水中の病原微生物の中でも重要な監視対象であるクリプトスポリジウムとウイルスを効率的に濃縮する手法を開発し、分子生物学的手法を用いてウイルスの感染価の有無を判定するためのエチデウムモノアザイド PCR 法の開発及びその有用性の評価を行った研究であり、都市環境工学の学術分野に大いに貢献する成果である。よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。