

審査の結果の要旨

氏名 サンサノン ジャトゥワット

本論文は、Application of PCR-based techniques for evaluating the effect of chlorine, ozone and ultraviolet light on viral nucleic acid and capsid integrity (塩素、オゾンおよび紫外線がウイルス核酸およびカプシドに及ぼす影響の PCR に基づく手法による評価)と題する。水野微生物学的安全性の確保のために、ノロウイルスをはじめとするヒト腸管系ウイルスの消毒手法およびその有効性の確認が重要な課題とされており、分子生物学的手法を含めて研究したものである。本論文は以下の9章で構成されている。

第1章では、水中の病原ウイルスの消毒の必要性和様々な消毒法、および消毒後のウイルス測定法を概観し、ウイルス消毒を研究することの意義ならびに本論文の目的と構成を示している。

第2章では、水中ウイルスについての既存の知見およびその処理法に関する既存の知見をまとめている。現在問題となっている水中のウイルスおよび測定法について整理し、塩素消毒、紫外線消毒ならびにオゾン処理における微生物の不活化に関する先行研究をまとめ、既存の知見を整理している。

第3章では、ウイルスの培養法および分子生物学的手法によるウイルス検出法など、本研究で用いた実験方法を記述している。

第4章では、前半部において、アデノウイルスの培養法を確立している。Hep-2細胞とA549細胞を培養してアデノウイルスの宿主として用い、アデノウイルス5型の培養に成功し、A549細胞においてはブラックの観察にも成功したことから、アデノウイルスの感染価を測定する方法が確立し、消毒実験の効果の測定に用いることが可能となった。後半部では、エチジウムモノアザイド(EMA)処理による効果を調べている。対象としたウイルスは、大腸菌ファージQ β 、MS2、ポリオウイルス1型、マウスノロウイルスおよびアデノウイルス5型である。感染価を有する大腸菌ファージQ β およびMS2に対して、EMAはカプシドをすりぬけてRNAと反応したが、ポリオウイルス1型、マウスノロウイルスおよびアデノウイルス5型に対してはEMAはRNA/DNAと反応しないことを確認した。その結果、Q β およびMS2に対してはEMA処理を用いた処理は適さないが、ポリオウイルス、マウスノロウイルス、アデノウイルスに対してはEMA処理はカプシドの完全性を調べるための手法として有効であることを明らかにした。なお、EMA処理に用いるEMA濃度は、ポリオウイルス、マウスノロウイルスに対しては50 μ g/ml、アデノウイルスに対しては10 μ g/mlが適していることを確認した。

第5章では、オゾンによる短時間の不活化効果を測定するための装置として、連続反応装置(Continuous Quench Flow, CQF)の開発を行っている。この装置は第8章で用いている。本装置は、ペリスタポンプによりオゾン溶液と試料を等量輸送して混ぜる装置であり、流入口の内径1mm、流出口内径2mm、混合部サイズ4mmのT型のコネクタを用い、内部に微小スターラーを入れている。混合部より以降にチューブを備えることにより、液の混合

後の反応時間をコントロールする装置である。本装置は、混合部における完全な混合が重要であるため、酸性溶液とアルカリ性溶液に pH 指示薬を用いることにより、混合状態を視認して混合状態を確認した。また、混合比率が等しいことも塩化ナトリウム溶液と性盛衰を用いた実験により確認している。また、塩素と Q β を用いて 0.7 秒から 10 秒までの接触時間による消毒実験を行い、より長い接触時間のバッチ式実験と違いがないことを確認している。これらの結果より、CQF 反応装置は設計通りの実験が可能であり、かつ、0.7 秒という非常に短時間の消毒実験を行うことが可能となった。

第 6 章では、塩素消毒により生じたウイルスへの損傷の測定における EMA-RT-PCR の有用性について論じている。ウイルスの感染価、ウイルスカプシドの損傷、並びにウイルス核酸の損傷について、細胞培養法、EMA- RT-PCR 法、ならびに RT-PCR 法により調べている。塩素消毒の初期濃度は 0.1、0.25、0.5 及び 1mg/L とし、ポリオウイルスおよびマウスノロウイルスの不活化効果を調べている。EMA- RT-PCR 法では、RT-PCR 法よりも不活化速度が大きいという観察結果が得られた。低濃度の塩素消毒ではこの差があまり見られず、EMA はカプシドを通過できない状態でもウイルスが不活化しているという現象が見られた。初期塩素濃度 0.5mg/L 以上では、塩素はウイルスのカプシドに損傷を与えている可能性が高いことが明らかとなった。

第 7 章では、オゾンによるウイルスの不活化の状況を調べるため、CQF リアクターを用いて実験している。オゾンによるウイルスの不活化は非常に短時間で生じるので、0.7 秒の接触時間をはじめ、経時的なウイルスの定量値を、ブラック法、EMA-RT-PCR 法および RT-PCR 法を用いてしらべ、オゾンによるポリオウイルスの不活化、カプシドの損傷および核酸への損傷を調べている。CQF 反応装置を用いることにより、バッチ型消毒試験によるよりも詳細にウイルスの不活化を調べることができた。EMA-RT-PCR により RT-PCR よりも不活化速度が観察されたことから、オゾンによる不活化はウイルスのカプシドの損傷から生じている可能性が高いことが示唆された。

第 8 章では、低圧紫外線ランプ (LPUV) および中圧紫外線ランプ (MPUV) によるウイルスの不活化について研究している。ポリオウイルスおよびアデノウイルスを対象とした。LPUV を用いた場合、1000mJ/cm² までの照射において、EMA 処理の前後で核酸定量値が変わらなかったことから、カプシドの損傷は起きていないと考えられる。一方、MPUV を用いた場合には、特に 300mJ/cm² 以上においてはポリオウイルスおよびアデノウイルスともに EMA 処理により核酸定量値が下がる結果が得られた。このことは、EMA が核酸に結合可能であったことを示しており、EMA が通過することが可能な損傷がウイルスのカプシドに生じていたことを示すことから、MPUV によりウイルスのカプシドが損傷したことが明らかとなった。次に、MPUV に対して様々な光学フィルタを合わせ、ことなる波長を持つ光によりウイルスの損傷を調べている。EMA 処理による核酸の定量値低下は、230~240nm 付近の波長の光が卓越している場合に大きいという結果が得られ、230-240nm の光がカプシドの損傷に効果があることが明らかとなった。

第 9 章は総括であり、本論文の結論および今後の展望について整理して示している。

本論文では、ウイルスの不活化に関して長らく不明であったオゾンによる消毒の不活化速度、および、塩素消毒、紫外線消毒ならびにオゾン処理におけるウイルスの核酸の損傷

およびカプシドの損傷に関する研究を行い、重要な成果を上げている。このように、本論文は、水の微生物学的安全性を確保するための工学的な方法を体系的に評価するために重要な新たな知見をまとめたものであり、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であると認められる。