

(様式11)

論文審査の要旨 (課程博士)

生物システム応用科学府長 殿

審査委員 主査 \_\_\_\_\_ 田中 剛 \_\_\_\_\_ (印)  
副査 \_\_\_\_\_ 柴田 重信 \_\_\_\_\_ (印)  
副査 \_\_\_\_\_ 松田 浩珍 \_\_\_\_\_ (印)  
副査 \_\_\_\_\_ 稲田 全規 \_\_\_\_\_ (印)  
副査 \_\_\_\_\_ 吉野 知子 \_\_\_\_\_ (印)

学位申請者	平成 24 年度入学 学籍番号 12702104 氏名 塩野入 望
申請学位	博士 (生命科学)
論文題目	酸化損傷付与による水系感染症原因微生物の不活化機構の解析

論文審査要旨 (2,000 字程度 or 500words)

本研究では塩素非依存的な方法により海洋性の魚病原菌である *Vibrio alginolyticus*、*Vibrio anguillarum*、*Edwardsiella tarda* 及び *Lactococcus garvieae* の殺菌、ならびに感染性胃腸炎の主な原因ウイルスであるヒトノロウイルス (human norovirus: HuNoV) の代替ウイルスであるネコカリシウイルス (feline calicivirus: FCV) を不活化し、処理後の菌体やウイルス粒子の観察・解析を通じてその作用機構を解析することを目的とした。本研究を通して得られた成果を各章ごとにまとめる。

第1章では、塩素処理以外の方法による微生物汚染水の浄化法、ノロウイルス感染症とその不活化に関する知見についてまとめ、本研究の目的と意義を明らかにした。

第2章では、電気化学的手法による塩素非依存的な海洋性魚病原菌の殺菌を行った。ハニカム構造により大きな比表面積を有するチタン基板を白金で被覆し、10枚積層することで電解能及び処理能力を向上したフローリアクターを構築した。海水を循環させながら電位を印加し、電流値及び発生した遊離残留塩素濃度をモニタリングしたところ、1.0 V (vs. Ag/AgCl) 以下では発生が極微量であった一方で、1.2 V を境に電流値・遊離残留塩素濃度ともに顕著な上昇が確認された。0.9–1.2 V、流速 200 ml/min の条件で *V. alginolyticus* ( $1.0 \times 10^3$  cells/ml, 2 l) に電位を印加したところ、1.0 V 以下で遊離残留塩素発生を抑制しながらも2時間の処理で約100%の殺菌が可能であった。同様に他の3魚病原菌についても1.0 V 印加により遊離残留塩素発生を0.1 ppm 以下に抑えながら2時間で約100%殺菌できた。これより、本手法がグラム陰性菌・グラム陽性菌の双方に対して有効な殺菌法となり得ることが示唆された。さらに、0.9 V 印加により殺菌した *V. alginolyticus* の細胞膜において過酸化脂質が検出されたことから、本手法の作用機構として電極表面に局所的に発生した活性酸素種による菌体の構成成分の酸化が考えられた。

第3章では、同手法による FCV 不活化を試みた。0.9 V (vs. Ag/AgCl)、流速 550 µl/min、15 分間の電位印加により、FCV 感染価の5桁以上の低減が達成された (初期感染価  $1.0 \times 10^{10}$  pfu/ml)。これは第2章において遊離残留塩素発生を抑制可能であった電位であり、本条件においても同様に塩素発生はないと考えられる。また、電気化学処理により不活化された FCV は、TEM 観察及び MALDI-TOF MS による解析の結果、形態が

著しく変化し、FCV 粒子の最外殻に位置するタンパク質の一部のペプチドが酸化損傷を受けていることが明らかとなった。これは、電気化学的処理の FCV 不活化における有効性及び構造タンパク質の酸化損傷に関する初めての報告となる。

第2章及び第3章で行った電気化学的処理による微生物不活化では、短寿命の活性酸素種の発生が要因として考えられた。第4章では、電気化学的手法以外の方法により発生させた活性酸素種を利用した FCV 不活化を目的とした。活性酸素種発生に銅化合物のフェントン様反応を利用した従来のウイルス不活化法では、二価銅化合物に対して還元剤を添加することでフェントン様反応を開始させていた。本研究では一価銅化合物であるヨウ化銅 (CuI) を用いることで、追加の操作を必要としない OH ラジカル発生を達成できた。CuI ナノ粒子懸濁液を FCV に1時間曝露することで7桁以上の感染価低減が可能であった。また、CuI 曝露後の FCV 粒子は第3章の電気化学処理後の FCV 粒子と同様、構造タンパク質のペプチドの一部に酸化損傷が認められた。

本研究では、発がん性を示す消毒副生成物の発生が懸念される塩素処理に代わる、塩素非依存的な水系感染症の原因微生物不活化技術の開発及びその有効性を示し、更に各手法における作用機構を示した。低電位殺菌では水生生物への影響を最小限に抑えた殺菌が可能となり、養殖や観賞魚の飼育の環境を制御する上で応用が期待される。本研究において確立した技術は非常に単純で電極と電位印加装置のみで実施可能であり、エネルギー消費量も小さいことから、優れた技術であると言える。HuNoV はウイルス性胃腸炎の 90% 以上を占める主要なウイルスである。電気化学的不活化の性質上、水中に存在するウイルスへの適用が適しているため、感染者が排出したウイルスを含むと考えられる下水処理への応用が期待される。しかしながら、床や地面上の嘔吐物や、そこから飛散し周囲に付着したウイルスの不活化には適用不可能である。CuI ナノ粒子は、溶出する銅イオンのヒトや水生生物への影響から、飲料水や下水処理には不適切だと考えられる一方で、床や壁の建材としての使用、布製品への塗布による厨房用の白衣や吐物処理用の雑巾、あるいは吐瀉物へ直接噴霧するスプレー剤としての使用が可能であると考えられる。これらの方法を用途や状況に応じて選択することが重要となる。また近年、ウイルス不活化の学術的研究では感染価だけでなくゲノムやタンパク質等のウイルスの構成成分への影響を検証した報告が増加傾向にある。本研究で用いた手法による FCV 構造タンパク質の酸化損傷の結果は周辺研究へ新たな知見を提供するものであり、本研究は工学的価値のみならず学術的にも意義がある研究である。