

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
北野 淳一	主査 教授 谷 川 允 彦 主査 教授 佐 野 浩 一 副査 教授 河 野 公 一 副査 教授 玉 井 浩 一 副査 教授 勝 健 一
主論文題名 A novel electrolyzed sodium chloride solution for the disinfection of dried HIV-1 (低濃度食塩水電気分解産物の乾燥 HIV 感染細胞に対する消毒効果の検討)	
学位論文内容の要旨	
<p>《目的》</p> <p>ホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドに代表される化学消毒薬は、抗微生物スペクトラムが広く、消毒効果が強いという利点があり、医療機器の消毒剤として広く使われてきた。しかしこれらの化学消毒薬は、細胞毒性や遺伝子障害作用を有しており、内視鏡内に残存したグルタルアルデヒドが、出血性下痢の原因となった事例が報告されている。また廃棄時の環境への負荷も問題となっており、これらに代わる消毒剤の開発が望まれている。</p> <p>代替消毒剤のひとつである食塩水電気分解産物は各種細菌やウイルスに対して幅広い消毒効果を有しており実用に供されつつある。なかでも食塩濃度と遊離塩素濃度を低くして、金属腐食性を低減させ、発ガン性や遺伝子障害作用などの危険性を軽減させた低濃度食塩水電気分解産物(ESW-L)に関する研究が進んでいる。ESW-L はほぼすべての病原細菌、抗酸菌および芽胞菌を殺菌し、液相にある B 型肝炎ウイルスおよびヒト免疫不全ウイルス(HIV)を不活化することが報告されている。しかし、消毒剤に抵抗性を示すとされている乾燥 HIV-1 感染細胞に対する ESW-L の消毒効果やその作用機序の詳細については報告されていない。</p> <p>そこで、申請者は ESW-L の乾燥 HIV-1 感染細胞に対する消毒効果とその作用機序を検討することを本研究の目的とした。</p> <p>《対象と方法》</p> <p>電気分解装置にて 0.05%食塩水を室温で 3 A の電流を 45 分間通電して ESW-L を作製した。ESW-L の酸化還元電位は 1053 mV、pH は 2.34、遊離塩素濃度は 4.20 ppm であった。</p> <p>乾燥 HIV-1 感染細胞に対する消毒効果を判定するために、マイクロキャリアテストを行った。すなわち 96 穴マイクロプレート内の各ウェルに HIV-1 持続感染 Molt4 細胞浮遊液を 5 µl ずつ加えてバイオセーフティーキャビネット内で 2 時間放置し乾燥させた。次に各ウェル内に ESW-L 100 µl を室温で乾燥 HIV-1 感染細胞に接触させた。接触後各ウェル内にアルカリ水 100 µl を加えて中和し、3%ウシ胎児血清を加えて ESW-L の反応を停止した。これを PBS にて 3 回洗浄し、非感染 Molt4 細胞を各ウェルに加えて 2 週間培養した。この培養上清中の RT 活性すなわちウイルスの reproduction の多寡を測定することにより、ESW-L と接触させた乾燥 HIV-1 感染細胞に残存する感染性の有無を調べた。</p> <p>さらに、乾燥 HIV-1 感染細胞に対する ESW-L の作用機序を検討しようとしたが技術的に困難であるため、以下のような方法で作用機序の検討をおこなった。まず精製 p24 タンパク、recombinant RT、DNA サイズマーカーおよび RT-PCR キット付属のコントロールテンプレート RNA に ESW-L を接触させた後、それぞれの変化を検討した。つぎに、ESW-L を HIV-1 粒子に接触させた後、HIV-1 粒子内の p24 タンパク、逆転写酵素、ウイルス核酸の変化を検討した。p24 タンパクについては HIV-1 p24 antigen capture 法、RT については non-RI RT assay 法、核酸については RT-PCR 産物を電気泳動して検討した。</p>	

《結果と考察》

乾燥 HIV-1 感染細胞に ESW-L を 10 分以上接触させることにより、その感染性は消失し、ESW-L は乾燥 HIV-1 感染細胞に対して消毒効果を有することを明らかにした。ESW-L の広い抗微生物スペクトラムのうち、乾燥 HIV-1 感染細胞に対する消毒効果を証明することにより、ウイルスに対する ESW-L の消毒スペクトラムを補完できたことは、今後 ESW-L をさらに積極的に利用する根拠となると考えられる。

ESW-L の乾燥 HIV-1 感染細胞に対する消毒効果のメカニズムを検討するには乾燥 HIV-1 感染細胞中の構造タンパク、逆転写酵素、ウイルス核酸を検討することが必要であるが、現時点では技術的に困難である。そこで、蛋白、酵素、核酸に対する ESW-L の直接的な影響を検討したところ、ESW-L は精製 p24 タンパクの抗原性、精製逆転写酵素を不活化し、核酸を破壊した。しかしこれらのコンポーネントは、ウイルス粒子の表面に露出しているわけではなく、内部に存在しているため、ESW-L がウイルス粒子の蛋白、酵素、核酸に影響を及ぼすか否かを検討する必要がある。そこで、ESW-L をウイルス粒子に接触させ、粒子内の構造タンパク、逆転写酵素、ウイルス核酸に対する影響を検討した。その結果ウイルス粒子内では、逆転写酵素は不活化され、ウイルス核酸は破壊されたが、構造タンパクである p24 タンパクの抗原性は完全には不活化されなかった。この結果は、p24 タンパクはウイルス粒子内では重合体を形成するなどして ESW-L の作用を受けにくい構造となっていることを示唆すると同時に、ウイルス構造タンパクの抗原性の変化のみをもって食塩水電気分解産物の消毒効果を評価することは不適當であることを示している。

以上の結果より、ESW-L は HIV-1 粒子そのものを破壊するのではなく、ウイルス粒子内の逆転写酵素やウイルス核酸を破壊することによって感染性を不活化するものと考えられ、乾燥 HIV-1 感染細胞においても同様のことが起こっているものと推定した。

今回の検討で、低濃度食塩水電気分解産物の抗微生物スペクトラムのうち、消毒薬抵抗性を示すとされていた乾燥 HIV-1 感染細胞に対する有効性を証明し、その作用機序を推定できたことより、低濃度食塩水電気分解産物の臨床応用に資する根拠を提供していると考えられる。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第972号	氏名	北野 淳一
論文審査担当者	主査 教授 谷川 允彦 主査 教授 佐野 浩一 副査 教授 河野 公一 副査 教授 玉井 浩一 副査 教授 勝 健一		
主論文題名			
A novel electrolyzed sodium chloride solution for the disinfection of dried HIV-1 (低濃度食塩水電気分解産物の乾燥 HIV 感染細胞に対する消毒効果の検討)			
論文審査結果の要旨			
<p>申請者は、新たな消毒剤として注目されている低濃度食塩水電気分解産物(ESW-L)の抗微生物スペクトラムのうち、未だ報告されていない乾燥 HIV-1感染細胞に対する消毒効果を検討し、その作用機序を明らかにしようとした。</p> <p>申請者は HIV-1 LAV-1 株を用いた実験で、乾燥 HIV-1 感染細胞に対する消毒効果を証明した。この消毒効果のメカニズムを明らかにするために、構造タンパク、逆転写酵素と、核酸に及ぼす ESW-L の直接的な影響を検討し、ESW-L は構造タンパクの抗原性と逆転写酵素の活性を不活化し、DNA と RNA を破壊することを明らかにした。申請者は更に ESW-L を接触させたウイルス粒子内の構造タンパク、逆転写酵素及びゲノムの変化について検討し、ESW-L が HIV 粒子内のウイルス核酸を破壊し、逆転写酵素を不活化するが、構造タンパクの抗原性は不活化できないことを明らかにした。これらのことより申請者は、構造タンパクはウイルス粒子内では ESW-L の消毒作用を受けにくい構造となっていることを示唆すると同時に、ウイルス構造タンパクの変化のみをもって食塩水電気分解産物の消毒効果を評価することは不適當であるとしている。</p> <p>申請者は消毒薬抵抗性を示すとされていた乾燥 HIV-1 感染細胞に対する消毒効果における ESW-L の標的を明らかにした。さらに、ウイルス構造蛋白の抗原性の変化は本消毒薬の評価に適さないとしている。これらは今後、低濃度食塩水電気分解産物を臨床応用する上で重要な知見を提供するものである。</p> <p>以上により、本論文が本学学位規程第3条第2項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Bulletin of the Osaka Medical College 48(1,2): 29-36, 2003</p>			