

誘電体バリア放電プラズマトーチを用いた ネコカリシウイルス不活化機構の解析

Studies on Mechanism of Inactivation of Feline calicivirus by Dielectric Barrier

Discharge Plasma Torch

琉球大医¹, 佐賀大工² (B)山城 梨沙¹, 三沢 達也², 豊川 洋一¹, 作道 章一¹

Univ. Ryukyus¹, Saga Univ.²: Risa Yamashiro¹, Tatsuya Misawa², Yoichi Toyokawa¹,

Akikazu Sakudo¹

E-mail: e104505@eve.u-ryukyu.ac.jp

【目的】ノロウイルスは感染性胃腸炎や食中毒の原因ウイルスであり、汚染調理器具や患者の排泄物への接触感染により伝播する。現在, ノロウイルスの不活化には次亜塩素酸ナトリウムの使用が推奨されているが、有毒ガスの発生や金属腐食作用等の問題があるため、より安全な不活化法が求められている。そこで本研究では、新たな不活化法としてプラズマ技術に着目し、プラズマによるノロウイルスの不活化効果とその機構の解析を目的とした。なお、ノロウイルスは動物細胞での培養法が確立されていないため、米国環境保護局(EPA)において代替ウイルスとして指定されているネコカリシウイルスを用いて、プラズマの不活化評価とそのメカニズムの解析を行った。

【実験方法】ネコカリシウイルス F9 株(VR-782, ATCC)を感染させたネコ腎臓細胞 CRFK(CCL-94, ATCC)より細胞懸濁液を調整し、プラズマ処理に供した。プラズマ装置は、銅板で覆われたセラミックスの筒内に金属のメッシュを配置したプラズマトーチ(図 1)を使用した。銅板とメッシュ間に電圧 10 kV、周波数 10 kHz の高周波パルスを印加し、誘電体バリア放電(DBD, Dielectric Barrier Discharge)によるプラズマを発生させた。エアーポンプ(水作:水心 SSPP-2S 3.5 L/min)を用いて筒先端から大気圧プラズマジェットを放出させ、カバーガラス上の感染細胞懸濁液に対してプラズマ処理(0, 0.5, 1, 2 min)を行った。処理後、Median tissue culture infectious dose(TCID₅₀)測定による感染価の比較を行った。そして、プラズマから発生する熱、紫外線、活性種($\cdot\text{O}_2^-$ 、 $^1\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 、 ONOO^-)の不活化への影響を調べた。まず、熱、紫外線、 ONOO^- とウイルス液の単独処理を行い、各因子の不活化効果への寄与度を明らかにした。次に、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $^1\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 の各消去剤(Superoxide dismutase、アジ化ナトリウム、Dimethyl sulfoxide、カタラーゼ)を加えてプラズマ処理を行うことで、各活性種消去時と非消去時の不活化効果を比較した。

【結果・考察】プラズマ処理の D 値(ウイルス感染価を 1/10 に低下させるのに要する処理時間)は 0.493 min であり、55℃の加熱処理 D 値(2.837 min)よりも顕著に良好であった。また、プラズマ 2 min 時点で発生していた量の熱(38.4℃)、紫外線(46.79 mJ/cm²)ではウイルスは不活化されなかったが、 ONOO^- 処理(4.62 mM)により TCID₅₀ が 2.47log₁₀ 低下した。さらに活性種の消去剤を加えてプラズマ処理 2 min を行ったところ、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 の消去剤は感染価に影響を与えなかったが、 $^1\text{O}_2$ 消去時は非消去時と比べて TCID₅₀ が 70%増大していた。これらのことから、大気圧プラズマジェットによる不活化効果において ONOO^- と $^1\text{O}_2$ が重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの活性種の生成条件を最適化することで、効率的なプラズマ処理が可能なものと考えられる。

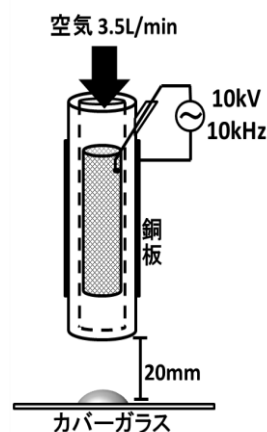


図1. プラズマトーチ