



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	トウガラシ微斑ウイルスの水中病原ウイルスに対する指標性と実浄水工程における処理性〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	白川, 大樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第15377号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89617
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Daiki_Shirakawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（工学） 氏名 白川 大樹

学 位 論 文 題 名

トウガラシ微斑ウイルスの水中病原ウイルスに対する指標性と実浄水工程における処理性
(Suitability of pepper mild mottle virus as an indicator for waterborne enteric viruses and its treatability in full-scale drinking water treatment processes)

PCR 法に代表されるウイルス定量法の発展に伴い、水道原水を含む環境水中においても、ヒトノロウイルスに代表される病原ウイルスが広く存在していることが明らかとなっている。このため、仮に浄水処理が不十分な場合、水道水を介した病原ウイルスによる水系感染症が発生する可能性が考えられる。現在、日本の水道水質基準にウイルスに関する項目は含まれていないものの、世界保健機関 (WHO) の飲料水水質ガイドラインにおいては、定量的微生物リスク評価に基づく飲料水中の病原ウイルス濃度の許容値として 100,000 L 中 1 個が示されている。従って、水道水の安全性の担保のためには、浄水処理における病原ウイルスの処理性を詳細に把握することが重要となる。

しかしながら、浄水処理水中の病原ウイルス濃度は極めて低く、直接の定量が困難であることから、実浄水処理工程における病原ウイルスの処理性に関する知見は非常に限定されている。このような中で、環境水中においては、植物ウイルスであるトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) が高濃度で存在することが明らかとなってきている。また、PMMoV は、物理的な浄水処理工程 (凝集沈澱-急速砂ろ過処理および膜ろ過処理) におけるアデノウイルス、エンテロウイルス、A 型肝炎ウイルスの挙動指標としての有効性も示されてきている。従って、実浄水処理工程における PMMoV の処理性を直接評価することにより、その処理性評価結果から、病原ウイルスの処理性を推定できる可能性が考えられる。しかしながら、水道原水における病原ウイルスと PMMoV の存在濃度の関係性は十分に把握されていない。また、社会的な注目度の高いヒトノロウイルスおよびヒトサポウイルスについては、ヒト体外での効率的な培養が難しいことから、浄水処理性評価のための添加実験の実施に必要なウイルス量を確保すること自体が難しく、浄水処理性に関する知見がほとんど得られていない。結果として、これらのウイルスに対する PMMoV の指標性は全く評価されていない状況にある。

以上の背景から、本研究では、飲料水を介して伝播する病原体として WHO 飲料水水質ガイドラインに掲載されている 9 種類の病原ウイルスを対象とし、全国 10 カ所の水道原水におけるこれらの病原ウイルスおよび PMMoV の存在実態を調査すると共に、PMMoV を対象とし、実浄水処理工程におけるウイルスの処理性を評価した。また、ごく最近確立されたヒトサポウイルスの汎用細胞増殖系を活用することにより、これまで全く明らかにされていないヒトサポウイルスの物理的な浄水処理性を評価した。更に、培養困難なヒトノロウイルスの物理的な浄水処理性を評価することを目的に、高感度に定量可能なヒトノロウイルスのウイルス様粒子 (VLPs) の創製についても取り組んだ。

本論文は、以下の 5 章からなる。

第 1 章では、水環境におけるウイルスの存在実態調査および浄水処理におけるウイルスの処理性評価に関する既往研究をまとめた上で、本研究の研究背景と目的について論じた。

第 2 章では、水道原水および浄水処理水中のウイルスを効果的に回収・濃縮するために、陽電荷膜とタンジェンタルフロー UF 膜を併用した新規ウイルス濃縮法を構築した。この後、構築した濃縮

法を適用することにより、全国 10 カ所の水道原水における上述した 9 種類の病原ウイルスおよび PMMoV の存在実態を調査した。更に、PCR 法に加えて、ウイルスの感染性を決定づける主要な要因のひとつであるカプシドタンパク質（ウイルス粒子を構成するタンパク質）の完全性を評価可能な Viability-PCR 法を適用することにより、水道原水におけるウイルスの感染性の有無についても議論した。構築した濃縮法を濃度既知のウイルスを添加した水道原水および脱塩素水道水に適用したところ、いずれの試料水においてもウイルスを効果的に回収・濃縮可能であり、特に、PMMoV については、40 L の水道原水および 2000 L の脱塩素水道水を 20 mL に濃縮する場合においても、30% 以上の回収率が得られることが明らかとなった。この濃縮法を全国 10 カ所の水道原水に適用したところ、対象とした水道原水においては、PMMoV が上述した 9 種類の病原ウイルスに比べて 100 倍以上高い濃度で存在していることが明らかとなった。また、Viability-PCR 法による定量結果から、アデノウイルスやロタウイルスについては、カプシドタンパク質に損傷のある状態（不活化した状態）で存在している可能性が示唆された一方、エンテロウイルスやヒトノロウイルス（GII 群）、PMMoV については、カプシドタンパク質に損傷のない状態で存在している可能性が示唆された。

第 3 章では、水道原水中に病原ウイルスに比べて高濃度で存在することが確認された PMMoV を対象とし、構築したウイルス濃縮法を適用することにより、実浄水処理工程におけるウイルスの処理性を評価した。その結果、凝集沈澱-急速砂ろ過処理（浄水場 A, B）においては $0.9-2.7\text{-log}_{10}$ 、凝集-MF 膜処理（浄水場 C, D）においては $0.7-2.9\text{-log}_{10}$ の低減率が得られることが明らかとなった。MF 膜処理は急速砂ろ過処理に比べて高度な固液分離性を有するにもかかわらず、浄水場 C の凝集-MF 膜処理における PMMoV の低減率（ $0.7-1.5\text{-log}_{10}$ ）は、浄水場 A, B の凝集沈澱-急速砂ろ過処理における低減率（ $0.9-2.7\text{-log}_{10}$ ）よりも低かった。浄水場 C の凝集-MF 膜処理を模した添加実験を実施したところ、凝集剤の添加濃度がウイルスの処理性に大きく影響し、MF 膜のファウリング制御の観点から決定されている浄水場 C における凝集剤添加濃度は、ウイルス処理の観点からは低いものであり、このことが PMMoV の低減率が低かった主要な要因であるものと考えられた。

第 4 章では、ごく最近確立されたヒトサポウイルスの汎用細胞増殖系を活用することにより、ヒトサポウイルスの物理的な浄水処理性を評価した。また、培養困難なヒトノロウイルスの物理的な浄水処理性を評価することを目的に、高感度に定量可能な外来遺伝子を封入したヒトノロウイルスの VLPs（遺伝子封入 VLPs）の創製についても取り組んだ。汎用細胞を胆汁酸存在下で用いることにより、添加実験の実施に必要なヒトサポウイルスの高濃度精製ストックを調整することに成功した。このストックを添加実験に用いることにより、凝集沈澱-急速砂ろ過処理および凝集-MF 膜処理におけるヒトサポウイルスの処理性を評価したところ、PMMoV と同程度、あるいはやや高い除去率が得られた。従って、PMMoV は、凝集沈澱-急速砂ろ過処理および凝集-MF 膜処理におけるヒトサポウイルスの挙動指標となることが示唆された。以上のことから、本研究で対象とした浄水場 A, B の凝集沈澱-急速砂ろ過処理および浄水場 C, D の凝集-MF 膜処理においては、アデノウイルス、エンテロウイルス、A 型肝炎ウイルスに加えて、ヒトサポウイルスについても、 $1-3\text{-log}_{10}$ 以上の低減率が得られるものと推察された。一方、ヒトノロウイルスの遺伝子封入 VLPs の創製については、VLPs 内部に外来遺伝子を封入するための VLPs の分解・再合成法の構築に成功し、この手法を適用することにより、外来物質である金ナノ粒子を VLPs 内部に封入可能であることを明らかにした。この金ナノ粒子を介することにより、外来遺伝子を VLPs 内部に封入できる可能性が考えられた。

第 5 章では、本研究で得られた知見をまとめ、結論とした。