

学 位 論 文 題 名

大腸菌ファージおよびウイルス外套タンパク粒子を用いたウイルスの浄水処理性評価

学位論文内容の要旨

分子生物学的なウイルス検出法および水中からのウイルス回収・濃縮法の発展に伴い、河川水、地下水、海水といった水環境における病原性ウイルスの実態調査が行われるようになり、日本においても、水道水源と成り得る水環境中に病原性ウイルスが存在していることが明らかとなった。このことは、仮に浄水処理が不十分な場合、水道水を含む飲料水を媒体とした病原性ウイルスによる大規模な水系感染症が突発的に発生する可能性があることを示唆している。現在のところ、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、米国環境保護局は、浄水処理（ろ過および消毒）によって表流水、地下水の腸管系ウイルスを 4 log 除去、あるいは不活化することを要求している。従って、浄水処理におけるウイルスの処理性を評価することは非常に重要である。

水系感染症を引き起こす病原性ウイルスの中でも、感染事例が世界中で増加しているヒトノロウイルスは、未だ効率的な培養法が確立されていないことから、添加実験による浄水処理性の評価を行うために必要なウイルス量を確保することが極めて困難であり、培養可能な病原性ウイルスと比べて研究が格段に遅れている。また、浄水処理の中でも、現在日本で広く普及している凝集沈澱-急速砂ろ過処理においては、病原性ウイルスの代替指標微生物を用いた添加実験によりウイルスの処理性評価がこれまで数多くなされているものの、従来処理に替わる次世代の浄水技術として導入が進められている凝集-MF 膜ろ過処理に関しては、ウイルスの処理性評価がほとんどなされていないのが現状である。

このような背景から、本研究では、耐圧性や耐薬品性などの点で注目を集め、近年導入が進められているセラミック MF 膜を用いた凝集-MF 膜ろ過処理におけるウイルスの処理性を、病原性ウイルスの代替指標微生物として広く用いられている大腸菌ファージ Q β および MS2 を用いて詳細に評価した。また、効率的な培養法が未確立なことからこれまでほとんど議論されてこなかったヒトノロウイルスの物理的な浄水処理性を、遺伝子組換えバキュロウイルスとカイコを用いたタンパク質発現法により発現させたヒトノロウイルス外套タンパク粒子 (rNV-VLPs) を用いて評価した。

本論文は、以下の 5 章からなる。

第 1 章では、水環境中の病原性ウイルスの実態調査および浄水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、セラミック MF 膜を用いた凝集-MF 膜ろ過処理におけるウイルスの処理性を、大腸菌ファージ Q β および MS2 を用いることで詳細に評価した。また、感染性のあるウイルス粒子を定量可能なブラック形成法と全粒子（感染性のあるウイルス粒子 + 感染性を失ったウイルス粒子）を定量可能なリアルタイム定量 RT-PCR 法を併用することにより、感染性の有無に着目したウイルスの処理性を評価し、ウイルス除去のメカニズムについても議論した。凝集剤添加濃度を十分に確保したインライン凝集-MF 膜ろ過処理における Q β および MS2 の除去率は、RT-PCR 法によって全粒子数で評価すると約 4-6 log となり、また、ブラック形成法によって感染性粒子数で評価すると約

8 log となった。加えて、前凝集処理法の差異がウイルスの処理性に与える影響について評価したところ、凝集時間 1 分のインライン凝集-MF 膜ろ過処理であっても、凝集時間 5 分の急速攪拌を付加した機械攪拌凝集-MF 膜ろ過処理、攪拌時間 5 分の急速攪拌、攪拌時間 25 分の緩速攪拌、および 20 分の沈澱処理を付加した機械攪拌凝集沈澱-MF 膜ろ過処理と同程度の約 8 log の除去率が得られた。従って、インライン凝集-MF 膜ろ過処理を用いることにより、高いウイルスの処理性に加え、凝集処理に関して省エネルギー化・省スペース化が期待できることが示された。更に、インライン凝集-MF 膜ろ過処理におけるウイルス除去のメカニズムとして、凝集処理によって形成されたアルミニウムフロックに捕捉されたウイルスが MF 膜によって分離除去されるフロック化による除去に加え、アルミニウムフロックを主な原因物質とする膜ファウリング物質が MF 膜に経時的に蓄積し、アルミニウムフロックに捕捉されたウイルスおよび捕捉されなかったウイルスが MF 膜によって分離除去あるいは吸着除去される膜ファウリング物質による除去の 2 つが明らかとなった。

第 3 章では、第 2 章で行ったインライン凝集-MF 膜ろ過処理におけるウイルスの処理性を、ブラック形成法と RT-PCR 法を併用して評価した場合に、除去率に差異が見られたことから、凝集処理によるウイルスの不活化の可能性について議論した。PACl を用いて Q β を凝集沈澱・膜ろ過処理した場合の Q β の除去率を、ブラック形成法と RT-PCR 法を用いて評価すると、約 5 log の差異が見られた。2 つの定量法によって評価した除去率に差異が生じた原因として、感染力を失ったウイルス、すなわち、不活化したウイルスの存在、あるいは、いくつかの感染性のあるウイルスが集まって形成される凝集塊の存在のいずれかが考えられたが、Q β の粒径と膜の公称孔径の関係から、2 つの定量法によって得られた除去率の差異は、凝集塊の存在のみでは説明がつかないことが示された。また、膜ろ過水中の Q β の粒径測定結果から、ウイルスが凝集塊を形成せず、単分散した状態で存在していることが確認された。従って、膜ろ過水中に不活化したウイルスが存在することが明らかとなり、凝集処理によってウイルスが除去されるのみならず不活化されることが示された。加えて、凝集処理によるウイルスの不活化への感受性は Q β の方が MS2 に比べて大きく、PACl の方が alum に比べて不活化効果が大い可能性が示された。

第 4 章では、培養不可能なヒトノロウイルスの物理的な浄水処理性を、rNV-VLPs を用いることにより評価し、ヒトノロウイルスの代替指標微生物としての Q β および MS2 の可能性についても議論した。発現させた rNV-VLPs は、野生のヒトノロウイルスと同等の抗原性、粒径、比重を有していたことから、rNV-VLPs を用いることにより、ヒトノロウイルスの凝集沈澱-急速砂ろ過処理性を評価することが可能であると判断した。発現させた rNV-VLPs を用いて凝集沈澱-急速砂ろ過処理（ろ層厚さ 10 cm）における処理性を評価したところ、凝集剤として PACl(pH 6.8) および FeCl₃(pH 5.8) を用いた場合に約 3 log の除去率が得られた。また、rNV-VLPs と Q β および MS2 の処理性を比較したところ、凝集沈澱-急速砂ろ過処理における MS2 の除去率は、rNV-VLPs の除去率よりも高かったため、MS2 がヒトノロウイルスの代替指標とはならないと考えられた。一方、Q β の除去率は、rNV-VLPs の除去率と同程度、あるいは低かったため、MS2 に比べて指標性があると考えられた。しかしながら、個々の処理プロセス、すなわち、凝集沈澱処理、急速砂ろ過処理においては、Q β の除去率が rNV-VLPs の除去率よりも高かったこともあったため、個々の処理プロセスにおいては、Q β がヒトノロウイルスの代替指標とはならないと考えられた。

第 5 章では、本研究で得られた知見をまとめ、結論とした。

本研究では、凝集-MF 膜ろ過処理におけるウイルスの処理性を、大腸菌ファージを用いて評価した。その結果、凝集処理を最適条件で行うことにより、MF 膜ろ過処理であっても約 8 log の除去率が得られることが分かった。また、ウイルス除去のメカニズムとして、フロック化による除去・膜ファウリング物質による除去・不活化の 3 つが明らかとなった。更に、培養不可能なヒトノロウイルスの物理的な浄水処理性を、rNV-VLPs を用いることにより評価した。その結果、凝集処理を最適条件で行うことにより、凝集沈澱-急速砂ろ過処理（ろ層厚さ 10 cm）によって約 3 log の rNV-VLPs の除去率が得られることが分かった。また、Q β および MS2 のヒトノロウイルスに対する指標性を評価したところ、Q β の方が MS2 に比べて指標性が高いことが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	松井	佳彦
副査	教授	船水	尚行
副査	教授	岡部	聡
副査	准教授	松下	拓

学位論文題名

大腸菌ファージおよびウイルス外套タンパク粒子を用いたウイルスの浄水処理性評価

分子生物学的なウイルス検出法および水中からのウイルス回収・濃縮法の発展に伴い、河川水などにおける病原性ウイルスの実態調査が行われるようになり、水道水源中に病原性ウイルスが存在していることが明らかとなっている。このような状況下で、米国環境保護局は浄水処理によって腸管系ウイルスを 4 log 除去あるいは不活化することを基準とするなど、浄水工程におけるウイルスの処理性評価の重要性が認識されつつある。しかしながら、浄水方式としてこれまでに広く普及している凝集沈澱-急速砂ろ過処理においては代替指標ウイルスを用いた添加実験によりウイルスの処理性評価がこれまで数多くなされているものの、次世代の浄水技術として導入が進められている凝集-MF 膜ろ過処理に関しては、ウイルスの処理性評価がほとんど行われてない。また、水系感染症を引き起こす病原性ウイルスの中でも、感染事例が世界中で増加しているヒトノロウイルスは、未だ人工的培養法が確立されていないことから、添加実験による浄水処理性の評価を行うために必要なウイルス量を確保することが極めて困難であり、他の培養可能な病原性ウイルスと比べて浄水処理性の関する研究は格段に遅れている。

本論文では、耐圧性や耐薬品性などの点で注目を集め、近年導入が進められているセラミック膜を用いた凝集-MF 膜ろ過処理におけるウイルスの処理性を、病原性ウイルスの代替指標ウイルスとして広く用いられている大腸菌ファージ Q β および MS2 を用いて詳細に評価している。その結果、分離孔径がウイルスサイズより大きな MF 膜を用いたろ過処理においても、凝集操作を適切に行うことにより約 8 log の高いウイルス除去率が得られることを示すとともに、凝集-MF 膜ろ過処理の操作条件がウイルス除去に及ぼす影響を詳細に検討している。さらに、ウイルス除去のメカニズムとして、1) フロック化による除去、2) 膜ファウリング物質による除去の他に、3) 凝集反応によるウイルスの不活化を明らかにしている。特に、ウイルスの不活化については、ブラック形成法と RT-PCR 法を併用したウイルス濃度の測定結果と、膜の分離孔径とウイルスの粒径測定結果から現象を緻密に議論している。

さらに、人工培養が不可能なことからこれまでほとんど未検討であったヒトノロウイルスの物理的な浄水処理性を、遺伝子組換えバキュロウイルスとカイコを用いたタンパク質発現法により

発現させたヒトノロウイルス外套タンパク粒子 (rNV-VLPs) を用いて評価している。その結果、凝集処理を最適条件で行うことにより、凝集沈澱・急速砂ろ過処理 (層厚 10cm) によって約 3 log の rNV-VLPs の除去率が得られることや、ヒトノロウイルスに対する指標性としては $Q\beta$ の方が MS2 に比べて優れていることを明らかにしている。

これを要するに、著者は、浄水工程におけるウイルスの処理性についての新知見を得たものであり、水道水由来の感染症リスク評価と工学的低減化に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格あるものと認める。