

## 文献抄録

## 中圧紫外線によるオーシストの不活化

## Medium-pressure UV for oocyst inactivation

Zia Bukhari ら

## 1. 摘要

ベンチスケールで中圧紫外線を使った *Cryptosporidium parvum* オーシストの不活化実験を行った。照射量  $41\text{mJ}/\text{cm}^2$  において、マウス感染評価では  $4\log$  以上の不活化が確認されたのに対し、脱嚢評価では不活化はほとんど確認されなかった。また NSF と USEPA の合同による「環境技術実証プログラム」において、実規模レベルで実験した結果、 $19\text{mJ}/\text{cm}^2$  で  $3.9\log$  の不活化が確認されるというベンチスケールと同様の結果が得られた。

## 2. 方法

2.1 *C. parvum* オーシスト

分離株はアリゾナ大学の Harley Moon または Iowa 株を用いた。この株はもともと子牛由来のもので、新生の子牛に感染させることによって増殖させたものである。感染牛から得たオーシストは篩いにかけて後、遠心分離した。オーシストを糞便から分離するにあたっては、不連続型蔗糖勾配の後、微小スケールの塩化セシウム密度勾配遠心法によって精製した。

精製させたオーシストは、 $4^\circ\text{C}$  の  $0.01\%$  のポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート溶液に、ペニシリン  $100\text{IU}$  と、ストレプトマイシン  $100\mu\text{g}$ 、ゲンタマイシン  $100\mu\text{g}/\text{mL}$  を加えたもので保管した。

## 2.2 ベンチスケール実験

内径  $6.4\text{cm}$ 、長さ  $50\text{cm}$  の塩化ポリビニル製の円筒に  $1\text{kW}$  の中圧ランプが装填された装置を用いた。ペトリ皿でスターラーを攪拌させながら、オーシスト懸濁液に照射した。

原水は Mannheim 浄水場の塩素消毒前の最終処理水を用いた。

## 2.3 実証規模実験

実証規模の実験は Mannheim 浄水場において、NSF と USEPA による「環境技術実証プログラム (ETV)」の協力のもと行われた。UV 装置は容量が  $111$  リットルで  $6$  本の  $1\text{kW}$  中圧ランプを装填したものである。全体の処理水量は  $814$  リットル/分である。UV 処理のオーシストは孔径  $1\mu\text{m}$  のフィルターを使って捕集した。

## 3. 結果

## 3.1 ベンチスケール実験

$41\text{mJ}/\text{cm}^2$  と  $82\text{mJ}/\text{cm}^2$  では、DAPI-PI 染色と脱嚢評価双方において不活化は認められなかったが、感染評価では  $1 \times 10^5$  個のオーシストを与えた  $24$  個体のマウスにおいて感染性が消失した。

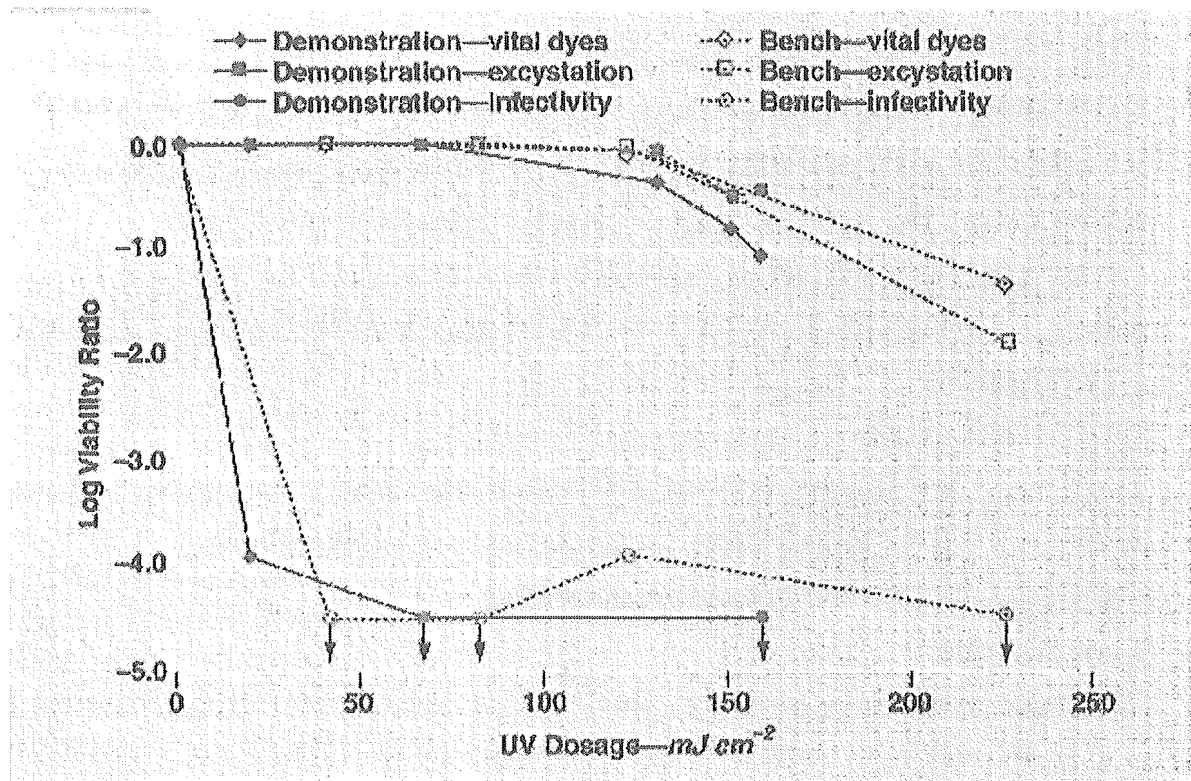
123mJ/cm<sup>2</sup>では、DAPI-PI 染色においては生存率が 66.3%に低下したが、脱嚢評価では不活化は認められなかった。一方、感染評価においては 1×10<sup>5</sup>個のオーシストを与えた 25 個体のマウスのうち、1 個体のみが感染するという結果が得られた。

246mJ/cm<sup>2</sup>では、DAPI-PI 染色においては 96.3%、脱嚢評価では 98.9%の不活化が認められた。一方、感染評価では 4.5log 以上の不活化が達成された。

### 3.2 実証規模実験

19 mJ/cm<sup>2</sup>と 66 mJ/cm<sup>2</sup>では、DAPI-PI 染色と脱嚢評価双方において不活化は認められなかったが、感染評価ではそれぞれ 3.9log と 4.5log 以上の不活化が認められた。159mJ/cm<sup>2</sup>では、DAPI-PI 染色と脱嚢評価において 1.1log の不活化が認められたが、感染評価では 4.5log 以上の不活化が認められた。

UV 線量と不活化率の関係



UVによる *Cryptosporidium* の不活化Using UV to inactivate *Cryptosporidium*

Jennifer L. Clancy ら

## 1. 摘要

ベンチスケールで中圧と低圧の UV ランプをオーシストに照射し、効果を比較した。UV は 3 ~ 33 mJ/cm<sup>2</sup> の範囲で照射し、評価はマウス感染法に拠った。結果より、3 mJ/cm<sup>2</sup> では、中圧ランプの場合、3.4 log の不活化が達成され、低圧ランプの場合、3.0 log の不活化が達成された。不活化効果について、両者の有意差は見られなかった。

## 2. 方法

## 2.1 UV 装置

UV 装置は 30W の低圧と 1kW の中圧ランプを用いた。UV は塩化ポリビニルの筒を通して照射されるようになっている。線量が 10 ~ 40 mJ/cm<sup>2</sup> の場合は、直径 6.4 cm で長さ 50 cm のチューブを用い、10 mJ/cm<sup>2</sup> 以下の場合は直径 6.4 cm で長さ 103 cm のものを用いた。

## 2.2 原水

脱イオン水

2.3 *C. parvum* オーシスト

3 週間以内の Iowa 分離株を用いた。オーシストの洗浄は Bukhari ら (1999) の方法に拠った。ペトリ皿 475 μL に約 1.4 × 10<sup>7</sup> 個のオーシストを懸濁させたものを UV 照射試験に用いた。

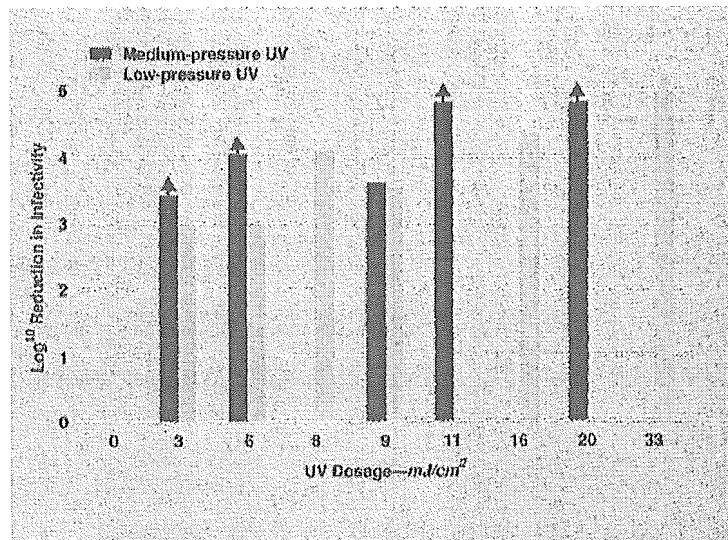
## 3. 結果と考察

中圧紫外線の場合、低線量 (3 ~ 9 mJ/cm<sup>2</sup>) で 3.4 ~ 4.0 log の不活化が達成され、高い線量 (11 と 20 mJ/cm<sup>2</sup>) では 133 個体のマウスが感染しなかった。これは 4.8 log の不活化に相当する。

低圧紫外線の場合、3、6、9 mJ/cm<sup>2</sup> で 3.0 ~ 3.5 log の不活化が達成された。16、33 mJ/cm<sup>2</sup> では、4.3 と 4.9 log 以上の不活化が達成された。

濁度 11 NTU の逆洗水を原水とした場合、中圧紫外線では 3 mJ/cm<sup>2</sup> で 4.5 log 以上の不活化が達成された。

*C. parvum* オーシスト不活化効果に対する中圧ランプと低圧ランプの比較



中圧紫外線に対する *Giardia muris* と *Cryptosporidium parvum* オーシストの  
抵抗性/回復に関する研究

Studies on the resistance/reactivation of *Giardia muris* and *Cryptosporidium parvum* oocysts  
exposed to medium-pressure ultraviolet radiation

Miodrag Belosevic ら

## 1. 摘要

異なる照射線量の中圧紫外線で、*Giardia muris* と *Cryptosporidium parvum* オーシストの回復について、感染評価によって生体外と生体内で調べた。UV 処理後直ちに、室温、暗条件にて *G. muris* は 1~4 日、*C. parvum* は 1~17 日保存した結果、生体外の実験では感染性の回復は起こらなかったが、生体内の実験では低い照射線量の場合 (<25mJ/cm<sup>2</sup>)、*G. muris* は独立した 7 回の実験のうち、3 回は感染性の回復が見られた。60mJ/cm<sup>2</sup> またはそれ以上の照射量では、*G. muris* シスト、*C. parvum* オーシスト共に抵抗性または回復性は見られなかった。これらの結果から、十分な線量を照射すれば不活化が確保できることが示された。

## 2. 方法

### 2.1 動物

8~10 週齢の C3H/HeN マウスを Charles River 研究室 (ケバック州セントコンスタン) より購入した。マウスは P2 レベルの病原体フリーで、滅菌した餌と水を任意に与えた。

### 2.2 原虫

*G. muris* の株は Roberts-Thomson から分離したものをを用いた。UV 処理実験では脱イオン水に保存したマウスから排出後 48 時間以内のものをを用いた。

*C. parvum* はホルスタインの子牛から排出された Iowa 株のものをを用いた。洗浄したオーシストは、抗生物質 (ストレプトマイシン 100µg/ml、ゲンタマイシン 100µg/ml、ペニシリン 100U/ml) を加えた 4℃の脱イオン水に懸濁させて保存した。

### 2.3 UV 照射実験

実験では浄水場の最終処理水に、微生物を除去するため 0.22µm の膜でろ過したものをを用いた。これに *G. muris* は 1~1.5×10<sup>5</sup>/ml、*C. parvum* は 1~1.5×10<sup>6</sup>/ml を懸濁させた。1kW の中圧紫外線を用い、線量率は SED240 UV インジケーターで測定した。

生体外の実験では試料は UV 照射後、50ml のプラスチック製遠沈管にて、約 20±2℃の暗状態で保管し、所定の期間後マウス感染に供した。生体内の実験では、遠沈管の試料は直ちに感染評価に供した。

### 2.4 実験の概要

*G. muris* についての生体外の実験では、UV の照射線量は 10、25、60、120、240mJ/cm<sup>2</sup> の条

件で行った。UV 処理後のシストは室温にて 1、2、4 日の条件で保存し、C3H/HeN マウスに  $10^4 \sim 10^5$  個経口摂取させた。摂取させたマウスは 8 日間連続的に糞を調べた。

*C. parvum* についての生体外の実験では、UV の照射線量は 10、60、240mJ/cm<sup>2</sup> の条件で行った。UV 処理後のシストは室温にて 1、2、3、4、14、17 日の条件で保存し、CD-1 新生マウスに  $10^5 \sim 10^6$  個経口摂取させた。対象系では UV 照射しないオーシストを 50 または 500 個摂取させた。

生体内での実験は *G. muris* のみ行った。理由は、新生マウスは成長と共に *C. parvum* に対する感受性が鈍くなり、摂取後 10~14 日後にオーシストを排出してしまうからである。*G. muris* の場合、アダルトのマウスであっても寄生体は成長・繁殖し、感染後 4~6 週経過後、完全に免疫適格になり排出する。実験は 5 回の対象系と UV 照射線量が 10、25、60、240mJ/cm<sup>2</sup> で行い、マウスには 10 または 100 個のシストを経口摂取させた。25mJ/cm<sup>2</sup> で処理したシストを摂取させたマウスのみ、一緒に容器に入れて飼育した。この際、マウス同士の感染が起らないようにした。他の条件のマウスは 1 個体あたり 1 つの容器に入れた。

それぞれのマウスについて、30 日まで 5 日おきに糞を採取し、シストの有無を調べた。今回の UV 照射線量 (>10mJ/cm<sup>2</sup>) では、2.5log 以上の不活化が期待される。マウスに摂取させた数が少ないことから、1 個または数個の感染性を有したシストが混入している可能性は少ない。このことから、感染性の発現はマウスの胃腸内で DNA の修復が行われたものであると判断することができる。

### 3. 結果

生体外の実験においては、17 日間までは *C. parvum* の回復は確認されなかった。また 1~4 日間での *G. muris* の回復も確認されなかった。

生体内の実験において、60 mJ/cm<sup>2</sup> と 240mJ/cm<sup>2</sup> を照射したシストは回復が確認されなかった。しかしながら、25mJ/cm<sup>2</sup> の場合、7 回の実験のうち 3 回で回復が確認された。また 30 日経過したシストを排出するマウスの場合、腸内に栄養体を有していた。30 日経過してもシストを排出しないマウスの場合、栄養体は見られなかった。

UV 処理した *G. muris* の生体内での回復結果

Exp. No.	DPI	UV dose versus animal infectivity (No. infected/total)							
		10mJ/cm <sup>2</sup>		25mJ/cm <sup>2</sup>		60mJ/cm <sup>2</sup>		240mJ/cm <sup>2</sup>	
		Control	UV	Control	UV	Control	UV	Control	UV
1	5	2/5 <sup>a</sup>	0/5 <sup>a</sup>	2/5 <sup>a</sup>	0/5 <sup>a</sup>	5/5 <sup>a</sup>	0/5 <sup>a</sup>	5/5 <sup>b</sup>	0/5 <sup>b</sup>
	10	5/5	0/5	5/5	1/5	—	0/5	—	0/5
	15	—	0/5	—	1/5	—	0/5	—	0/5
	20	—	0/5	—	1/5	—	0/5	—	0/5
	25	—	0/5	—	1/5	—	0/5	—	0/5
	30	—	0/5	—	1/5	—	0/5	—	0/5
2	5	2/5 <sup>a</sup>	0/5 <sup>a</sup>	2/5 <sup>a</sup>	0/5 <sup>a</sup>	4/5 <sup>a</sup>	0/5 <sup>a</sup>	5/5 <sup>b</sup>	0/5 <sup>b</sup>
	10	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	—	0/5
	15	—	0/5	5/5	0/5	—	0/5	—	0/5
	20	—	0/5	5/5	0/5	—	0/5	—	0/5
	25	—	0/5	5/5	0/5	—	0/5	—	0/5
	30	—	0/5	5/5	0/5	—	0/5	—	0/5
3	5	—	—	4/4 <sup>b</sup>	0/4 <sup>b, c</sup>	—	—	—	—
	10	—	—	—	0/4	—	—	—	—
	15	—	—	—	0/4	—	—	—	—
	20	—	—	—	2/4	—	—	—	—
	25	—	—	—	3/4	—	—	—	—
	30	—	—	—	4/4	—	—	—	—
4	5	—	—	4/5 <sup>b</sup>	2/5 <sup>b</sup>	—	—	—	—
	10	—	—	5/5	2/5	—	—	—	—
	15	—	—	—	2/5	—	—	—	—
	20	—	—	—	2/5	—	—	—	—
	25	—	—	—	2/5	—	—	—	—
	30	—	—	—	2/5	—	—	—	—
5	5	—	—	5/5 <sup>b</sup>	0/5 <sup>b</sup>	—	—	—	—
	10	—	—	—	0/5	—	—	—	—
	15	—	—	—	0/5	—	—	—	—
	20	—	—	—	0/5	—	—	—	—
	25	—	—	—	0/5	—	—	—	—
	30	—	—	—	0/5	—	—	—	—

DPI. Days post infection.

<sup>a</sup>Inoculum size was 10 cysts/mouse.

<sup>b</sup>Inoculum size was 100 cysts/mouse.

<sup>c</sup>Mice housed together during shedding period.



多色型の紫外線による *Cryptosporidium parvum* の不活化Disinfection of *Cryptosporidium oocysts* with polychromatic UV light

Alexander A. Mofidi ら

## 1. 摘要

多色型の UV 装置を使って *Cryptosporidium parvum* オーシストの不活化実験を行った。UV 装置は中圧で連続型とパルス型の二種類を用い、ヒト細胞培養感染法を使って評価した。パルス型では照射線量  $16\text{mJ}/\text{cm}^2$  で  $2\log$  以上の不活化が達成された。パルス型と中圧型の双方共、 $7.5\text{mJ}/\text{cm}^2$ 、 $11\text{mJ}/\text{cm}^2$  で不活化率はそれぞれ、 $1\log$ 、 $2\log$  となった。また従属栄養細菌と *Escherichia coli* でも不活化実験を行った結果、従属栄養細菌の線量に対する不活化率の応答は *C. parvum* と異なっていたが、*E. coli* の場合は違いが見られなかった。このことは、*E. coli* が *C. parvum* 不活化の代替指標となる可能性があることを示唆するものであると考えられた。

## 2. 方法

## 2.1 中圧ランプ

1kW の中圧ランプは直径 6.4cm、長さ 127cm の PVC 製チューブに装填され、60mm のポリメチルペンテン製のペトリ皿に入れたサンプルに照射できるようになっている。サンプル連続的に攪拌され、容量は 10mL で深さは 0.5cm である。

## 2.2 パルス型ランプ

2mL の *C. parvum* 懸濁水を入れたキュベットを、直径 36cm、高さ 56cm の円筒型チャンバーにランプを組み込んだパルス照射装置に装填し、照射した。

2.3 *C. parvum* の評価

国立動物疾病センター由来の genotype 2 Iowa を子牛に感染させたものをアリゾナ大学獣医学部から得た。

子牛から得たオーシストは、スクロースと塩化セシウム中で遠心分離させて洗浄し、その後 0.01% のポリオキシエチレンソルビタン モノラウレートを加えた抗生物質溶液（ペニシリン  $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ストレプトマイシン  $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ゲンタマイシン  $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で保管した。その後、南カリフォルニア都市圏水供給公社の水質試験所にて  $4^\circ\text{C}$  にて保管し、2 週間以内に実験に供した。オーシストはさらに磁気ビーズを使った免疫磁気分離で精製し、血球計数器で計数した。脱囊率は Robertson and Campbell (1993) の方法を改良したもので求めた。実験では脱囊率が 90% 以上の試料のみ用いた。

オーシストを懸濁させた原水は、オゾン-凝集-沈澱-生物ろ過処理水を用いた（表 1）。

*C. parvum* の感染性の評価は、Rochelle ら (1997) の方法を改良した細胞培養感染法で行った。

表1 不活化実験に用いた原水水質

パラメータ	単位	平均値または範囲
pH		8.1
UV254nm 吸光度	cm <sup>-1</sup>	0.03~0.06
透過率	%	83~93
硬度	CaCO <sub>3</sub> として mg/L	230~308
濁度	NTU	0.06~0.20

### 3. 結果

パルス照射では、 $3.0 \pm 0.1 \text{ mJ/cm}^2$  で *C. parvum* が  $1.0 \pm 0.8 \text{ log}$  (平均 $\pm$ S.D.) であった。従属栄養細菌でも同様の変動幅が見られ、これは他の消毒試験で報告されているものと同程度である (Wolfe et al, 1985)。*C. parvum* と従属栄養細菌の不活化は同じような傾向を示したが、統計的には異なっていた。

中圧ランプでは、 $4 \text{ mJ/cm}^2$  で *E. coli* が  $1.0 \text{ log}$  ( $R^2=0.93$ ) であった。これは他の研究者の結果と同程度である。*C. parvum* については、 $3.0 \pm 0.3 \text{ mJ/cm}^2$  で  $1.0 \pm 0.8 \text{ log}$  であった。

結果は UV による *C. parvum* の不活化を査定するのに、*E. coli* が代替となる可能性を示している。

パルス照射と中圧の両方の結果より、低い方の 95% 予測値から、 $1.0 \text{ log}$  と  $2.0 \text{ log}$  を達成する不活化線量は、それぞれ  $7.5 \text{ mJ/cm}^2$  と  $11 \text{ mJ/cm}^2$  であることがわかった。

### 4. 結論

異なった子牛から排出されたオーシストでも実験する必要がある。異なった子牛から排出されたオーシストは感染力も異なることが報告されている。

ホストの感染に対する感受性や、ロットや分離の違いによっても感染力の結果に差が出る。中圧ランプでは、*C. parvum* と *E. coli* の UV に対する応答に統計的な有意差はなかった。

図1 パルス型ランプによる *C. parvum* と従属栄養細菌の不活化

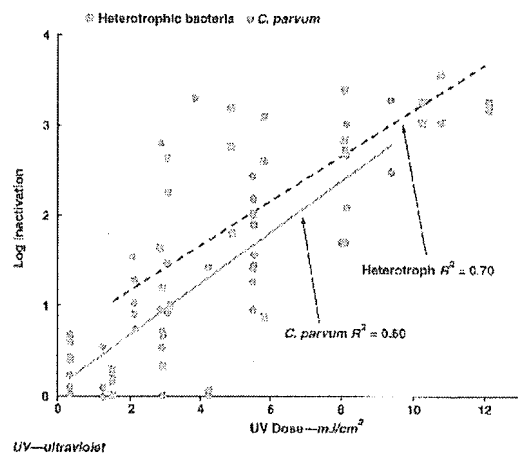


図2 中圧型ランプによる *E. coli* と *C. parvum* の不活化

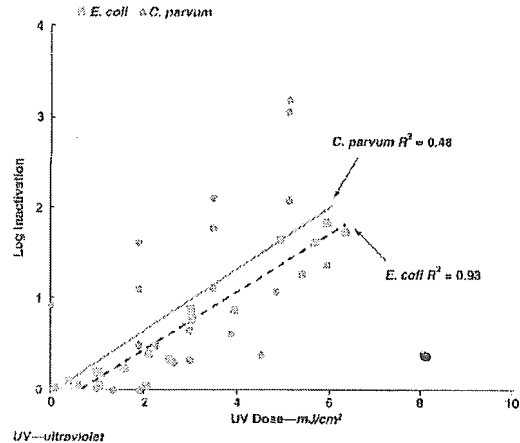
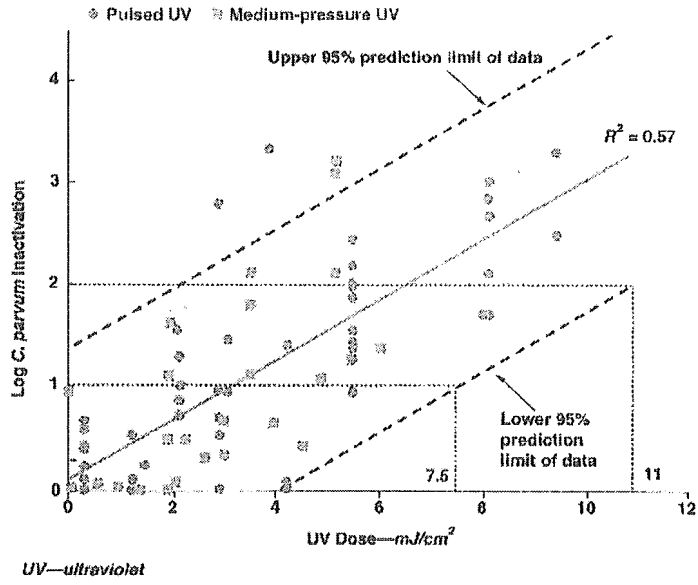


図3 多色型ランプによる *C. parvum* の不活化



低圧紫外線による *Cryptosporidium parvum* の不活化と DNA 修復能についてLow-pressure UV inactivation and DNA repair potential of *Cryptosporidium parvum* oocysts

Gwy-Am Shin ら

## 1. 摘要

低圧水銀ランプの *Cryptosporidium parvum* に対する不活化効果と、DNA 修復能を調べた。洗浄したオーシストをリン酸緩衝塩 (pH7.3、25°C) に懸濁させ、低圧紫外線を照射した。実験の結果、細胞培養法による評価で  $3\text{mJ}/\text{cm}^2$  で 3log の不活化が達成された。また、 $1.2\text{mJ}/\text{cm}^2$  と  $3\text{mJ}/\text{cm}^2$  照射したオーシストについて、暗回復も明回復も確認されなかった。

## 2. 方法

## 2.1 オーシスト

Pat Mason, Pleasant Hills Farm, Troy, Idaho より購入した Iowa 株の *C. parvum* オーシストを用いた。

子牛に感染させて3日目からオーシストを毎日採取した。分離・精製はスクリーンでふるいにかけて後、不連続型蔗糖勾配、塩化セシウム (1.15g/mL; 比重 1.15) 密度勾配法によって行った。オーシストはリン酸緩衝塩 (pH7.2) で洗浄し、1,000U/mL のペニシリンと 1,000mg のストレプトマイシンを混入した4°Cのリン酸緩衝塩に懸濁させた。

## 2.2 UV 照射装置

装置には2つの15W 殺菌用低圧水銀ランプが装填されており、253.7nm の紫外線が照射されるようになっている。線量の測定はUV254 検出器を用いた。

## 2.3 UV 照射実験

5mL のリン酸緩衝塩に *C. parvum* オーシストまたは MS2 バクテリオファージを  $10^6/\text{mL}$  の濃度で懸濁させ、室温にてスターラーでゆっくり攪拌させて UV 照射した。

## 2.4 DNA 修復実験

1.2 または  $3\text{mJ}/\text{cm}^2$  照射した試料を直ちにアルミホイルで包み、25°C と 37°C で保存した。明回復の実験では、15W の蛍光ランプを 25~50cm の距離から当てた。暗回復の実験ではアルミホイルで包んだままとし、バクテリアや哺乳類の細胞が UV のダメージから回復する一般的な条件である、25°C の 2~4 時間と、37°C の 1~2 時間で保存した。評価は細胞培養法で行った。

## 2.5 評価方法

マウス感染法；一週齢未満の BALB/c の新生マウスを用いた。

細胞培養感染法；Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell culture (ATCC CCL-34) に依った。

## 3. 結果

低圧紫外線  $2\text{mJ}/\text{cm}^2$  で *C. parvum* の不活化は、細胞培養感染法とマウス感染法でそれぞれ、 $1.7\log$  と  $1.5\log$  であった。両者の間に有意な差はなかった。

MS2 との比較では、*C. parvum* の場合  $3\text{mJ}/\text{cm}^2$  で検出限界の  $3\log$  に達したのに対し、MS2 の場合  $30\text{mJ}/\text{cm}^2$  で  $2\log$  不活化であった。

$1.2\text{mJ}/\text{cm}^2$  と  $3\text{mJ}/\text{cm}^2$  を照射したオーシストは明回復も暗回復も認められなかった。

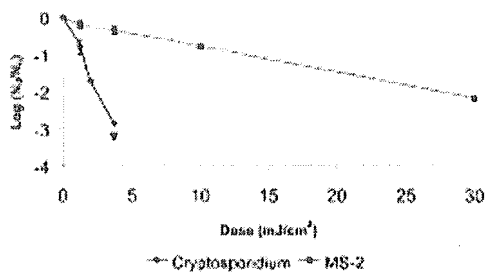


FIG. 1. Kinetics of inactivation of *C. parvum* and coliphage MS2 by monochromatic LP UV radiation. Error bars indicate ranges of data from two to five replicate experiments per dose. —, detection limit.

TABLE 2. Effects of dark and light repair conditions on infectivity of *C. parvum* oocysts dosed with 1.2 and 3 mJ LP UV/cm²

Dose and condition	Mean log <sub>10</sub> <i>C. parvum</i> reduction (STD)		
	Control	Dark	Light
<b>1.2 mJ/cm²</b>			
37°C, 1 h	0.8 (0.21)	0.8 (0.21)	0.9 (0.21)
37°C, 2 h	0.8 (0.08)	1.7 (0.86)	1.0 (0.35)
25°C, 2 h	0.8 (0.21)	0.9 (0.20)	1.0 (0.25)
25°C, 4 h	0.7 (0.04)	1.4 (0.30)	0.9 (0.18)
<b>3 mJ/cm²</b>			
37°C, 1 h	>2.6	>2.6	>2.6
25°C, 2 h	>2.6	>2.6	>2.6

\* Average values of duplicate or triplicate experiments.

紫外線装置性能を検証する場合にクリプトスポリジウムと MS2 のバイオアッセイが  
及ぼす影響

Comparing Cryptosporidium and MS2 Bioassays implications for UV reactor validation

Erin.D.Mackey ら

1. 概要

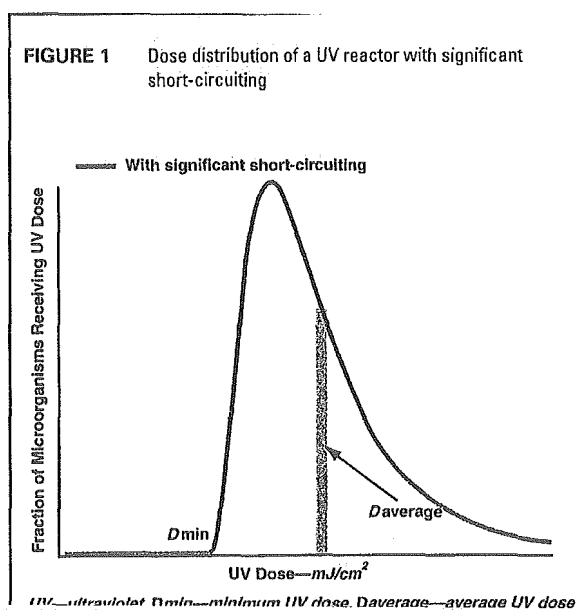
本研究は、MS2 大腸菌ファージを使用して高出力低圧紫外線ランプ(LPHO)を用いた際の紫外線装置におけるクリプトスポリジウムの不活化の検討を行った。

2. 概説

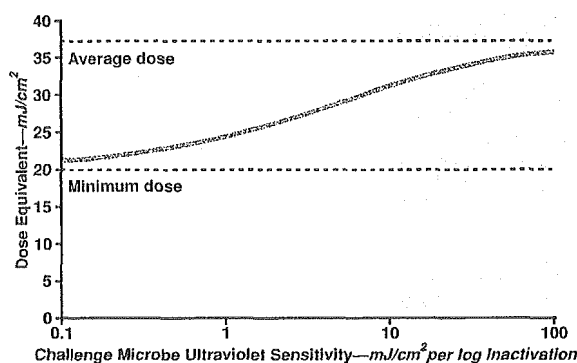
2.1 紫外線装置内の UV 線量

微生物が紫外線装置内を通過する場合、受ける線量は水理条件にもよるが、Fig.1 に示すようにある程度の幅をもつ。

処理水の短絡が生じるにつれ、その幅は広がる。流体力学モデルを使用すれば線量の分布を予測することは可能であるが、現状では、通常の方法を用いて、線量の分布を計測することはできない。紫外線装置内の紫外線分布は、指標となる微生物を装置内にいれることで、指標となる微生物の不活化率より、基礎データを用いて、紫外線量を想定することができる。この線量を、等価的評価線量 (dose equivalent) と呼ぶ。等価的評価線量と理論式により導いた紫外線量を fig.2 に示す。Fig2 に示すように、等価的評価線量は、理論式の最小線量と平均線量の間を示し、微生物の紫外線耐性が強まるにつれ、増加する傾向にある。即ち、装置内性状が不明確である場合、ある一つの微生物で得られた等価的評価線量を、他の微生物に適用することは、同一線量における両者のバイオアッセイ結果がない限り、で



**FIGURE 2** Relationship between measured dose-equivalent value and challenge microbe sensitivity for the dose distribution shown in Figure 1



きないということである。実験を行う微生物が、除去対象とする病原性微生物より紫外線耐性を持つ場合、実験を行う微生物のバイオアッセイ試験は、除去対象となる病原性微生物の必要不活化率を示すものとなる。

## 2.2 紫外線装置内の UV 線量

下記の理由にて、クリプトスポリジウムの不活化率を評価する際に、クリプトスポリジウムオーシストを用いるより、代替の微生物を用いた方がよいと思われる。

- ① 健康上の影響のため
- ② 哺乳類の宿主を用いたクリプトスポリジウムオーシストの増殖には限界があり、他の微生物では、培地を用いた増殖が可能である。
- ③ クリプトスポリジウムの感染性試験に必要なコストが、他の微生物試験に比べ、非常に高い。

## 3. 方法

### 3.1 実験装置

本実験は、Champlain Water District 浄水場の最終処理水に、残塩を消すために重亜硫酸塩を加え、行った。実験装置は、Fig.3 のように、6 本の LPHO ランプを設置した。本実験装置は稼動後約 2800 時間を経過したものを使用している。石英スリーブは無機物の析出物を除去するため、燐酸によって洗浄を行った。

Fig.4 に実験装置のフローを示す。流量は 757L/分であり、残留塩素を消すために 150mg/L の重亜硫酸ナトリウムを 60mL/分にて注入を行い、一段目のスタティックミキサーにて攪拌を行った。

クリプトスポリジウムオーシストの注入試験を行う場合は、100ml のメシリンダーよりダイアフラムポンプにて注入を行い、2 段目のスタティックミキサーにて攪拌を行い、1.0 $\mu$ m のポリカーボネートフィルタにより、オーシストを回収した。オーシストの注入終了後、2 分間通水した後、フィルターの回収を行った。また、process control 実験として、 $7 \times 10^8$  個のオーシストを紫外線照射が無い条件にて注入実験を行った。

FIGURE 3 Schematic of the LPHO reactor configuration

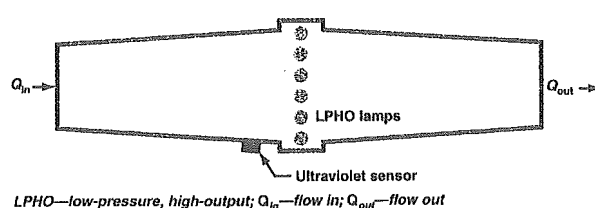
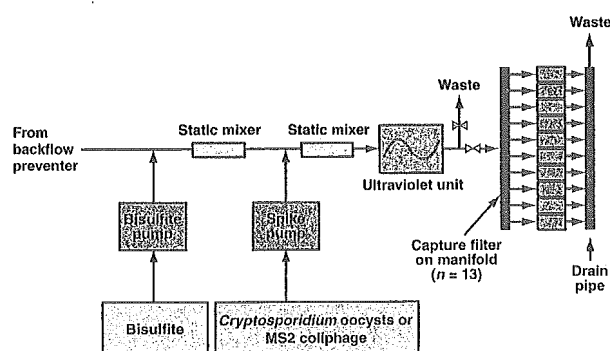


FIGURE 4 Schematic of the pilot-plant installation at Champlain Water District, South Burlington, Vt.



MS2 の注入実験を行う場合には、バルブレスのピストンポンプを用いて注入を行い、排水は、放流した。原水側の MS2 の注入濃度は  $6.50 \times 10^4$  pfu/mL、 $2.51 \times 10^4$  pfu/mL、 $4.05 \times 10^4$  pfu/mL である。各試験において、入り口側で 1 つ、出口側で 3 つサンプルを採取した。また、平行ビームの研究のため、1L の塩素フリーの水を採取した。また、別途、重亜硫酸の添加効果及び MS2 点かによる透過率の影響を見るため、低流量(568L/分)の実験におけるサンプルを回収した。

### 3.2 試料準備

クリプトスポリジウムは、Arizona 大学の Sterling 寄生生物学研究室の生後 1 ヶ月以内の子牛由来の Harley Moo 株を使用した。 $1.3 \times 10^9$  個のクリプトスポリジウムを 30 秒間攪拌し、リンス水も含め、100mL にメスアップを行った。

MS2 は New Hampshire 大学の環境研究グループより入手した。MS2 増殖用の培地としては、E.Coli, F-amp strain(E.coli3000 にストレプトマイシン-アンピシリン耐性プラスミドを添加したもの)を使用した。 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$  MS-2 を培養液トリプシン Soy-E 500mL に添加した。本培養液は、1.5mg/L ストレプトマイシン及び 1.5mg/L アンピシリン及び 1%塩化マグネシウム溶液を 2.5mL 添加した。本培養液は 37 度にて 12~18 時間培養した後、クロロフォルムの 50 倍希釈液を大腸菌細胞に添加した。その後 10 分間、10000rpm にて遠心分離を行った。MS2 ストックは、 $7.8 \times 10^9$  pfu/mL に現地にて調整した後、塩素フリーの水にて 3 倍に希釈した。

### 3.2 分析

クリプトスポリジウムの試験は、回収したポリカーボネートフィルタは 80% 0.1M 磷酸緩衝マグネシウム塩及び 20%ICR 溶離液を含む溶液を用い、ストマッカーバッグにて、オーシストの回収を行った。その後、1050×g で 15 分遠心分離を行い、1mL に濃縮した。その後、サンプルを冷蔵便にて Sterling 寄生生物学研究室に送付し動物感染性試験を行った。オーシストの活性は 4~6 日令の異系交配の CD-1 マウスを用いて行い、濃度計測には明視野の血球算定器を用いた。マウス一匹につき、紫外線処理したオーシストは  $1 \times 10^3$  及び  $6 \times 10^5$  個、process control のオーシストは  $5 \times 10^2$  個を感染させ、感染 7 日後に回腸終端部を用いて、感染性の有無を判断した。感染性には以下のモデルが成立する。

$$\text{response logit} = m \times \log(\text{organism dose}) + b$$

ここで、response logit は、 $\ln(p/1-P)$ (p: 感染したマウスの割合)であり、organism dose は、マウスに感染させたオーシスト量である。

MS2 の試験は、New Hampshire 大学の環境研究グループにより行った。各希釈列 0.1ml を E.coli-栄養寒天培地に加え、培養を行った。培養後、MS2 のプラーク数により、MS2 濃度を決定した。

### 3.4UV 線量モデル



平行ビーム紫外線の実験は、New Hampshire 大学にて流入水に MS2 大腸菌ファージを加え、紫外線実験を行って 1 日以内に実施した。本実験では、同一条件にて、紫外線量と微生物の不活化率の相関関係を計測するものであり、下記の式が得られる。

$$\text{Log}(\text{MS2 不活化率})=m \times (\text{MS2 等価的評価線量})+b$$

#### 4 結果と考察

予想通り、MS2 若しくは重亜硫酸塩を加えたことによる透過率の変化は計測されず、常に 0.27(1/mm)であった、UV 強度センサーも 13.5~14.5W/m<sup>2</sup>と一定であった。

クリプトスポリジウムの実験結果を table1 に示す。その結果。

$$\text{response logit} = 3.611 \times \log(\text{organism dose}) - 6.752$$

というモデル式が得られた。

TABLE 1 Infectivity results for the *Cryptosporidium* challenge

Parameter	LPHO* Bioassay Test		Process Control	Trip Control
Administered number of oocysts	5.7 × 10 <sup>5</sup>	1.0 × 10 <sup>3</sup>	5.0 × 10 <sup>2</sup>	1.3 × 10 <sup>2</sup>
Total mice	18	22	22	22
Mice infected	<1	<1	20	12
Percentage of mice infected	<5.6	<4.5	91	55
Infective oocysts per inoculum	<12	<11	320	80
Log inactivation	>4.7	>2.0	0.19	0.20

\*LPHO—low-pressure, high-output

Trip control と process control 中のマウスの感染率を比較すると、後者の方が高く、初期マウスへの接種量を考え、上記モデル式を用いると、実験、回収、分析の手順を踏むことによる感染性に変化は見られなかった。

対照的に、紫外線照射を行ったオーシストは、感染性は確認されず、不活化率は少なくとも 4.7log 以上であった。

MS2 の感染性試験において、最終処理水若しくは脱イオン水を用いて MS2 を希釈しても、両者に感染力の差異は見受けられない。また、MS2 注入開始時、終了時の濃度を計測したところ、流量 568L/分、1136L/分、ではそれぞれ 6.7×10<sup>4</sup>pfu/L、4.0×10<sup>4</sup>pfu/L と一定であった。

UV 線量モデルでは下記の式が R<sup>2</sup>=0.99 で成立した。

$$\text{Log}(\text{MS2 不活化率})=0.040 \times \text{MS2 等価的評価線量} + 0.010$$

設定流量における MS2 の不活化データは table2 に示す。予想通り、流量が増加するにつれ、不活化率も減少し、流量 1137L/分、757L/分、568L/分の際の MS2 等価的評価線量は、59mJ/cm<sup>2</sup>、45mJ/cm<sup>2</sup>、30mJ/cm<sup>2</sup>であった。

LPHO ランプと用いたクリプトスポリジウムの不活化に関する明確な知見は今まで得られていないが、LP ランプと波長特性は同じであるので、殺菌効果も LP ランプと同程度(6mJ/cm<sup>2</sup>で

3.5log 以上の不活化等)が得られた。

同一条件下で、MS2 等価的評価線量が 45mJ/cm<sup>2</sup> の条件下で、クリプトスポリジウム及び MS2 はそれぞれ、>4.7log、1.9log の不活化を達成した。本結果は Mackey ら(2000)の結果と合致するものである。

上記より、MS2 はクリプトスポリジウムより紫外線耐性を持つため、クリプトスポリジウムのサロゲート指標として用いることが可能であり、40mJ/cm<sup>2</sup> で 2log(実際には 4.7log 以上)の不活化を実証することができる。

TABLE 2 Measured log inactivation of MS2 and the corresponding calculated MSE\*

Sample Description	Replicate	Measured MS2 Value <i>pfu/mL</i>	Log Inactivation of MS2	Calculated MSE Dose <i>mJ/cm<sup>2</sup></i>
Influent at 568 L/min (150 gpm)	1/1	6.5 × 10 <sup>4</sup>		
Effluent at 568 L/min (150 gpm)	1/3	2.5 × 10 <sup>2</sup>		
	2/3	1.7 × 10 <sup>2</sup>		
	3/3	2.5 × 10 <sup>2</sup>		
Average		2.2 × 10 <sup>2</sup>	2.5	59
Influent at 757 L/min (200 gpm)	1/1	2.5 × 10 <sup>4</sup>		
Effluent at 757 L/min (200 gpm)	1/3	3.2 × 10 <sup>2</sup>		
	2/3	3.7 × 10 <sup>2</sup>		
	3/3	2.8 × 10 <sup>2</sup>		
Average		3.2 × 10 <sup>2</sup>	1.9	45
Influent at 1,136 L/min (300 gpm)	1/1	4.1 × 10 <sup>4</sup>		
Effluent at 1,136 L/min (300 gpm)	1/3	1.9 × 10 <sup>3</sup>		
	2/3	2.2 × 10 <sup>3</sup>		
	3/3	2.0 × 10 <sup>3</sup>		
Average		2.0 × 10 <sup>3</sup>	1.3	30
Influent at 1,136 L/min (300 gpm), lamps off	1/1	4.0 × 10 <sup>4</sup>		NA‡
Effluent at 1,136 L/min (300 gpm), lamps off	1/3	3.9 × 10 <sup>4</sup>	0.01	NA

\*MSE—MS2 equivalent  
 †pfu—plaque-forming units  
 ‡NA—not applicable

## 5. 結論

クリプトスポリジウムより紫外線耐性を持つ MS2 を用いて、紫外線装置のクリプトスポリジウムの不活化性能を評価することは可能である。しかし、MS2 バイオアッセイ試験方法を用いて、正確なクリプトスポリジウムの不活化率を算出することはできない。今後、より正確なデータ収集及び、クリプトスポリジウムと同程度の紫外線耐性をもつサロゲート指標となる微生物の発見が必要である。

中圧及び低圧の紫外線照射による *Cryptosporidium parvum* oocysts の不活化

INACTIVATION OF CRYPTOSPORIDIUM OOCYSTS USING MEDIUM-AND  
LOW-PRESSURE ULTRAVIOLET RADIATION

STEPHEN.A.CRAIK ら

## 1. 概要

*Cryptosporidium parvum* オーシスト に対する低圧及び中圧の水銀アークランプによる UV 照射の効果について、コリメイトビーム装置を用いて調べた。

実験はろ過した表流水とリン酸で緩衝した試験質の水を使って行った。オーシストの不活化は CD-1 新生マウスを用いて感染の減少として測定した。その結果、テストした 0.8~119mJ/cm<sup>2</sup> の範囲では、殺菌力のある UV 照射線量と感染の減少との間には直線的な相関は認められなかった。オーシストの不活化は 25mJ/cm<sup>2</sup> 以下の紫外線照射により急激に増加し、不活化率は 10mJ/cm<sup>2</sup> と 25mJ/cm<sup>2</sup> とでそれぞれ 2log, 3log であった。高いレベルの照射線量において紫外線不活化曲線が水平になり、テーリングを起こす原因については不明である。オーシスト不活化の最大測定値は 3.4~4.9log であり、寄生生物の違いに依存していた。

水のタイプや水温、懸濁しているオーシストの濃度や UV 照射等はオーシストの不活化に対して大きな影響力を持っていなかった。殺菌力のある UV 照射の基礎的な比較において、オーシストは低圧と中圧の UV 照射に対して感度的に同等であった。*Cryptosporidium* については、低圧と中圧のいずれの UV 照射も、浄水処理における従来の薬品消毒方法に代わる魅力ある消毒方法といえる。

## 2. 方法

### 2. 1 UV 照射装置

ガラス製のペトリ皿 (φ56mm×12mm high) に寄生虫の懸濁液を入れ、UV を照射する。

UV ランプ: 1kW 中圧UVランプ

10W 低圧UVランプ

collimated beam apparatus : UV ランプの下に直接セットする

中圧ランプで低照射線量試験をする場合には、φ60mm×930mm の長いプラスチック製のコリメイトチューブの 280mm 下に寄生虫懸濁液を置き照射した。中圧ランプや低圧ランプでの高い線量試験の時は、240mm の長さのコリメイトチューブの 10mm 下に寄生虫懸濁液をセットした。UV 照射期間は UV ランプの下のコリメイトチューブの上部に置かれた空気圧によるシャッターとストップウォッチにより調節した。

### 2. 2 UV 照射の測定

ペトリ皿の溶液の表面で、かつ UV ビームの中心において UV 照射線量を測定した。

$$\text{UV Dose (H or Hg)} = \text{Irradiance (E or Eg)} \times \text{Exposure time (t)}$$

$$\text{mJ/cm}^2 \quad = \text{mW/cm}^2 \quad \times \quad \text{s}$$

### 2. 3 供試水と実験条件

ほとんどの実験は室温 (20~22°C) で行われた。供試水は Mannheim Water Treatment Plant (WTP), Kitchener, Ontario, Canada からの水道水と、リン酸で緩衝した試験室の水をろ過して使用した。

Mannheim Water Treatment Plant の浄水処理方式は下記の通りである。

地下水→前オゾン→凝集→フロクキュレーション (緩速混和) →沈殿→急速砂ろ過→浄水

代表的な水質は Table1 に示すとおりである。

0.05Mのリン酸で pH7 又は 8 のいずれかに緩衝された試験室の水は、試薬グレードのオルトリン酸二水素カリウムとオルトリン酸一水素二ナトリウムで調製した。試験室の室温と水温は 30~31°Cであった。

他の実験では、UV 照射の直前にペトリ皿やオーシスト懸濁液をアイスバスで 4°Cに冷却した。

**Table 1. Typical characteristics of the Mannheim water treatment plant filtered water**

Parameter	Unit	Value
Turbidity	ntu	<0.15
Transmittance at 254 nm	%	91
Total hardness	mg/L	240
pH		7.3
Total organic carbon	mg/L	3
Alkalinity	mg/L	170
Chloride	mg/L	45
Iron	mg/L	<0.01
Manganese	mg/L	<0.01
Nitrate as N	mg/L	3.5
Nitrite as N	mg/L	<0.005

\*Note: Information from (Bukhari *et al.*, 1999).

### 2. 4 Cryptosporidium oocysts 供給先

この研究に用いた *C. parvum* oocysts は Dr. Harley Moon (National Animal Disease Control Center)から入手したものであり、これは Iowa 株として知られている。

ホルスタインの子牛から採取し精製した *C. parvum* oocyst について以前報告した方法が、紫外線照射実験に用いられた。生後 2~4 日の子牛に *C. parvum* oocysts を感染させ、電解液の食事で飼育した。子牛から集められた糞便は先ず 400~75µmのこし器を通す。オーシストは塩化セシウム溶液の濃度勾配遠心分離によりこし器を通した糞便から精製される。

### 2. 5 オーシスト試料の調製, UV照射, 収集, 濃縮

オーシストの懸濁液は、Milli-Q システムで精製された脱イオン水 0.50mL に  $14 \times 10^6 \sim 40 \times 10^6$  含まれている。ストック懸濁液中のオーシストは、Milli-Q 水で洗浄され、遠心分離 (14,500×g 10min.) により濃縮され、赤血球計数器により計数された。

### 2. 6 新生児 CD-1 マウスの感染

*C. parvum* の感染の評価には、新生児マウスが用いられた。