

微生物を不活化する際の白色パルス光の効果

Efficacy of Pulsed White Light to inactivate microorganisms

Debra E,Huffman ら

1. 摘要

白色パルス光によるバクテリア、ウイルス、原生動物の不活化実験を行った。また、*Cryptosporidium* の不活化評価は DAPI/PI 法、脱嚢法、細胞培養感染法、動物感染法にて行った。実験結果より、EPA が定めたバクテリア、ウイルス、原生動物の不活化基準を白色パルス光装置によって、満たすことが確認された。

2. 方法

2.1 白色ランプ装置

水は脱塩処理した水道水(type1、通常の水質)と脱塩処理した水道水に全溶存固形物量 500mg/L、10NTU の濁質、2.5mg/L 以上の TOC を加えた水(type3、水質悪化時を想定)を使用した。試料水は、4gallon/分の一定流速で白色光装置内に供給した。

2.2 装置の運転管理

3つの装置に1基あたり、4gallon/分の試料水をポンプにより供給した。3系列において不活化実験を行い、一つの系にては繰り返し、バクテリアファージとクリプトスポリジウムの不活化実験を行った。type1、type3の水に関して3回ずつ実験を行い、微生物及びサンプルの採取及び48時間経過後の水を集めた。また、実験として、*poliovirus* 及び *rotavirus* の不活化実験を type1、type3の水に対して、計2回行った。濃度は $10^3 \sim 10^5$ PFU/L である。*Cryptosporidium* の不活化の再評価を行った。type1、type3の水に対して、 10^4 oocyst/ml を添加した実験を計2回行った。

2.3 微生物添加

20gallon の水に微生物を添加し、均一になるよう 5 分間攪拌した。試料水は各ユニットに 4gallon/分にてポンプにて供給し、12-14gallon の水を処理した後、流入及び流出水を 1L 採水した。

2.4 微生物の準備及び評価

Klebsiella Terrigena(ATCC#33257)

50mL の TSB 溶液に摂取し、定常相に達するまで一晩攪拌しながら、培養を行った。試料水の分析は m-Endo 寒天培地(Difco)を用いたメンブランフィルター法による。

Bacteriophage MS-2(ATCC#15597B)及び *PRD-1*

E. Coli(ATCC#15597)と *Salmonella*(ATCC#19585)より準備した。分析は両者とも、採取後すぐに寒天二重層法を用いて分析した。

Poliovirus type1, Simian rotavirus SA11

Poliovirus, rotavirus はフロリダ大学の Dr.S.Faeeah より入手し、Buffalo green monkey (BGM)kidney 細胞株により培養した。Rotavirus の懸濁液は、poliovirus と同様、MA104 細胞株以外のもを使用した。

流入水はフィルター滅菌し、1ml を滅菌した PBS 溶液にて 10^{-7} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、に希釈して、BGM 若しくは MA104 の単層法により分析した。処理水はフィルター滅菌後、1ml 及び 10ml を 25cm^2 のフラスコに BGM 若しくは MA104 の単層法により分析した。

Poliovirus を含む試料は 45 分間 BGM 細胞単層上にて培養した。2%の新生の子牛の血清、1.2%の寒天、0.001%のニュートラルレッドを加えた Minimum Essential Media(MEM)フラスコに加え 3 日間培養した。そのプラックを計数し、濃度(PFU/mL)を決定した。

Rotavirus を含む試料は 45 分間 MA104 の単層法により培養した。Serum free の MEM 培地に L-グルタミン、抗生物質、トリプシンをフラスコに添加し、37 度の CO₂ インキュベーターにて 1 週間培養した。流入及び流出の濃度測定には、最確数法を用いた。

Cryptosporidium parvum oocyst は Idaho 主の Pleasant Hill Farm の感染した子牛の糞便より精製した。Oocyst は 4 週令であり、4-7°Cにて保存した、原水と処理水(50ml, 1L)は 1050xg を 10 分間の遠心分離によって濃縮された。浮遊物は吸引により除去した。

2.5 活性及び感染性試験

oocyst の活性及び感染性透試験は DAPI/PI 法、脱嚢法、細胞培養感染法、動物感染法の 4 種類が用いられてきた。DAPI/PI 法は Campbell らの、脱嚢法は korich ら、細胞培養法は最確数法を用いた。また、本論文にて用いた、動物感染法は Dr.Mike Arrowood により行われ、新生の Balb-C のマウスを用いて行われた。生後 5 日後のマウスに $25\mu\text{L}$ を濃度別に経口投与した。各濃度別に 5~10 匹のマウスを用意した。感染 7 日後に 3cm 程の回腸終端部を取り出し、2.5%の重クロム酸カリウムに浸し、不連続型シヨ糖勾配法によりオーシストの分離を行った。サンプルは、イソチオシアン酸フルオレセイン(OW50-FITC)と共役の *Cryptosporidium* oocyst の単クローン性の抗体とともに培養し、血球計数器にて計数した。腸は重クロム酸カリウム液中にてホモジナイズし、上記と同様の分析を行った。後者の試験法は、1 体ごとでは見落とす可能性のある少量の oocyst を検出するためのものである。活性のあるオーシストは最確数法によって計数した。

3. 結果

白色光により *Klebsiella terrigena* は 7.79log 不活化され、その結果を table1 に示す。何れのユニットのデータからも、UV 処理後の感染性の回復は見られなかった。

Bacteriophages MS-2 と PRD-1、enteroviruses、poliovirus は 4log 以上不活化され、その結果を table2、3 に示す。

Cryptosporidium oosyst の不活化率を DAPI/PI 法、脱囊法、細胞培養感染法、動物感染法を用いた評価を table4-9 に示す。

4. 結論

白色パルス光により EPA ガイドライン中のバクテリアの 7log 不活化、ウイルスの 4log 不活化、原生動物の 3log 不活化の基準を満たすことが確認された。また、平均水質及び汚い水質に関しても同様に効果があることが確認された。また、不活化の評価方法に関して以下のことが言える。

- ①スποロゾイトに活性があり、損傷を受けていないように見える場合でも感染性を失っている場合があるので、脱囊法と DAPI/PI 法による不活化の評価には、制限がある。
- ②細胞培養感染法は、スποロゾイトの宿主細胞への侵入及び感染能力を測定するものであり、脱囊法及び DAPI/PI 法より高い不活化率を示すことになる。
- ③細胞培養感染法と動物感染法を比較した場合、相関がみられる。

今までは、動物感染法が最も基準となる検査方法とされてきたが、細胞培養感染法において、Cryptosporidium の不活化を評価するのに、安価で手軽な方法は細胞培養感染法であるといえる。

Table 1. Inactivation of *Klebsiella terrigena* by the PureBright unit

Day #	unit #	Average* influent/mL Challenge	Effluent/mL	Log ₁₀ Inactivation
1	1	2.5 x 10 ⁵	< 0.01	7.40
1	2	3.0 x 10 ⁵	< 0.01	7.48
1	3	2.5 x 10 ⁵	< 0.01	7.40
3	1	2.3 x 10 ⁵	< 0.01	7.36
3	2	2.5 x 10 ⁵	< 0.01	7.40
3	3	2.1 x 10 ⁵	< 0.01	7.32
5 **	1	< 10 ⁵	< 0.01	≤ 7.0
5 **	2	< 10 ⁵	< 0.01	≤ 7.0
5 **	3	< 10 ⁵	< 0.01	≤ 7.0
post 48hr. stagnation				
	1		< 0.01	
	2		< 0.01	
	3		< 0.01	
6	1	1.1 x 10 ⁵	< 0.01	7.04
6	2	1.2 x 10 ⁵	< 0.01	7.08
6	3	1.2 x 10 ⁵	< 0.01	7.08
7	1	3.0 x 10 ⁵	< 0.01	7.48
7	2	2.0 x 10 ⁵	< 0.01	7.30
7	3	3.1 x 10 ⁵	< 0.01	7.49
post 48hr. stagnation				
	1		< 0.01	
	2		< 0.01	
	3		< 0.01	
8	1	1.2 x 10 ⁵	< 0.01	7.08
8	2	1.2 x 10 ⁵	< 0.01	7.08
8	3	1.2 x 10 ⁵	< 0.01	7.08
Mean Values for all units: 2.0 x 10⁵ < 0.01 > 7.30				

Assay performed on M-endo agar,

Worst case water used days 6,7 and 8

* Average of 2 replicate counts

** Influent level below 10⁵/mL

*** No *Klebsiella terrigena* was detected in the effluent however, no log reduction can be calculated.

Table 2. Comparison of the Inactivation of Virus and Bacteriophage Post Exposure to the PureBright Unit 1 using Average Case Test Water*

Organism	Challenge Date	Influent/mL	Effluent/mL	Percent Inactivation	Log ₁₀ Inactivation
Rotavirus	11/1	2.6 x 10 ³	< 0.036	> 99.9986	>4.86
Poliovirus	9/5	6.2 x 10 ⁵	0.37	99.99995	6.23
PRD-1	8/13	2.5 x 10 ⁵	< 1.0	> 99.9996	>5.40
MS-2	3/28	2.0 x 10 ⁴	< 1.0	> 99.995	>4.30

* Virus analysis performed before and after 8-day challenge study

Table 3. Comparison of the Inactivation of Virus and Bacteriophage Post Exposure to the PureBright Unit 1 using Worst Case Test Water*

Organism	Challenge Date	Influent/mL	Effluent/mL	Percent Inactivation	Log ₁₀ Inactivation
Rotavirus	11/1	1.2 x 10 ⁵	9.33	99.9922	4.11
Poliovirus	9/5	3.9 x 10 ⁴	3.944	99.9900	4.10
PRD-1	8/13	6.0 x 10 ⁵	9.0	99.9985	4.83

* Performed after 8 day challenge study

Table 4. Excystation of *Cryptosporidium parvum* as a Measure of Viability Post Exposure to the PureBright Unit 1

Day	Influent % excystation	Effluent % excystation	Percent Inactivation	Log ₁₀ inactivation	Influent sporozoite yield	Effluent Sporozoite yield
1	56	7	87.5	0.90	2.59	1.48
3	56	20	64.4	0.45	2.59	0.29
5	62	11	82.3	0.75	2.63	0.14
6	59	14	76.3	0.62	2.89	1.15
7	63	18	71.4	0.54	2.76	0.77
8	68	24	64.7	0.45	3.08	0.27

Table 5. Vital Dye staining of *Cryptosporidium parvum* as a Measure of Viability Post Exposure to the PureBright Unit 1

Day	Influent % viable	Effluent % viable	% inactivation	Log ₁₀ inactivation
1	75	28	62.67	0.43
3	73	31	57.53	0.37
5	83	53	36.14	0.43
6	83	49	40.96	0.23
7	74	48	35.14	0.19
8	84	31	63.10	0.43

Table 6. Cell Culture MPN of Infectious Oocysts Determined Before and After PureBright Inactivation

Sample ID	MPN Influent (per mL)	MPN Effluent (per mL)	Percent Inactivation	Log ₁₀ Inactivation
Day 1	1.84 x 10 ⁴	14.25	99.92	3.11
Day 3	1.84 x 10 ⁴	<1.00	> 99.994	> 4.26
Day 5	9.6 x 10 ³	14.25	99.85	2.83
Day 6	1.84 x 10 ⁴	<1.00	> 99.994	> 4.26
Day 7	1.84 x 10 ⁴	14.25	99.92	3.11
Day 8	>1.73 x 10 ⁵	36.72	> 99.979	> 3.67

Table 7. Number of Positive Wells Using a Serial Dilution MPN Assay in HCT-8 Cell Monolayers

Sample ID	Dilutions			
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Day 1 Influent	3	3	3	1
Day 1 Effluent	1	0	0	0
Day 3 Influent	3	3	3	1
Day 3 Effluent	0	0	0	0
Day 5 Influent	3	3	3	0
Day 5 Effluent	1	0	0	0
Day 6 Influent	*	3	3	1
Day 6 Effluent	0	0	0	0
Day 7 Influent	3	3	3	1
Day 7 Effluent	1	0	0	0
Day 8 Influent	3	3	3	3
Day 8 Effluent	2	0	0	0

* unable to assay

**Table 8. Number of Infected Mice using a Serial Dilution MPN Assay Approach
(Challenge Avg. Case Water 9/15/98 and Worst Case Water 9/22/98)**

Sample ID	Dilutions (+ mice/total in litter group)					
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Influent Avg. Case Water		6/6	5/5	5/5	2/5*	0/5*
Effluent Avg. Case Water	0/7	0/6	0/5			
Influent Worst Case Water		10/10	6/6	6/6	2/5*	0/5*
Effluent Worst Case Water	4/9	0/11	0/6	0/6		

*A hypothetical calculation based upon a previously reported ID₅₀ of 100 oocysts for *C. parvum* in mice

Table 9. Animal Infectivity MPN of Infectious Oocysts Determined Before and After PureBright Exposure

Sample ID	MPN Influent (per mL)	MPN Effluent (per mL)	% Inactivation	Log ₁₀ Inactivation
Avg. Case Water	248,672	6.57	99.997	4.58
Worst Case Water	248,672	20.70	99.992	4.08

北アメリカにおける浄水システム内の UV 消毒施設の現状

Status OF UV Disinfection of Municipal Drinking Water Systems in North America

Thomas M.Hargy

1. 概要

最近になり、塩素消毒ではトリハロメタン等の消毒副生成物の問題が報告されるようになり、代替消毒法の開発が必要とされていた。オゾンは強力な酸化剤であり、注目を集めているが、低水温時には処理効率が減少し、臭素酸が存在する際は発ガン物質が生成する等の問題がある。

1993年にミルウォーキー州にてクリプトスポリジウム（Cryptosporidium）の感染が起こって以来、クリプトスポリジウムの処理方法が重要視されるようになった。AWWA 研究財団(AWWRF)や電力研究協会(EPRI)等多くの研究機関が処理方法研究に乗り出し、研究を行い、最初は高線量にて実験を行い、その後、低線量にて実験を行い、5-10mJ/cm²の照射にてクリプトスポリジウムが4log 不活化するとの報告がなされた。Table1 に北アメリカにおける UV 施設の導入状況に関して示す。

Table 1. North American UV drinking water installations—recent and upcoming

Location	Design flow (mgd)	On-Line date	Manufacturer
Ft. Benton, MT	2	1987	Aquionics
Grosse Pointe Farms, MI	12	2000	CCC
Pittsburgh, PA	40	2001	CCC
Ontario, NY	3.5	2001	Trojan Technologies
Henderson, NV	18	2002*	Aquionics
Waterloo, ON	16	2002*	TBD
Sterling, MA	1.5	2002*	UltraDynamics
Edmonton, AB	95	2002	CCC
Seattle, WA	180	2003*	Trojan Technologies
New York, NY	1840	TBD	TBD
Clayton Co., GA (3 plants)	25, 12, 12	TBD	Wedeco-Ideal Horizons
Minot, ND	26	TBD	TBD
No. Battleford, SK	2.9	TBD	Trojan Technologies
Moon Township, PA	5.5	TBD	CCC

Note: * Proposed; mgd = millions gallons/day; CCC = Calgon Carbon Corporation; TBD = to be determined
 SOURCES: IUVA News, various issues, and International Congress on UV Technologies, 2001

USEPA の調べにより、40mJ/cm²の紫外線照射を行った場合、3log 以上の不活化が可能であり、オゾン処理において2log の不活化を行う際の40%の費用であり、非常に安価であるとの報告があった。しかし、Calgon Carbon 社がカナダでクリプトスポリジウムの UV 装置への適用に

関してカナダでクリプトスポリジウムの UV 装置への適用に関する特許を、2000 年にアメリカで、2001 年にカナダにて取得し、1000 ガロン(1 ガロン=3.785L)につき、0.015 ドルの特許料を徴収するとしている。

多色紫外線システムによるクリプトスポリジウムの不活化

INACTIVATION OF CRYPTOSPORIDIUM PARVUM WITH POLYCHROMATIC UV SYSTEMS

ALEXANDER A. MOFIDI ら

1. 概要

C.parvum オーシストに対する多色（200～300nm）の UV 照射の殺菌効果を測定するベンチスケールの実験を行った。C.parvum オーシスト（ $10^4 \sim 10^6$ oocysts/mL）を処理した表流水に懸濁し、中圧 UV とパルス UV を照射した。UV 照射線量は線量計と熱量計によりそれぞれ測定した。

オーシストの不活化は、ヒト細胞培養試験法（デンシトメトリーによるゲル電気泳動の定量法を用いた RT-PCR 法）を用いた感染性減少により測定した。

最初のパルス UV の実験では、 $16\text{mJ}/\text{cm}^2$ またはそれ以上の UV 線量で、C.parvum を完全に不活化した（3log 以上）。中圧 UV とパルス UV システムの組み合わせによる実験では、統計的に 95% の信頼性で、7.6 と $11\text{mJ}/\text{cm}^2$ の UV 線量により、それぞれ C.parvum を 1log と 2log 不活化することを示した。

最近の研究では、中圧 UV 照射が、C.parvum の感染性オーシストの数を低線量の UV で効果的に減少させることができると報告されている。これらの結果は、低圧 UV は原生動物の殺菌性に効果がないとか、非常に高い線量は、限定的に不活化するというような初期の研究と対照的である。これらの初期の研究では、C.parvum の生存の測定に、propidium (PI) や 4'6 diamidino-2-phenyl indole (DAPI) のような染料の取り込みにより測定するという試験法を用いていた。動物感染性試験を用いた最近の研究では、UV 処理は、新生マウス内でのオーシストの複製を防止し、消毒の評価により適していると考えられる。

これらの新しい結果は、非常に将来有望であるが、まだデータが限られている。さらに、UV による C.parvum の不活化に対する照射線量との反応の相関関係がまだ確立されていない。この報告では、UV 照射による前後の C.parvum オーシストの感染性の測定に、ヒト細胞培養法を用いた。

2. 結果

結果は実験が行われた順に Table 3 に示した。

これらの実験結果は、オーシストの検出限界をはっきりさせるための定量曲線を作成するために十分な数のコントロールを含んでいる。検出可能なオーシストの数が $19 \sim 59,700$ ($1.3 \sim 4.8 \log_{10}$) の間であるところの代表的な実験から引き出された定量曲線を Fig.3 に示した。

3. 結論

中圧 UV とパルス UV に対する *C.parvum* の反応は、この研究で行われた実験結果では同等であると思われた。多色 UV システムとの組み合わせ結果では、95%の信頼性で、7.5 と 11mJ/cm² の UV 線量のいずれの場合においても、それぞれ、*C.parvum* の感染性を 1~2log₁₀ 減少させた。

パルス UV システムは、16mJ/cm² の線量で *C.parvum* の感染性を 3-log₁₀ 以上減少させた。低強度でのパルス UV 抑制モードによる UV 照射の寄与は大きいですが、この現象は余り重要ではない。10mJ/cm² 以下の UV 線量が *C.parvum* を不活化することができるということが理解されて以来、ウイルスの消毒は、飲料水の消毒法として UV システムの必要性を確立するときには、制御因子として考えられるであろう。

UV 照射は現在、*C.parvum* の効果的なマルチバリアーコントロールとして有効に使うことができるが、いかにして UV システムの効果を証明するか、または大規模（100 million gallons per day）で監視するか等、多くの未知の問題がある。原生動物の UV 線量に対する反応を確立するだけではなく、大規模システムにおける UV 線量の測定方法の開発や、消毒効果（たとえば飲料水の製造を保証するためのオンラインによる UV 線量測定など）の報告についても重要である。

大都市における現在および将来の UV に関する調査プロジェクトとして、これらの問題が取り上げられるであろう。

Table 1. Characteristics of Typical Low-Pressure, Medium-Pressure, and Pulsed-UV Lamps

Characteristic	Low-Pressure*	Medium-Pressure*	Pulsed-UV
Wavelength	Monochromatic, 85 to 90 percent at 253.7 nm	Polychromatic, 185 to 1,367 nm	Polychromatic, 185 to 800 nm
Emission	Continuous-wave	Continuous-wave	30 pulses per second
Mercury vapor pressure	10 ⁻³ to 10 ⁻² torr	10 ² to 10 ⁴ torr	N/A
Operating temperature	40 to 60 °C	500 to 800 °C	15,000 K†
Arc length	40 to 75 cm	5 to 40 cm	15 cm
Lifetime	8,000 to 10,000 h	2,000 to 5,000 h	>1 x 10 ⁹ pulses†
Relative light intensity	Low	Medium	High

* Information provided by Dr. Karl Linden, Department of Civil and Environmental Engineering, Duke University.

† Information provided by Innovatech, Inc.

Table 2. Water Quality for *C. parvum* Inactivation Experiments

Parameter	Units	Mean value or range*
pH	—	8.1
UV ₂₅₄	cm ⁻¹	0.03 to 0.06
Transmittance†	percent	93 to 89
Hardness	mg/L as CaCO ₃	230 to 308‡
Turbidity	ntu	0.06 to 0.20

* Range not shown if parameter did not vary significantly.

† Transmission was calculated by the Beer-Lambert Law (100)(10^{absorbance}).

‡ During these experiments, source water for the pilot plant ranged from 100-percent Colorado River water (CRW) to a blend of CRW and water from the California State Water Project.

Table 3. Summary of *C. parvum* Inactivation Experiments

Date and System Type	Sample Identification	Reduction in Infectivity* (log ₁₀)	Date and System Type	Date and System Type	Reduction in Infectivity* (log ₁₀)
Dec. 18, 98 Pulsed UV	Process water "+" control	0	Apr. 7, 99 Med. Press.	Process water "+" control	0
	Heat-inactivated "-" control	†		Heat-inactivated "-" control	†
	Non-infected slide	†		Non-infected slide	†
	Cuvette only "+" control	N/A		Petri dish "+" control	0, 0, 0.93‡
	3 cm simmer "+" control	1.13		1.9 mJ/cm ² §	0, 1.62, 1.11
	Sample at 8 cm	(>3)†		3.5 mJ/cm ² §	1.14, 1.80, 2.12
	Sample at 18 cm	(>3)†		5.2 mJ/cm ² §	3.21, 3.09, 2.11
Feb. 8, 99 Med. press.	Process water "+" control	0	Apr. 19, 99 Pulsed UV	Process water "+" control	0
	Heat-inactivated "-" control	†		Heat-inactivated "-" control	†
	Non-infected slide	†		Non-infected slide	†
	Petri dish "+" control	0		Cuvette only "+" control	0
	0.6 mJ/cm ²	0.06		36 cm simmer: 0.3 mJ/cm ² §	0.59, 0, 0
	1.0 mJ/cm ²	0.03		1.2 mJ/cm ² at 36 cm §	0.53, 0.98, 0, 0
	1.4 mJ/cm ²	0.00		2.1 mJ/cm ² at 36 cm §	1.29, 1.01, 0.90, 0.74
	1.9 mJ/cm ²	0.50		3.1 mJ/cm ² at 36 cm §	0.93, 1.47
	2.3 mJ/cm ²	0.49			
2.6 mJ/cm ²	0.31				
3.0 mJ/cm ²	0.67				
Feb. 23, 99 Med. press.	Process water "+" control	0	May 3, 99 Pulsed UV	Process water "+" control	0
	Heat-inactivated "-" control	†		Heat-inactivated "-" control	†
	Non-infected slide	†		Non-infected slide	†
	Petri dish "+" control	1.39 §		Cuvette only "+" control	0
	2.1 mJ/cm ²	0.07 ‡		36 cm simmer: 0.3 mJ/cm ² §	0, 0.40, 0.66, 0
	3.0 mJ/cm ²	0.35 ‡	2.9 mJ/cm ² at 36 cm §	0, 0.53, 0.97, 0.70	
	3.9 mJ/cm ²	0.64 ‡	4.2 mJ/cm ² at 36 cm §	0.06, 0.06, 0, 1.43	
	4.5 mJ/cm ²	0.42 ‡	5.5 mJ/cm ² at 36 cm §	2.20, 0.95, 2.00, 1.43	
	4.9 mJ/cm ²	1.09 ‡			
	5.4 mJ/cm ²	1.29 ‡			
6.0 mJ/cm ²	1.39 ‡				
Mar. 8, 99 Pulsed UV	Process water "+" control	0	May 24, 99 Pulsed UV	Process water "+" control	0
	Heat-inactivated "-" control	†		Heat-inactivated "-" control	†
	Non-infected slide	†		Non-infected slide	†
	Cuvette only "+" control	0		Cuvette only "+" control	N/A
	36 cm simmer: 0.3 mJ/cm ² §	0.09		18 cm simmer: 1.4 mJ/cm ² §	0.25
	0.9 mJ/cm ² at 36 cm §	0.00		8.1 mJ/cm ² at 18 cm §	3.01, 2.68
	1.8 mJ/cm ² at 36 cm §	1.56		2.9 mJ/cm ² at 36 cm §	2.80
	3.6 mJ/cm ² at 36 cm §	3.32		5.5 mJ/cm ² at 36 cm §	1.28, 1.57, 1.89, 1.28
		9.4 mJ/cm ² at 36 cm §	3.30, 2.48		
June 7, 99 Pulsed UV	Process water "+" control	0	June 7, 99 Pulsed UV	Process water "+" control	0
	Heat-inactivated "-" control	†		Heat-inactivated "-" control	†
	Non-infected slide	†		Non-infected slide	†
	Cuvette only "+" control	0		Cuvette only "+" control	0
	36 cm simmer: 0.3 mJ/cm ² §	0.22, 0, 0.43		36 cm simmer: 0.3 mJ/cm ² §	0.22, 0, 0.43
	2.9 mJ/cm ² at 36 cm §	0.67		2.9 mJ/cm ² at 36 cm §	0.67
	5.5 mJ/cm ² at 36 cm §	1.40, 2.44, 2.02		5.5 mJ/cm ² at 36 cm §	1.40, 2.44, 2.02
8.1 mJ/cm ² at 36 cm §	1.71, 2.84, 2.10	8.1 mJ/cm ² at 36 cm §	1.71, 2.84, 2.10		

* Multiple data points are presented when serial dilutions were made.

† The number of infective oocysts was below the detection limit of the calibration curve for these experiments.

‡ Because of the loss of 1.39 log₁₀ of oocysts in the petri-dish control, all reported experiment results have 1.39 log₁₀ subtracted.

§ Because of UV light measured by radiometer during the 15 s simmer mode, 0.3 mJ/cm² was added to the UV dose for 36-cm samples and 1.4 mJ/cm² was added to the UV dose for 18-cm samples.

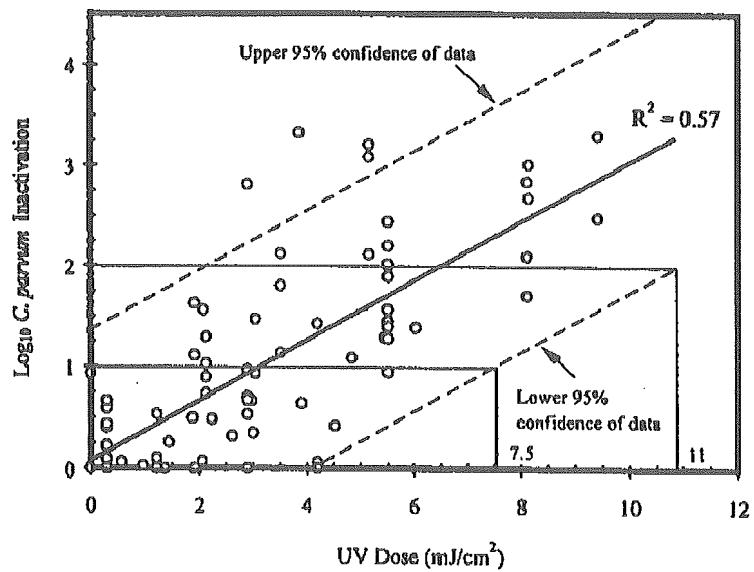
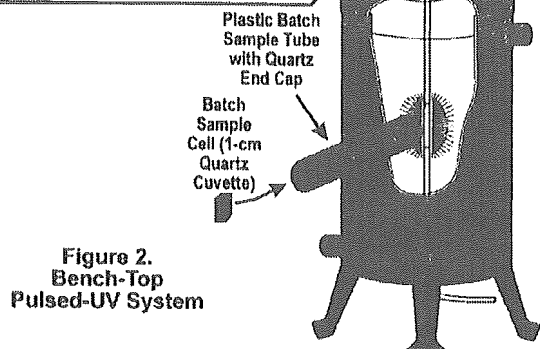
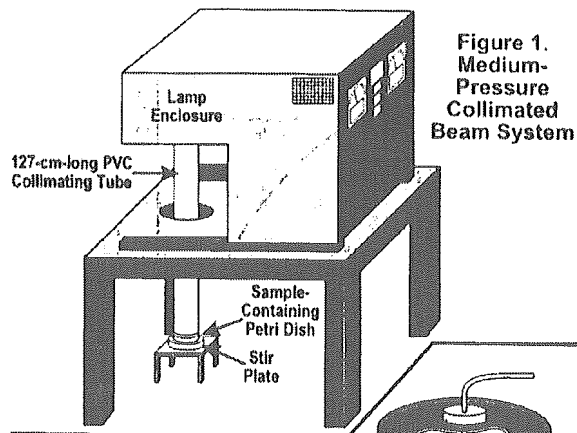


Fig.6 Inactivation of *C.parvum* by Pulsed UV and Medium Pressure UV System

紫外線不活化、光再活性化及び暗回復における、大腸菌とクリプトスポリジウムの
ピリミジン二量体の測定

Determination of Pyrimidine Dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum*
during UV Light Inactivation, Photoreactivation, and Dark Repair

KUMIKO OGUMA ら

1. 概略

大腸菌とクリプトスポリジウムの紫外線不活化、光回復、暗修復は核内感受性部位 (ESS) の試験により研究されてきた。この研究により微生物の染色体の DNA の中に紫外線により誘発されたピリミジン二量体を測定することができた。紫外線により不活化された大腸菌の 99.9%において、紫外線照射線量と、大腸菌の DNA 中に誘発されたピリミジン二量体の数の間に高い相関性が認められた。大腸菌のコロニー生成能も DNA のピリミジン二量体の数と高い相関性があった。このことは ESS 試験がコロニー形成能の測定に用いられてきた従来法と同等の方法であることを示している。大腸菌は、紫外線照射により 99.9%が不活化された後に蛍光線を照射されると、紫外線により誘発された DNA 中のピリミジン二量体は、連続的に修復され、コロニー形成能は徐々に回復した。しかし、紫外線不活化後、暗状態に放置すると、大腸菌はピリミジン二量体の修復とコロニー形成能の回復のいずれも示さなかった。クリプトスポリジウムは、紫外線不活化後蛍光線を照射されたとき、DNA 中の紫外線により誘発されたピリミジン二量体が連続的に修復されるが、動物への感染性の回復は認められなかった。紫外線不活化後に暗状態に置かれた場合、クリプトスポリジウムもピリミジン二量体の修復にもかかわらず、感染性の回復は示さなかった。したがって、クリプトスポリジウムの感染性は、染色体 DNA のピリミジン二量体の修復後でさえも、光再活性化または暗回復のいずれによっても回復しなかった。

2. 方法

(1) 微生物

試験に供した微生物は、*E.coli* IFO 3301 と *C.parvum* HNJ-1 である。*E.coli* は、37℃で 24 時間培養後にブイヨン培地の純粋なコロニーからピックアップした。その後滅菌したリン酸緩衝液 (pH7.6) に最初の濃度が $2.5 \times 10^7 \sim 4.0 \times 10^7$ CFU ml⁻¹ となるように懸濁した。

E.coli の調製液 (40ml) は、滅菌したペトリ皿 (φ 100-mm) に入れ、光の照射工程に用いられた。

(2) 紫外線と蛍光線の照射

UV 照射実験には、2 個の低圧 UV ランプ（殺菌灯、20W、東芝）を使用した。254nm の波長での強度は、 0.24mWcm^{-2} であり、その強度は UV 線量計で測定した。UV の線量は暴露時間をコントロールすることにより調整した。

光回復工程について、紫外線照射により 99.9%不活化後、試料に 3 個の蛍光灯（白色の蛍光灯、18W；日立）を 5 分間照射した。

E.coli に対しては、コロニー形成能を 99.9%減少する線量である 6.0mJ cm^{-2} の UV 線量が照射され、*C.parvum* には感染性を 99.9%減少する線量である 2.2mJ cm^{-2} の UV 線量が照射された。

(3) 大腸菌のコロニー形成能試験

E.coli のコロニー形成能はデソキシコーレート酸培地を用いて、Standard Methods に準拠して暗室で試験した。

(4) クリプトスポリジウムの動物感染性試験

感染性試験に対する *C.parvum* の試料は、5 つの固定した希釈係数により希釈した。生後 6 週間の SCID マウスに希釈液を経口摂取させた。4 週間飼育後、各マウスから新しい便を採取し、精製し、間接的蛍光抗体反応により染色した。

(5) ESS 試験：Endonuclease Sensitive Site (ESS) assay

- ① ESS 試験の原理
- ② 微生物からの DNA 抽出
- ③ ESS 試験の条件

3. 結果と考察

(1) 大腸菌の紫外線不活化

Fig.1 に *E.coli* の UV 照射の間の ESS 試験結果を示した。2,4,6 mJ cm^{-2} の UV 線量は、それぞれコロニー形成能の 90、99、99.9%の不活化に対応する。

ゲル電気泳動の写真 (Fig.1A) が解析され、蛍光強度の分布パターンが Fig.1B に描かれているように測定された。水平軸は移動距離または対応する分子の長さを示しており、垂直軸は DNA フラグメントの蛍光強度を示している。Fig.1B に示すように、各試料の中央の分子の長さは、UV 線量の増加とともに短くなった。このことは UV 照射の線量の増加に伴い、DNA がより小さな断片に分解していることを示している。

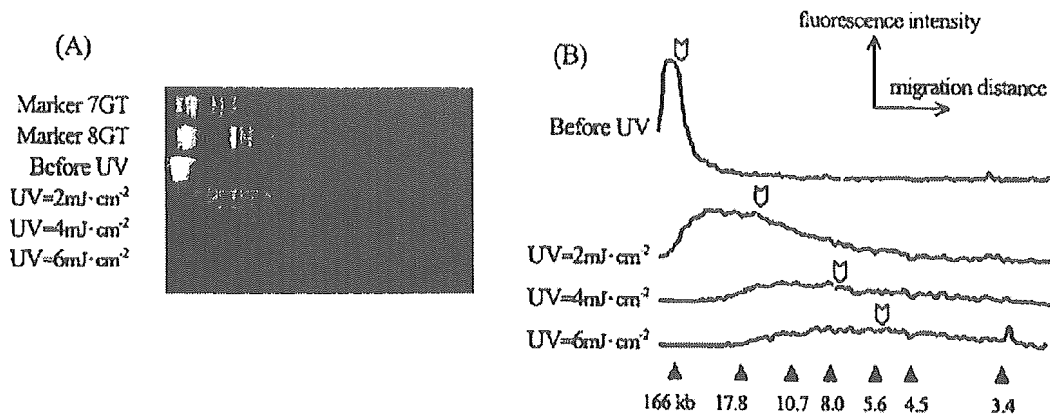


FIG. 1. Example of ESS assay during UV irradiation of *E. coli*. (A) Photographic image of the alkaline agarose gel after electrophoresis. (B) Distribution patterns of DNA in relation to molecular length standard markers. Arrows indicate the median point of each distribution pattern. UV doses of 2, 4, and 6 mJ cm⁻² corresponded to 90, 99, and 99.9% inactivation of the colony-forming ability of *E. coli*, respectively.

Fig.2 は、UV 照射の間の ESS の数が、UV 線量の増加とともに直線的に増加していることを示している。UV 線量と ESS の数の間の直線性は least-squares 法により測定した。

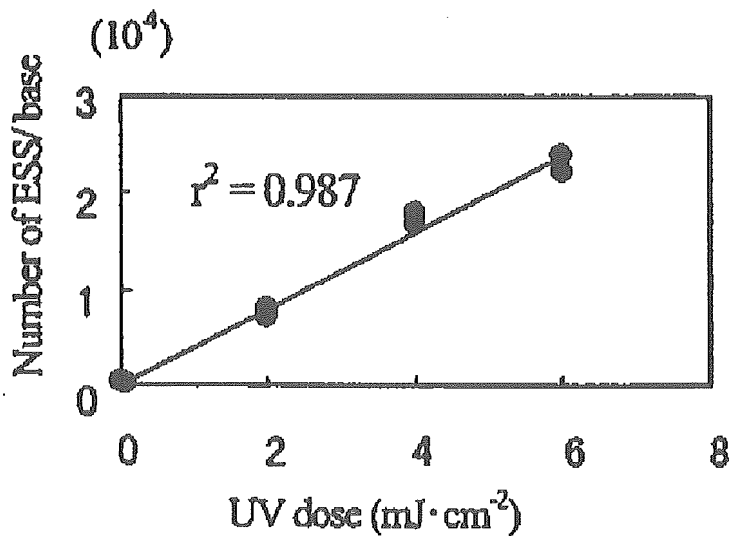


FIG. 2. Relationship between UV dose and number of ESS during UV irradiation of *E. coli*. The regression on a straight line which passes through the origin of the coordinates was determined by the least-squares method for two independent series of experiments. Coefficient of determination (r^2) was 0.987 for eight data.

Fig. 3 は UV 照射中の ESS の数とコロニー形成能の比との間の相関性を示している。ESS の数とコロニー形成能の比の対数の間の右下がりの直線は、least-squares 法により測定した。定量結果の相関係数は 8 個のデータについて 0.991 であった。このことは ESS 試験が従来のコロニー形成能試験に匹敵することを示している。

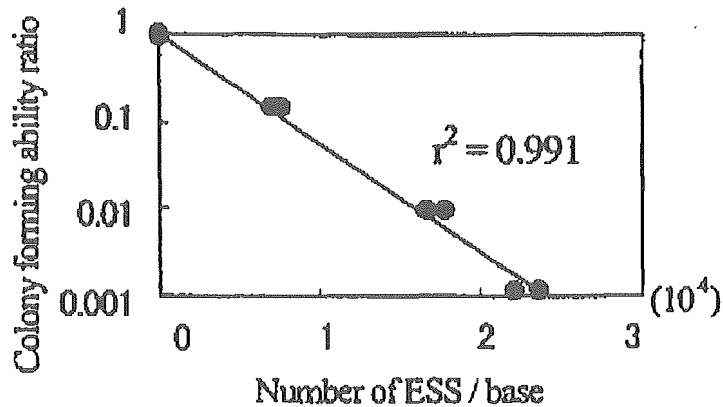


FIG. 3. Relationship between number of ESS and ratio of colony-forming ability during UV irradiation of *E. coli*. The regression on a straight line whose intercept was fixed to be 1 on the vertical axis was determined by the least-squares method for two independent series of experiments. Coefficient of determination (r^2) was 0.991 for eight data.

- (2) 大腸菌の光再活性化と暗回復
- (3) クリプトスポリジウムの紫外線不活化
- (4) クリプトスポリジウムの光再活性化と暗回復

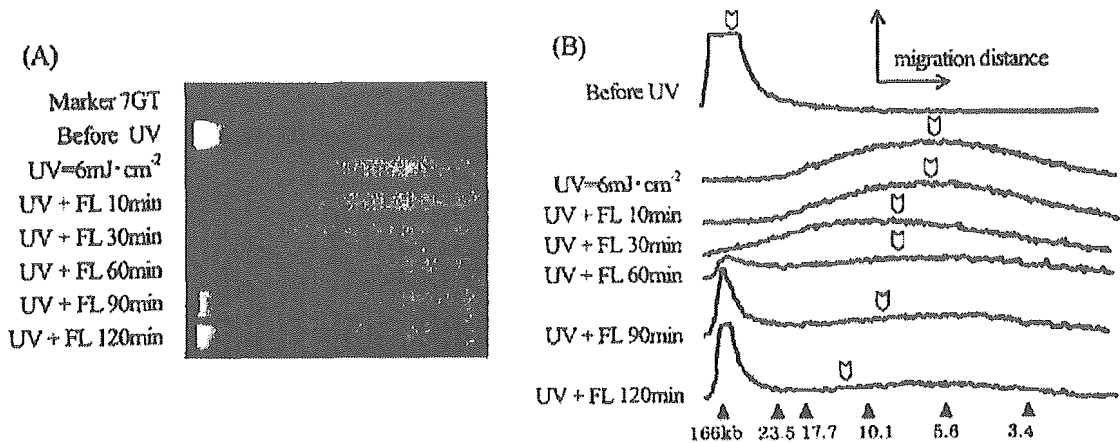


FIG. 4. Example of ESS assay during UV and fluorescent light irradiation of *E. coli*. (A) Photographic image of the alkaline agarose gel after electrophoresis. (B) Distribution patterns of DNA in relation to molecular length standard markers. Arrows indicate the median point of each distribution pattern. Dose of UV was 6 mJ cm^{-2} for all samples, which corresponded to 99.9% inactivation of the colony-forming ability of *E. coli*. FL indicates exposure to fluorescent light irradiation.

4. 結論

ESS 試験は、大腸菌とクリプトスポリジウムの染色体 DNA の紫外線により誘発されたピリミジン二量体を測定することができた。これらの結果より次の結論が得られた。

- (1) ESS 試験は、大腸菌やクリプトスポリジウムの紫外線不活化、光回復、暗回復の定量的な研究に有益な方法である。

- (2) 大腸菌の紫外線不活化において、DNA 中に誘発されたピリミジン二量体の数は、コロニー生成能と同様に、紫外線照射量と高い相関があった。
- (3) 大腸菌において、紫外線照射によって DNA 中に誘発されたピリミジン二量体は、蛍光線照射暴露中連続的に修復されるが、それらは暗状態では修復されなかった。蛍光線照射期間中の DNA に残存するピリミジン二量体の数は、コロニー形成能と高い相関が認められた。
- (4) クリプトスポリジウムの紫外線不活化において、DNA 中に誘発されたピリミジン二量体の数は、使用した紫外線量と高い相関が認められた。
- (5) クリプトスポリジウムにおいて、紫外線照射によって DNA 中に誘発されたピリミジン二量体は、蛍光線照射に暴露することにより、連続的に修復された。ピリミジン二量体の修復は、暗状態でさえも回復した。蛍光線への暴露期間中のピリミジン二量体の修復に対するクリプトスポリジウムの感染能力は、大腸菌の場合とほとんど同じであった。しかし、クリプトスポリジウムの動物に対する感染性は、蛍光線への暴露後または暗状態に保存した後のいずれの場合も回復しなかった。クリプトスポリジウムはピリミジン二量体の修復後でさえも、光再活性または暗回復のいずれによっても感染性を回復しないであろう。

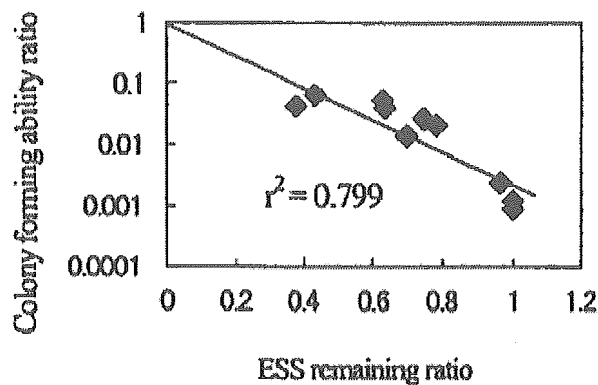


FIG. 7. Relationship between ESS remaining ratio and colony-forming ability ratio during fluorescent light irradiation of *E. coli*. The regression on a straight line whose intercept was fixed to be 1 on the vertical axis was determined by the least-squares method. Coefficient of determination (r^2) was 0.799 for 10 data.

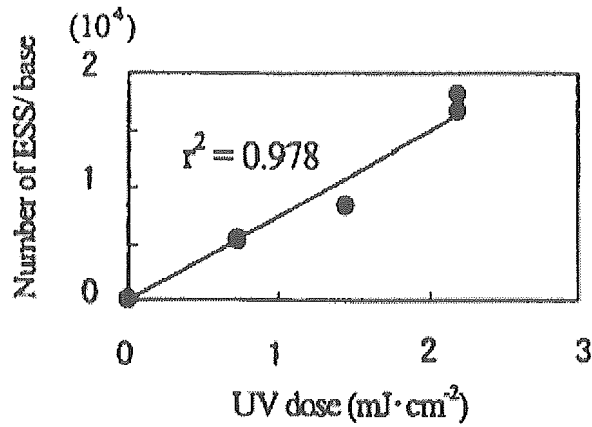


FIG. 8. Relationship between UV dose and number of ESS during UV irradiation to *C. parvum*. The regression on a straight line which passes through the origin of the coordinates was determined by the least-squares method for three independent series of experiments. Coefficient of determination (r^2) was 0.978 for seven data.

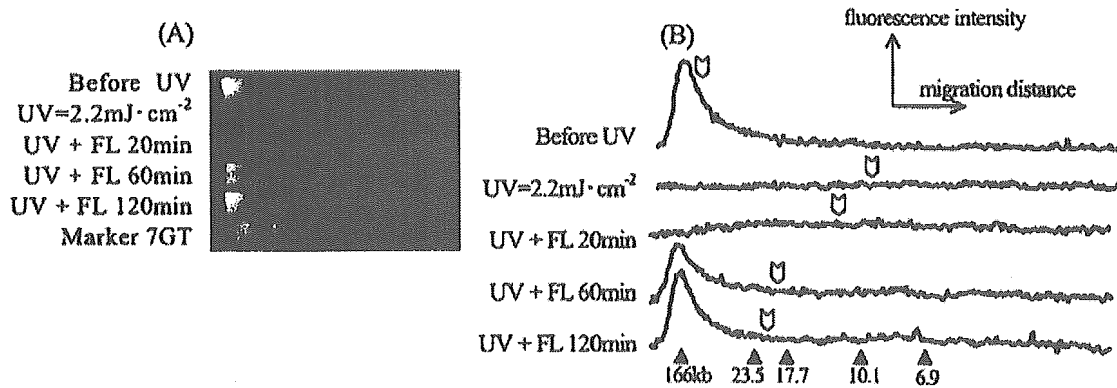


FIG. 9. Example of ESS assay during UV and fluorescent light irradiation to *C. parvum*. (A) Photographic image of the alkaline agarose gel after electrophoresis. (B) Distribution patterns of DNA in relation to molecular length standard markers. Arrows indicate the median point of each distribution patterns. Dose of UV was 2.2 mJ cm^{-2} for all samples, which corresponded to 99.9% inactivation of the infectivity of *C. parvum*. FL indicates exposure to fluorescent light irradiation

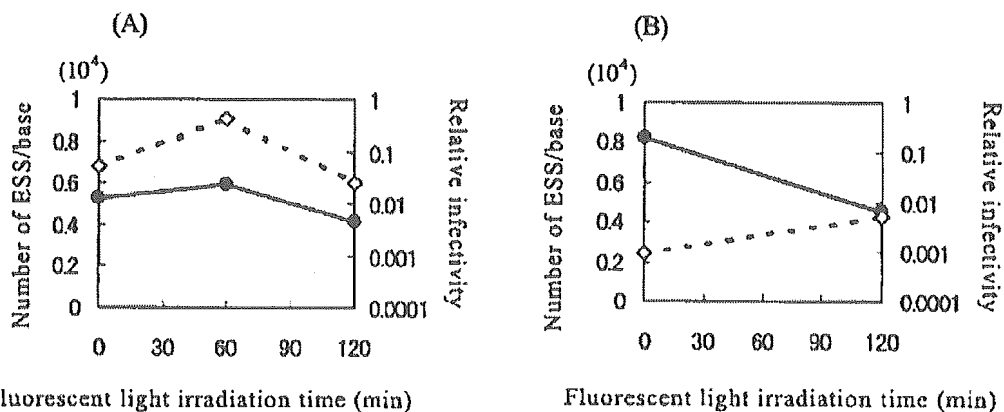


FIG. 12. Profiles of number of ESS and relative infectivity of *C. parvum* during fluorescent light irradiation after UV irradiation at 0.72 (A) or 1.44 (B) mJ cm^{-2} . Solid circles, number of ESS/base; open diamonds, relative infectivity. All symbols indicate the data from one series of experiments. The 60-min time point in panel B was not tested.

クリプトスポリジウム オーシストの不活化に対する紫外線照射の効果

Efficacy of UV irradiation in Inactivating *Cryptosporidium parvum* Oocysts

Shigemitsu Morita ら

1. 概要

クリプトスポリジウム オーシストの不活化に与える紫外線照射の影響を評価するため、紫外線照射を受けたオーシストの動物に対する感染性と脱囊について測定した。感染性は紫外線照射量の増加とともに急激に減少し、感染性の2 log の減少（99%不活化）に要する線量は、20℃で約1.0mWs/cm²であった。しかし、クリプトスポリジウム オーシストはUV照射に対して高い抵抗性を示し、生存能力を評価するために用いられる脱囊性に対しては、2 log 減少させるのに230mWs/cm²という極端に高い照射線量が必要であった。

さらに脱囊性は100mWs/cm²以下のUV照射ではほんのわずかな減少を示しただけであった。このようにUV処理はオーシストにとって脱囊はするけれども感染はしないという結果であった。今回の実験結果では、水温が10℃低下するごとに、感染性が2 log 減少するのに必要なUV照射線量の増加はたった7%であり、感染性減少強度が10倍増加するごとの照射線量の増加はたった8%であった。

さらに感染性の回復やUVにより引き起こされたDNAの損傷（ピリミジン二量体の形成）の光による再活性化（光回復）や暗回復による修復について調査した。UV照射後引き続き蛍光線照射や暗所での貯蔵を行っても感染性の回復は認められなかった。対照的に、UV照射により引き起こされたDNA中のピリミジン二量体は、核内の感受性の高い部位の試験による測定によれば、光による再活性化及び暗回復により明らかに修復された。しかし、回復の割合は各プロセスにより異なっていた。動物の感染性による測定方法によれば、クリプトスポリジウム オーシストへのUV照射の効果は、回復性がないと結論づけることができる。