

Darby(1995)らは、バイオアッセイの結果に基づき、経験式を構築したが、異なる条件下における紫外線照射装置の性能を評価できなかった。

Chiu(1999)らは、レーザードップラー速度計(LDV)を用いて、実験的に、装置内の流速を測定し、Point Source Summation(PSS)法を用いて、紫外線強度を算出し、random-walk モデルを用いて、微生物1体毎に適用した結果、実験結果を予想できたが、予測に時間がかかり、標準のモデルとしては用いられていない。

### 紫外線消毒計算モデル

紫外線消毒計算モデルでは、紫外線強度の分布、流体力学、不活化のメカニズム等を考慮に入れている。屈折や反射、吸収、散乱を考慮に入れ、Figure2 に示すような、紫外線強度の分布の把握を行うことが可能である。

装置内の流体の動きは、乱流における Navier Stokes の式を用いてモデルを組んでいる。詳細なモデル構築には、境界条件等が非常に重要であり、流体をモデリングすることで、figure 3 に示すように微生物の反応装置内での挙動を解析する。

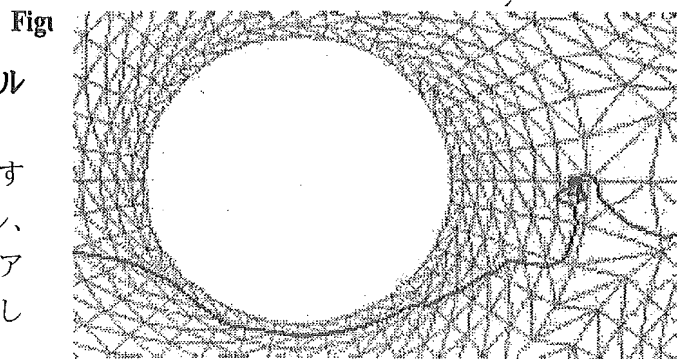
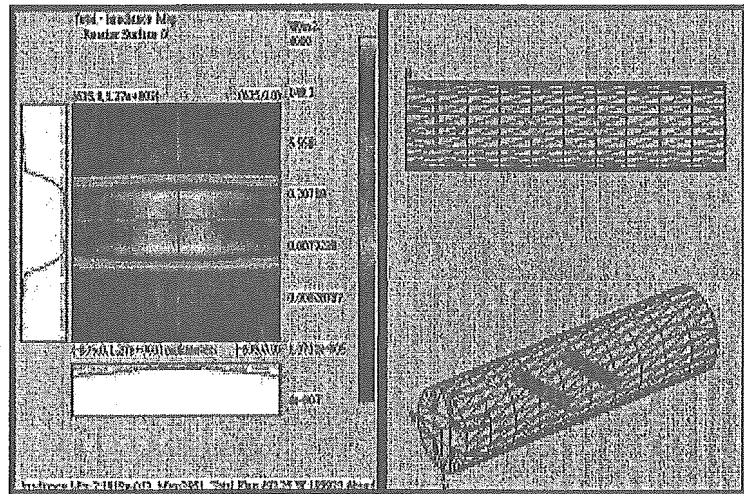


Figure 3 Microbe path in a flow around a lamp.

### UV 照射装置最適化のためのモデルの導入

CoDiM モデルの有用性を評価するために、計算モデル対計算モデル、経験モデル対計算モデル、バイオアッセイ対計算モデルの3種類に関して、比較検討を行った。

Case1：計算モデル対計算モデル

2種類の輪状装置を異なる水層(装置壁面とUVランプとの距離)を想定して計算モデルを用いて、平均線量と実際の装置性能の差を実証した。



両装置において、紫外線ランプ強度、流量、UVT(紫外線透過率)は60%として、計算モデルを使用した。装置Bにおいては、装置Aの水層の2.5倍とした。装置内Bの流速は、流路面積が増大したことにより、装置内Aの流速の1/3.25となった。流量に対する紫外線照射量を一定としても、Figure4に示すように、明らかに装置効率は異なることがわかる。理論平均においては、装置Aに比べ、装置Bの方が、30%高い平均紫外線量となるが、

有効紫外線量は、装置 A の半分しかないことがわかる。これは、装置 B 内の反応時間が装置 A に比べ長いため、微生物はランプ近傍にて、非常に多量の紫外線量を暴露しているため、装置 B 内の平均紫外線量が大きくなるのだが、微生物の不活化は瞬時に終了するわけではなく、非常に多量の紫外線を照射することが、装置の性能向上につながらないことを有効紫外線量により実証されている。

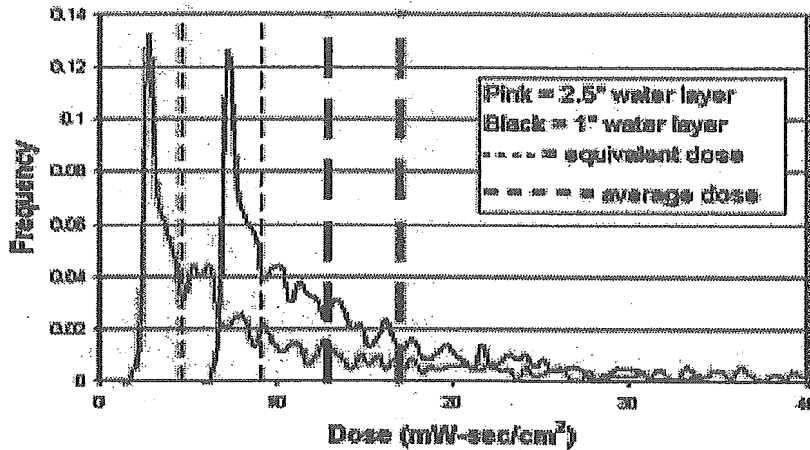


Figure 4 Full lines are fluence distributions, thin dashed lines are equivalent dose and thick dashed lines are average dose.

Case 2: 経験モデル対計算モデル

クロスフロータイプの装置をモデル化し、Chiu et al(1999)の経験/計算モデルと比較した。Chiu は、LDV(レーザードップラー速度計)を用いて、装置内の側路を把握した(Figure 5 参照)。1 体ごとの微生物に対し、暴露した照射エネルギーの積算を行い、廃水の紫外線透過率 65%を想定した結果、Figure6 に示すように、Chiu のモデルと CoDim のモデルによる紫外線量の分布はほぼ同じ挙動を示した。

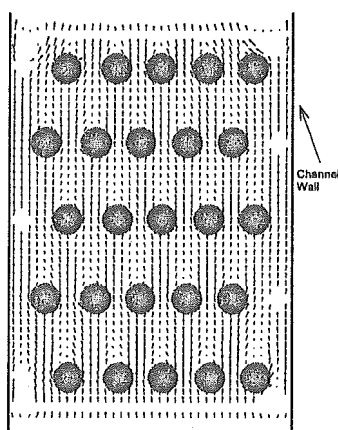


Figure 5 Velocity field obtained with LDV

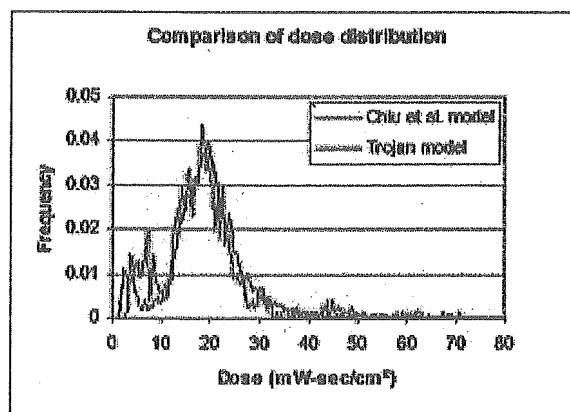


Figure 6 Dose distributions obtained by Chiu and CoDim

非常に必要な点は、CoDiM モデルは、低い紫外線量の領域を正確に再現でき、実装置における効率性を正確に予測が可能であることである。壁面上にある微生物は、暴露する紫外線量が、ランプ付近に比べ少ない。この低用量の紫外線量(下から約 10%程度)が、不活化に必要な紫外線量よりも低く、出口側の糞便性大腸菌群濃度が 200cfu/100mL 以下

にする場合には、原水中の糞便製大腸菌群濃度を 2000cfu/100mL 以下にすれば、装置の設計上、問題はない。多くの下水中では糞便性大腸菌群は 1,000,000cfu/100mL 中含まれるので、実装置を設計する際の唯一の手段は、線量の分布図を右にずらす(ランプ本数を増やす)ことであるが、コストはかさみ、紫外線装置の効率も低下してしまう。

Figure 7 に示すように、同じ装置において、2つのモデル式を用い、バイオアッセイの結果と比較した。その結果、2つのモデルは非常に相関性が高いことが確認された。

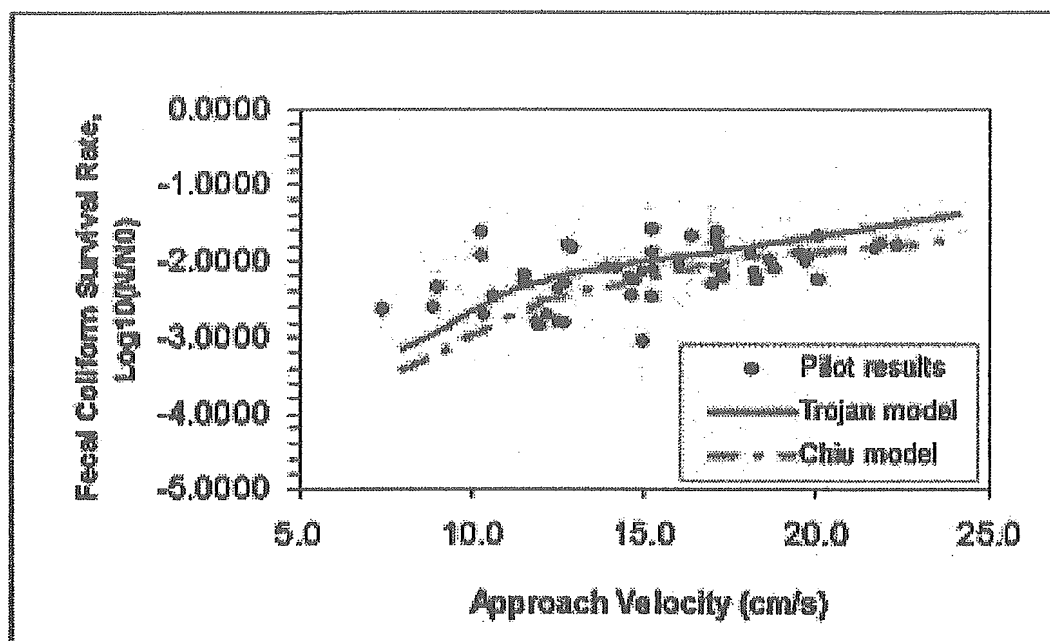
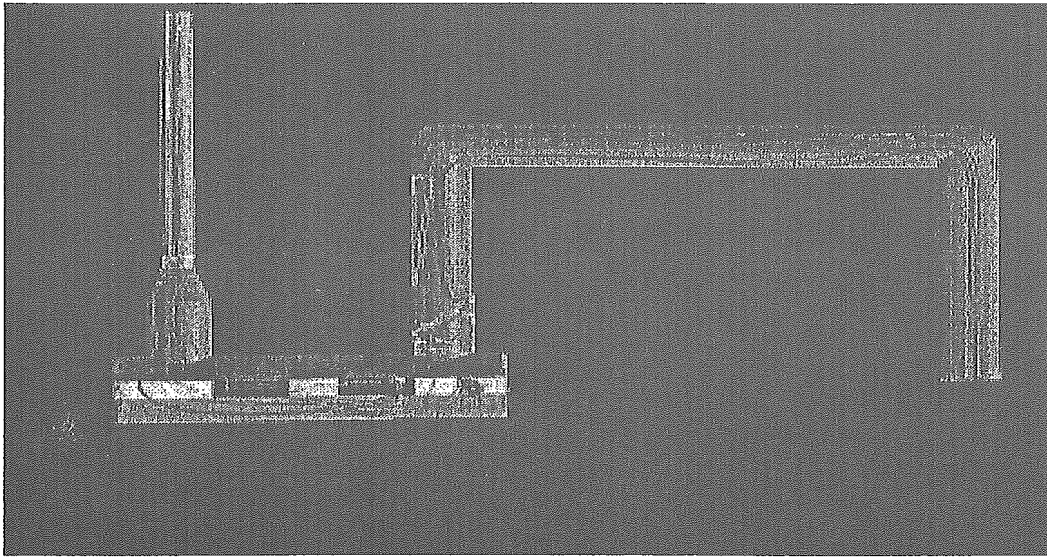


Figure 7 Inactivation obtained by experiment, Chiu's model and CoDiM

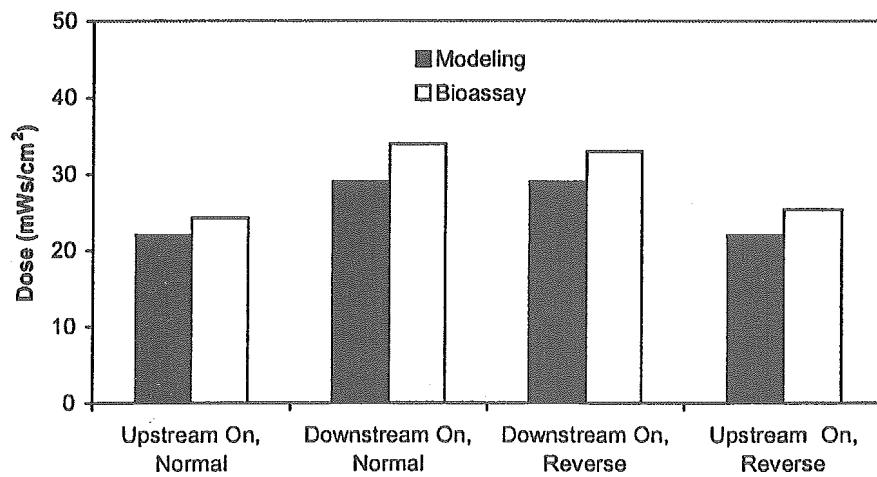
### Case 3: バイオアッセイ対計算モデル

計算モデルの精度を評価する目的で、紫外線装置における pilot 実験を行った。本実験では、biodosimetry を用いて、装置内の紫外線量の分布の確認を行い、計算モデルとの比較を行った。

実験に用いた装置は、Figure8 に示すように、2つの中圧ランプを有するステンレス製の装置であり、実験には MS-2 フェージを用いた。バイオアッセイ試験は生地下水を用いて実施した。流速、紫外線透過率、ランプの本数等を変えて実験を行った。また、水の紫外線透過率は 95%であった。



**Figure 8** Parallel flow UV reactor with approach and exit piping. The computed path lines are shown. The turbulence upstream of the reactor inlet is due to a butterfly valve partially open.



**Figure 9** Comparison of modeling and bioassay derived doses for raw groundwater with only one lamp operating (500 gpm, 95 % UVT). When lamp positions were switched, the downstream lamp still produced better disinfection.

実験結果としては、計算モデルとバイオアッセイの結果は、高い相関性が得られた。CoDiM モデルにより装置性能が予測でき、たとえば、下流側のランプの方が、上流側のランプよりも効率的に殺菌ができることが確認された。完全混合条件では、ランプの位置に

より効率が変化することはないが、実際の装置では、ランプ位置や流体の流れ方等により、効率は変化し、計算モデルにより、効率の予測が可能であった。

**結果：**

CoDiM モデルは、他のモデルや biodosimetry の結果と高い相関性が確認され、今後の紫外線装置の性能解析に非常に役立つものを思われる。

CoDiM モデルは装置最適化には非常に役立つ手法であるが、装置性能の検証を行う際に用いるバイオアッセイ試験の代用として用いるものではない。CoDiM モデルは最先端の評価手法であるが、まだ、開発途中のものである。

***Cryptosporidium parvum* と大腸菌ファージ MS2 の単色光による不活化の比較**  
**Comparative inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and coliphage MS2 by**  
**monochromatic UV Radiation**

GWY-Am Shinr ら

### はじめに

従来、排水処理は、様々な欠点があったにも関わらず、塩素消毒が主に用いられてきた。近年では紫外線消毒も有用であることが確認されてきている。また、塩素に耐性を有する *Cryptosporidium* 等に対しても、紫外線が有用であることが確認されている。排水処理では単色光の低圧紫外線ランプが用いられることが多いが、従来の研究では、多色光の中圧ランプを用いて実験を行っている。

本研究での目的は、*Cryptosporidium parvum* と大腸菌ファージ MS2 の単色光の低圧紫外線による不活化機構とその線量-不活化率の相関関係を検討するために実験を行った。また、光回復、暗回復による実験も行った。

### 実験方法

#### *Cryptosporidium parvum* と MS2

Pat Mason, Pleasant Hills farm, Troy, Idaho より購入した Iowa 株の *C. parvum* オーシストを購入し、子牛に感染させてから 3 日後より、回収を行った。精製は、夾雑物とスクリーンにてふるいにかけて後、不連続型ショ糖勾配、塩化セシウム(1.15mg/L)密度勾配法により行った。その後、PBS 溶液(pH7.2)にて洗浄し、抗生物質を含む緩衝溶液に懸濁させ、4℃にて保管した

F-特異 RNA 大腸菌ファージの培養及び評価は、宿主細胞大腸菌 C3000 を用いて、寒天重層法により試験を行った。宿主細胞を寒天の上層に加え、少量の PBS 溶液 pH7.2)を付与し、培養を行い、等量のクロロホルムにより抽出したのち、(4000×g)の遠心分離を 4℃にて 30 分行い、回収し、4℃にて保存した。

#### 低圧紫外線装置と線量測定

装置には、2つの 15W 殺菌ランプが設置されており、254nm の単色紫外線を 60×15mm のペトリ皿に照射するようになっている。なお、紫外線量の測定は International Light IL 500 線量計を用いた。本線量計は NIST の性能を満たしているものである。

#### 紫外線消毒実験の手順

*Cryptosporidium parvum* オーシスト及び大腸菌ファージを PBS 溶液にて混合希釈し、各々 10<sup>6</sup> 個/ml 以下になるように調整し、ペトリ皿に 5ml 添加した後、紫外線照射を行った。5ml を 60×15mm のペトリ皿に入れ、マグネチックスターラーで緩やかに攪拌しながら前述の装置にて紫外線照射を行った。照射終了後、10 倍ごとに希釈し生物試験をおこなった。

## DNA 回復実験手順

5 つのペトリ皿内の 5ml サンプルは低線量にて紫外線照射後、直ちにアルミホイルにて覆いをし、DNA 回復実験を行った。コントロール実験として、1 つのサンプルは 4℃にて保存し、他の 4 つのサンプルは 25 若しくは 37℃にて培養した。各温度において片方は 25～50cm の距離で 15W の蛍光灯を照射し(光回復)、残り一方はアルミホイルにて覆いをしたまま、攪拌した(暗回復)。DNA の回復が行われる 2 つの条件により、実験を行った。即ち、片方はバクテリアの DNA 回復が生じる条件(37℃で 2 時間)およびもう片方は哺乳動物の細胞の DNA 回復が生じる条件(25℃で 4～24 時間)である。培養後、直ちに希釈を行い、密集 MDCK 細胞に感染性試験を行うため植種した。

## 微生物試験方法

*Cryptosporidium parvum* の感染性の試験は MDCK 細胞培養感染法(ATCC CCL34)を使用した。MDCK 細胞は Eagle' s Dulbecco' s Modified Eagles 培地(DMEM/F1)を使用した。この培地は 10%の仔牛の結成、2mM のグルタミン、15mMHEPES により校正されている、試験時には、1 つの double-chambered Lab Tech Slide(Nalge Nunc International)に付き、 $7.5 \times 10^4$  個の細胞を植種し、培地は Ultraculture TM 培地(BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD)を使用した。この培地は、 $250 \mu\text{g}$  のカナマイシン、 $50 \mu\text{g}$  のゲンタマイシン、 $150 \mu\text{g}$  のマイコスタチン、2mM の L-グルタミン、を血清 free の培地に添加したものである。4 日齢の MDCK 細胞に  $300 \mu\text{L}$  のオーシストの懸濁原液若しくは希釈液を添加し、37℃にて脱嚢を促進させるために 3 時間培養し、初期の感染性を計測した。培養終了後、細胞単層を PBS 溶液にて洗浄し、 $1.5\text{mL}$  の Ultraculture 培地を  $1.5\text{mL}$  新たに追加し、48 時間の培養を行った、その後、細胞単層を PBS 溶液で洗浄し、Bouin 溶液(Sigma, St. Louis, MO)で凝固させ、脱色し、PBS 溶液の 1%血清アルブミンにてブロックした。培地には *C. Parvum* に必要で、 $300 \mu\text{L}$  赤い蛍光色素 Cy3 と結合する抗生物質 C3-C3 を植種した。抗生物質添加後は、室温の暗条件にて 90 分培養した、洗浄を行い、顕微鏡にて計数を行った。25 倍若しくは 40 倍にて、外部紫外線照射顕微鏡にて活性の観察を行った。活性の判断は、50～100 個を検鏡して判断した。Cy-3(赤色)に染色された *Cryptosporidium* は活性があるとした。オーシストの感染力は Thomas 式からの MPN 法を用いて評価した。大腸菌ファージ MSE は宿主細胞として *E. Coli* C3000 を利用した重層寒天法 を用いた。

## 測定データの取り扱い

*Cryptosporidium* 及び大腸菌ファージは初期濃度を  $N_0$  とし、各線量(D)に対する生育量( $N_d$ )とし、各実験毎にプロットした。

## 結果

Figure1 は、*Cryptosporidium* 及び大腸菌ファージの低圧単色光の室温における不活化実験結果を示している。*Cryptosporidium* の不活化は非常に早く、 $3\text{mJ}/\text{cm}^2$  で  $3\log$  不活化され、大腸菌ファージは、*Cryptosporidium* に比べ、不活化されにくいことが分かる。また、 $1, 2\text{mJ}/\text{cm}^2$  程度の紫外線照射量では、光回復、暗回復共に不活化率は変化しなかった。このことより、感染性で判断した場合、光回復、暗回復ともに生じないことが確認された。

大腸菌ファージ MS2 は  $30\text{mJ}/\text{cm}^2$  にて  $2\log$  の不活化されており、従来の知見と同様の結

果が得られた。

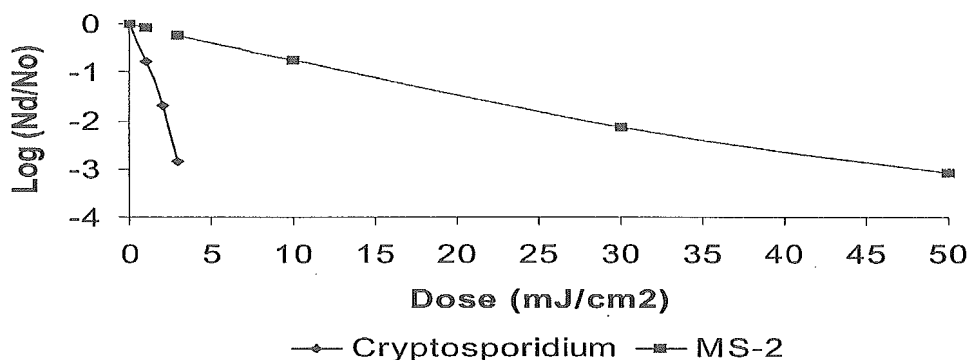


Figure 1. Inactivation of *C. parvum* oocysts and coliphage MS2 by low-pressure UV radiation

### 考察

本研究より *Cryptosporidium parvum* は単色の紫外線に対して高い感受性を示すことが確認された。254nm は可視光の中で微生物に最も有用であることが示されており、この波長の近辺が中圧ランプによる不活化の際にも大きな役割を占めていると考えられる。

また、MS2 が *Cryptosporidium* より紫外線に対して耐性を持つとの結果が得られた。両者を比較すると、MS2 は、全体の大きさ及びゲノムの大きさが小さく、紫外線照射の対象とはなりにくい可能性が考えられる。事実、水系の腸内微生物の中でも紫外線耐性の強い微生物であり、大腸菌ファージ MS2 は、紫外線消毒の処理性能を評価するのに有用な微生物であるといえる。



## 低圧ランプとパルスキセノンランプによる微生物の不活化の差異

## Inactivation differences of microorganisms by low pressure UV and pulsed xenon lamps

M.Otaki ら

## 概要

従来、紫外線消毒は高濁度時においては、濁質による妨害のため、効率の悪い方法と考えられてきていた。さらに、太陽光による光回復による問題も取り上げられていた。近年は、従来の低圧、中圧ランプを異なる広範囲にて高いエネルギーを照射するフラッシュタイプ(例：パルスキセノンランプ)が開発されてきている。本研究では、2種類の大腸菌ファージと3種類の大腸菌に関して、低圧ランプとパルスキセノン(PXe)ランプによる不活化効率の違いに関して検討を行う。パルスキセノンランプでは、光回復が生じず、また、高濁度時においてもテーリングが無いことが確認された。

## 実験方法

## 不活化実験装置

実験は 254nm の単波長を有する低圧ランプ(20W、東芝製)と 200~800nm に波長域を有するパルスキセノンランプ(岩崎電気製)の 2 種類を使用した。Figure1 に、マルチチャンネルの光検出器(大塚電気製)を用いた波長強度を示す。

ペトリ皿(5.4cm)を用いて figure2 のような実験装置を用いた。微生物を含む試験水は 20mL で光路長は、0.87cm に設定した。紫外線照射量に関しては、低圧ランプに関しては、図中のシャッターにより、照射時間を決定し、パルスキセノンランプに関しては、ランプの点滅回数により、照射量を決定した。

## 必要殺菌量の測定

PXe ランプは広範囲の波長を有するため、特定波長の照射強度を検知する機器では、PXe ランプの紫外線強度を計測するには不適當である。本研究では、(大垣、神子 1989)らの F-特異 RNA 大腸菌ファージ Q $\beta$  を用いて、生物線量測定を行った。この大腸菌ファージは、254nm の紫外線に対して Eq1 のように一次反応にて不活化される。

$$\ln(N/N^0) = -k \times I \times t / D \quad (1)$$

N: 紫外線照射後のバクテリア及びファージ濃度(個/mL)、N $_0$ : バクテリア及びファージの初期濃度(個/mL)、I: 紫外線強度(mW/cm $^2$ )、k: 不活化速度定数(cm $^2$ /mWs)、t: 照射時間(s)

Q $\beta$  の不活化速度定数は 0.17(cm $^2$ /mWs)である。紫外線強度は、不活化率及び紫外線照射時間により、計算を行う。PXe ランプは、ランプの点滅回数を計測し、生物線量測定により、紫外線照射量を計算した。

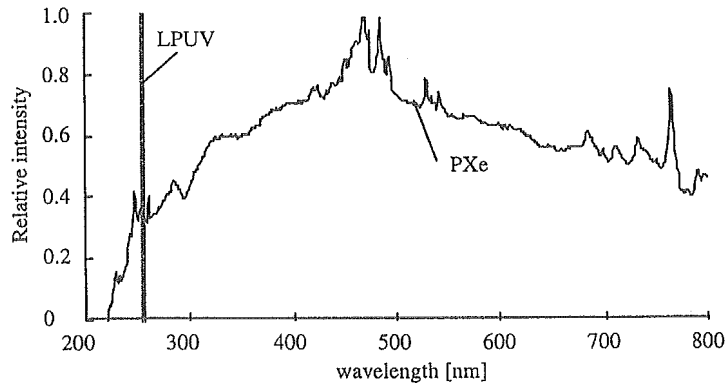


Figure 1 Spectra of LPUV and PXe lamps

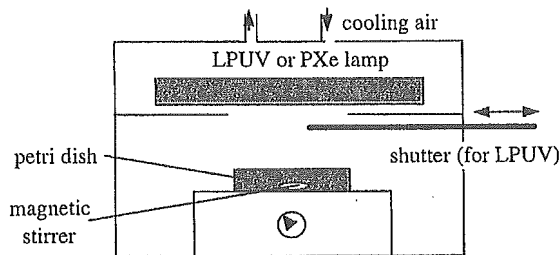


Figure 2 Schematic diagram of the batch reactor with LPUV and PXe lamps

### 対象微生物

大腸菌は(・)E.Coli K12F+(A/λ)(E.Coli K12F)、(・) E.Coli K12、(・) E.Coli Cを用いた。大腸菌数は、デソキシコール酸塩寒天培地法を用い、計数した。大腸菌ファージ T4(DNA ファージ)は、E.Coli K12F+(A/λ)を宿主細胞とした重層寒天法を用いて計測した。

### 光回復について

微生物の多くは可視光による紫外線消毒では、光回復が生じることが知られている。

### 濁質が不活化に及ぼす影響について

廃水処理への適用を考えた場合、濁度は、照射効率を考える上で、重要な要素となる。浄水汚泥をモデル濁質とし、PBSにて希釈した濁質を0,500,1000NTUにて添加した。その際の、254nmの紫外線透過率はそれぞれ、95%、7%、1%であった。

### 実験結果

#### 不活化効率

Figure3に微生物毎の不活化結果を示す。DNA ファージ及びRNA ファージ、3種の大腸菌は、低圧ランプ、PXe ランプにより不活化効率の違いは見られなかった。

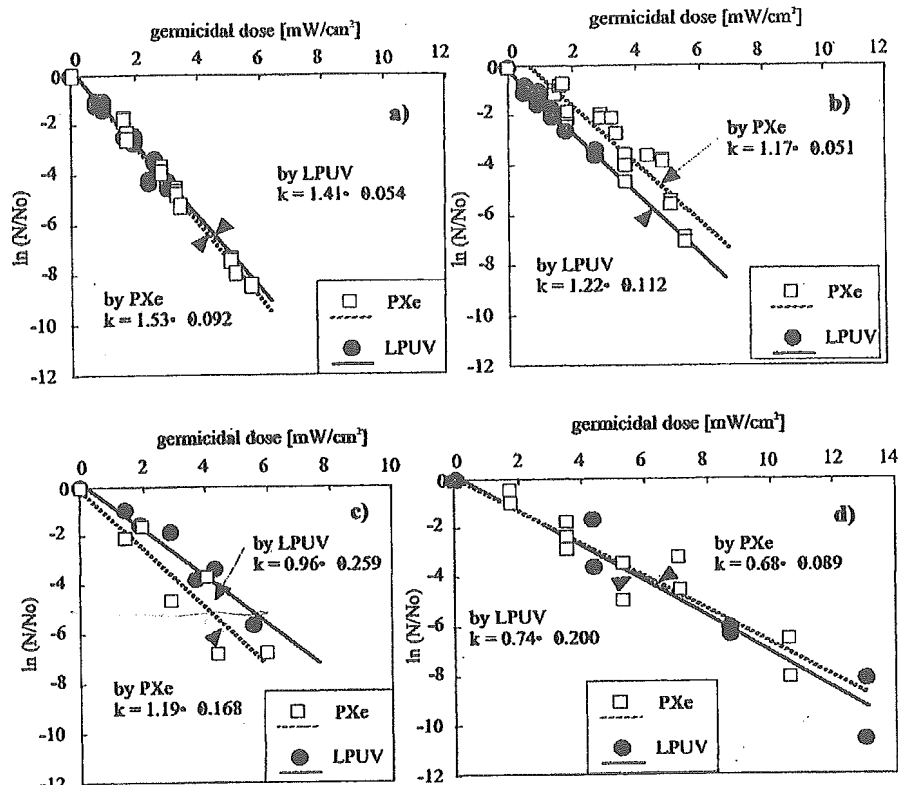


Figure 3 Inactivation rate of four microorganisms by PXe and LPUV lamps: (a) coliphage T4, (b) *E. coli* K12 F, (c) *E. coli* K12 (IFO3301), (d) *E. coli* C

### 光回復速度

大腸菌フェージには、従来の知見とおり、光回復は見られなかった。Dulbecco(1955)によれば、光回復は次の Eq2 のように表される。

$$S=(S_m \cdot S_0)(1-\exp(-k_p \cdot t))+S_0 \quad (2)$$

S:生存率(N/N<sub>0</sub>)、S<sub>m</sub>=光回復後の最大生存率、S<sub>0</sub>=紫外線照射直後の生存率、k<sub>p</sub>:光回復速度定数(1/min)

各大腸菌の k<sub>p</sub> 値は Table1 より、最小自乗法を用いて計算した。PXe ランプに比べ、低圧紫外線ランプが K<sub>p</sub> 値がはるかに大きいことが確認された。この現象のメカニズムは未だ明確ではないが、照射される波長の違いによるものと考えられる。例としては、短波長の紫外線が光回復に関連する酵素等に損傷を与えると考えられる。

### 光回復後の最大速度について

Kashimada ら(1995)によれば、光回復後の最大生存率(S<sub>m</sub>)は、Eq(3)に表されるように、一次反応で表され、Eq.1 及び Eq.3 より Eq.4 により、S<sub>m</sub> と S<sub>0</sub> の相関が表される。

$$\ln(S_m)=-k_m \cdot I \cdot t \quad (3)$$

$$\ln(S_m)=(k_m/k) \cdot \ln(S_0) \quad (4)$$

k<sub>m</sub>:光回復を含めた不活化速度定数

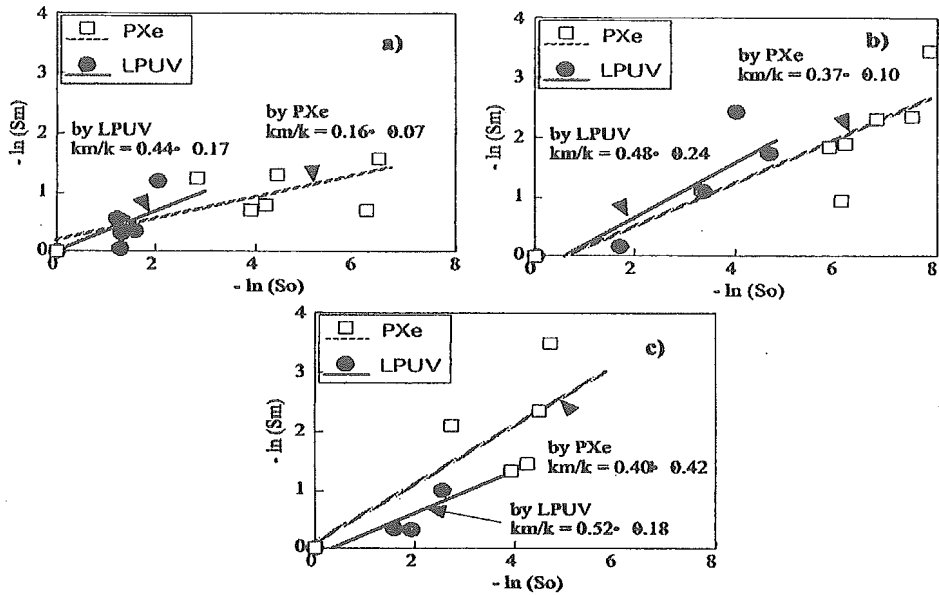


Figure 4 Correlation between  $\ln(S_m)$  and  $\ln(S_o)$ : (a) *E. coli* K12 F, (b) *E. coli* K12 (IFO3301), (c) *E. coli* C

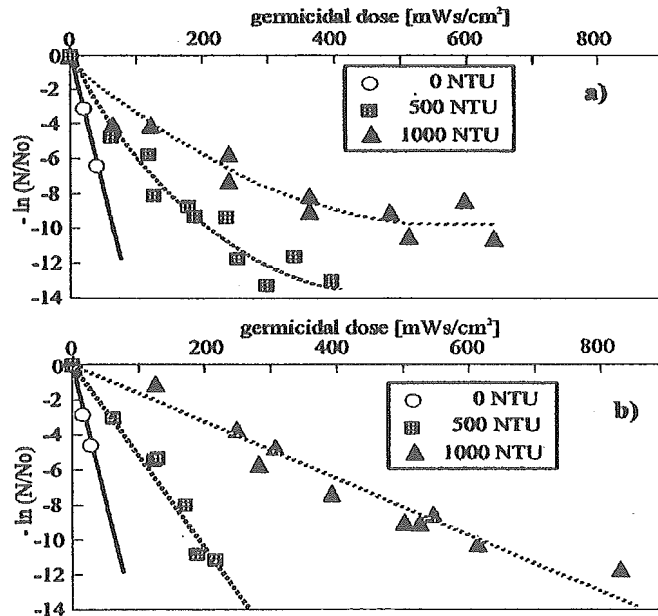


Figure 5  $Q\beta$  inactivation efficiency in high turbidity conditions: (a) by LPUV, (b) by PXe

Figure4は $\ln(S_m)$ と $\ln(S_o)$ の相関を示している。傾き(km/k)が大きくなるにつれ、最大生存率は小さくなる傾向にある。PXeランプと低圧ランプにより、最大生存率に大きな差異は生じなかった。

### 高濁度水での効率に関して

大腸菌ファージ  $Q\beta$  を用いて、高濁度時の消毒効率に関して評価を行った。一般に、SSが光を阻害・することにより、対象微生物への照射量が減少する。紫外線の照射効果は、Lambert-Beerの法則により透過率より評価でき、SSへの吸着は、微生物及びSS濃度によって決定される。Figure5は $Q\beta$ の両ランプによる不活化速度を示している。0 NTUには同じ挙動を示しているが、500 NTU、1000 NTUでは差異が生じている。低圧ランプにおけるテーリング現象は、低線量において、不活化速度が遅くなることを示している。この現象は、PXeランプでは生じていな

い。この現象は、広範囲の紫外線波長が光回復を阻害しているためと考えられる。また、別の可能性としては、SSの加温等で照射エネルギーの多くがSSに吸収された可能性も考えられる。しかし、詳細なメカニズムは解明されていないので、今後も研究が必要であると思われる。

## 結論

必要紫外線量に関しては大腸菌ファージT4、3種の大腸菌に関して、両ランプとも大きな差は見受けられなかった。光回復速度はPXeランプの方が遅い結果が出たが、最大生存率では差が生じなかった。濁度によるテーリングは、PXeランプでは生じなかった。実験結果から、PXeランプは高濁度の排水(家畜場からの排水等)に対して高い効果が期待できる。

3種の *Encephalitozoon* の紫外線による不活化の比較及び2種の DNA 回復欠損のある  
*Bacillus subtilis* による生物線量測定

Comparison of UV Inactivation of Spores of Three *Encephalitozoon* Species with That of  
Spores of Two DNA Repair-Deficient *Bacillus subtilis* Biosimetry Strains

J.L.Zimmer ら

概要

254nm の紫外線を照射した場合、*Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem* の芽胞は 3.2log の不活化を行うのに、それぞれ、60,140,190J/m<sup>2</sup> 必要であった。この不活化機構は、紫外線量を測定する際に用い、DNA 回復欠損のある *Bacillus subtilis* 株の内生孢子のそれと類似している。これより、*Encephalitozoon* 種も低線量にて不活化され、紫外線感受性の高い *B.subtilis* 株は、紫外線装置の性能を評価する際の有用な微生物であるといえる。

紫外線消毒は、ヨーロッパではすでに数年の実績があり、北アメリカの浄水処理においても、多くの浄水場で稼動を始めている。

腸に寄生する微胞子虫 *Encephalitozoon intestinalis* は、飲料水の安全に関する Contaminant Candidate list に掲載されており、他の *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem* は人間に対して感染性があることが知られている。唯一、*Encephalitozoon intestinalis* だけが、60J/m<sup>2</sup> で不活化することが知られており、その他の2種類に関しては、紫外線による不活化に関する知見は得られていなかった。

LT2ESWTR(long term 2 enhanced surface water treatment rure)により、紫外線装置は EPA の定める基準に適合することが求められるようになる。紫外線装置の検証は、消毒に適切に UV の照射が行われているかによって、検証されていた。紫外線センサーを用いて照射線量を実測するのは、厄介であり、また、不正確でもあった。そこで、生物学的に効率のよい紫外線装置を設計するためには、紫外線に対する感度が既知の微生物を用いて紫外線量を測定する直接的方法による必要がある。紫外線装置の性能が理想状態にどれだけ近いかを確認する際には、対象となる微生物と同程度の紫外線耐性を有する微生物と、対象の微生物より強い紫外線耐性を有する微生物の2種にて、装置性能を検証する必要がある。

本研究の目的は2つある。1つは、254nm に対する *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem* の紫外線耐性であり、もう1つは、DNA 回復欠損の *B.subtilis* の芽胞を、生物的に紫外線量を測定できるかを確認することであった。これらの実験は、オハイオ州の Cincinnati にある EPA の実験施設及びアリゾナ大学で実施した。

*E.cuniculi* ATCC50502、*E.hellem* ATCC 50451、*E.intestinalis* ATCC 50603 は、1週間毎に精製し、血球計算法により計数し、リン酸緩衝した生理食塩水もしくは、殺菌した脱イオン水にて4度にて貯蔵した。*B.subtilis* 株 WN333(trpC2 ΔsplAB::ermC1)と WN626(uvrB42 ΔsplAB::ermC1 amyE::tet)を本試験では、生物線量計として用いた。

*B.subtilis* 株は 37 度にて Luria-Bertani 寒天により培養した。この培地内には、抗生物質として、エリスロマイシン 1 $\mu$ g/ml、リンコマイシン 25 $\mu$ g/ml(WN333 用)、テトラサイクリン 10 $\mu$ g/ml(WN626 用)が含まれている。芽胞は、Schaeffer の孢子形成培地により培養し、リゾチーム法により精製した。紫外線照射は、標準の低圧水銀ランプ(model UVGL-25,UVP,Inc., Upland,Calif)若しくは、15W の低圧水銀ランプを有する平行ビーム装置 model G15T8(American UV Co.,Lebanon,Ind)を用い、UV reflector assembly は model XX-15S(UVP,Inc)を用いた。両装置とも、254nm の紫外線を照射し、紫外線束は UVX 放射計(UVP,Inc)、若しくは、検出器モデル SED240、NS254 フィルター、wide-eye デフューザーを搭載した UVX 線量計(UVP,Inc)を使用した。紫外線量計を用い、X-Y 平面の紫外線量の分布を 0.5cm 刻みで 6cm 円内を測定した。直径 6cm のペトリ皿内の平均紫外線照射量を James Bolton らが開発した UVCalc(<http://www.ijva.org>)を用いて算出した。*B.subtilis* と *Encephalitozoon* は殺菌した脱イオン水にて希釈し、10mL 中に 1 $\times$ 10<sup>7</sup> 個の芽胞が入るよう調整した。10 倍毎に段階的に希釈した *B.Subtilis* は Schaeffer の孢子形成培地上に植種し、37 $^{\circ}$ C にて培養した。

*E.intestinalis*、*E.cuniculi*、*E.hellm* は 24 穴の microtiter 皿の RK-13seeded 15mmThermanox に植種し、7 日間培養した。1 個以上のセルに感染性があれば陽性と判断した。

Table1 に示すように、*Encephalitozoon intestinalis*、*Encephalitozoon cuniculi*、*Encephalitozoon hellm* の芽胞は 3.2log の不活化を行うのに、それぞれ、60,140,190J/m<sup>2</sup> 必要であり、*C.Parvum* と同程度である。これより、この 3 種の微生物を不活化するには 200J/m<sup>2</sup> 以上の紫外線量が必要であることがわかる。

TABLE 1. UV inactivation kinetics of *E. intestinalis*, *E. hellem*, and *E. cuniculi* spores<sup>a</sup>

Spores	Site	UV fluence (J/m <sup>2</sup> )	No. of infected/ no. inoculated (P)	Response logit	Live spores (D)	Log applied dose (D <sub>0</sub> )	Log change (D/D <sub>0</sub> )	Temp (°C)
<i>E. intestinalis</i>	UA	50	141/5 (0.93)	2.639057	75	3.2	-1.3	25
	UA	60	1/10 (0.10)	-2.197225	1	3.2	-3.2	25
	EPA	60	2/15 (0.13)	-1.8718	1	3.2	-3.2	25
	UA	80	3/15 (0.20)	-1.386294	1	3.2	-3.2	25
	UA	90	0/10 (0)			3.2	-3.2	25
	EPA	90	0/10 (0)			3.2	-3.2	25
	UA	120	0/5 (0)			3.2	-3.2	25
	UA	140	0/5 (0)			3.2	-3.2	25
	UA	140	0/5 (0)			3.2	-3.2	5
<i>E. hellem</i>	UA	120	8/10 (0.80)	1.386294	55	3.2	-1.5	25
	UA	140	5/10 (0.50)	0	16	3.2	-2.0	25
	UA	170	2/10 (0.20)	-1.386294	4	3.2	-2.6	25
	UA	190	0/10 (0)			3.2	-3.2	25
<i>E. cuniculi</i>	UA	80	6/10 (0.60)	0.405465	29	3.2	-1.8	25
	UA	100	4/10 (0.40)	-0.405465	8	3.2	-2.3	25
	UA	130	2/10 (0.20)	-1.386294	2	3.2	-3.0	25
	UA	140	0/5 (0)			3.2	-3.2	25

<sup>a</sup> Calculations performed according to Korich et al. (8). See the text for details.

2 種の *B.subtilis* WN333, WN626 を EPA とアリゾナ大学で実験した結果、Fig.1 に示すように、WN626 は、20J/m<sup>2</sup> にて約 3.5~4log の不活化を示すことが確認された、WN333 に関しては、EPA とアリゾナ大学で実験結果に約 2 倍程度の差が見られた。これは、計数する際に、EPA では、膜を用い、アリゾナ大学では、spread plate を使用したためと思われる。しがし、WN333 は、どちらの実験においても、*Encephalitozoon* の 3 種の微生物を同様の不活化機構を示した。

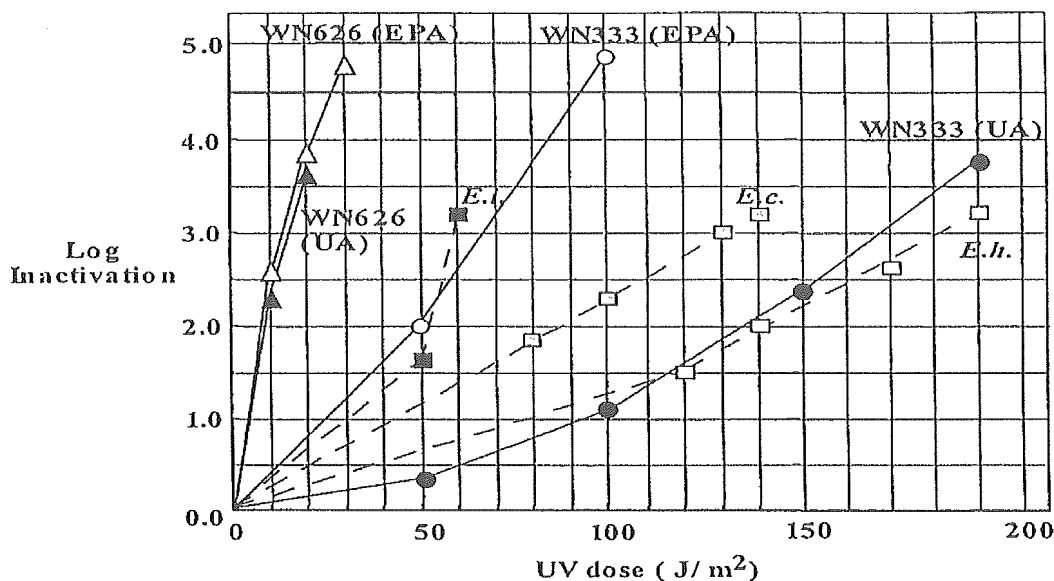


FIG. 1. Summary of spore inactivation by 254-nm UV. *B. subtilis* biosdosimetry strains WN333 (circles) and WN626 (triangles) at EPA (open symbols) or at UA (filled symbols). For comparison, the UV inactivation kinetics from Table 1 are plotted for spores of *E. intestinalis* (solid squares), *E. cuniculi* (hatched squares), and *E. hellem* (open squares). The data points shown for WN333 at UA are averages of three separate determinations, which varied by  $\pm 5\%$ .

本実験は室温 25 度にて行われたが、実際の浄水処理では、低温度にて紫外線消毒を行う場合も考えられる。そのため、*E. Intestinalis* を用いてアリゾナ大学で  $140\text{J}/\text{m}^2$  の条件で、25 度及び 5 度で実験した結果、両条件において 3.2log 以上の不活化が可能であった (Table1)。また、*B. Subtilis* WN333, WN626 は 25℃、5℃においても不活化機構は同一であることが確認された。

結論として、*Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellm* の芽胞は *C. Parvum* と同じ不活化機構であり、これらは、 $200\text{J}/\text{m}^2$  で不活化可能である。*B. subtilis* WN333, WN626 は、*ncephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellm* の芽胞や *C. parvum* の不活化カーブとよく似ており、これらの代替微生物として、紫外線装置の検証に相当であることが分かる。*B. subtilis* は以下の点から、代替の生物線量計として有用である。(1) 感染性を有しない (2) 真核細胞培養法や動物感染試験法を必要としない、(3) 24 時間以内に試験が終了する。(4) 基本的な生物試験の設備があれば、計数が可能である。



## 中圧紫外線ランプによる水中の内毒素の不活化

### Endotoxin Inactivation in Water by Using Medium-Pressure UV Lamps

W. B. Anderson ら

#### 概要

脱イオン水に様々な濃度の内毒素を注入し、中圧 UV ランプから紫外線を照射してこの内毒素の不活化を評価した。内毒素は実験条件下で行われた UV に比例して不活化することが明らかにされた。不活化の割合は、照射線量  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  当たり  $\sim 0.55$  endotoxin unit/ml であった。

(内毒素：菌体内に含まれ、菌体の破壊ないし溶菌により放出される。主としてグラム陰性桿菌の外膜に含まれ、下痢、出血、白血球の破壊、発熱、ショックなどを起こす。)

#### 実験方法

UV 照射が細菌の不活化に効果的な技術であることは長い間知られていたが、原生動物のシストやオーシストの不活化に対する効果について（飲料水の処理の観点から）関心が持たれてきている。

最近の調査では、例えば脱イオン水中への中圧 UV ランプによる  $3\text{mJ}/\text{cm}^2$  程度の低い照射線量により、*C. parvum* oocysts を 3.0 log unit (99.9%) 不活化すると報告されている。

*Cryptosporidium* オーシストは化学的消毒による不活化が困難であるため、飲料水処理施設（浄水場）では、既設の消毒機能や物理的な除去プロセスを増大させるために UV 照射を追加している。飲料水の消毒のためには、最低  $40\text{mJ}/\text{cm}^2$  の UV 照射が、少なくともはヨーロッパの二つの管轄区で立証されなければならない。北アメリカでは、規則は制定されている。ガイドラインでは再生利用される飲料水は  $50\sim 100\text{mJ}/\text{cm}^2$  の範囲が提案されている。

#### UV 吸収

全ての吸光度は HP-8453 紫外部-可視部吸光度計（光路長 10mm 石英セル）を用いて測定された。

#### 内毒素 (Endotoxin)

内毒素の濃度は、QCL-1000 chromogenic limulus amoebocyte lysate tube method により測定された。大腸菌から溶出した内毒素が実験にスパイク注入された。

大腸菌 O55:B5 ( $500\mu\text{g}/\text{ml}$ ) から溶出した内毒素の吸光度が測定され、Fig. 1 に示されている。最大吸収は 190nm と 205nm の間にある。次に 205nm と 240nm の間で減少し、2 番目の小さな吸収ピークが 255nm に観察されている。

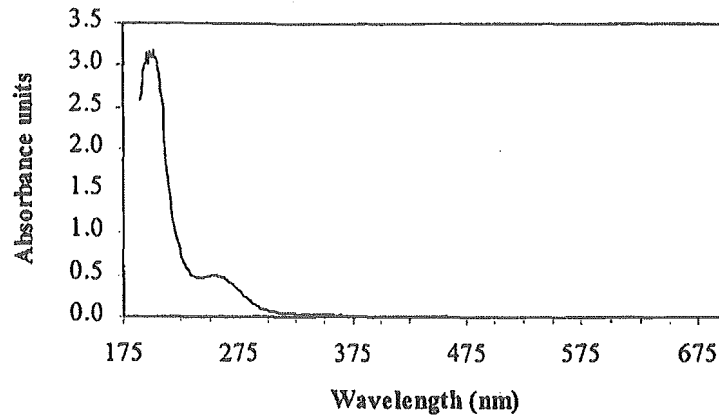


FIG. 1. *E. coli* strain O55:B5-derived endotoxin absorbance between wavelengths of 190 and 700 nm.

Fig.1 では大腸菌のO55 : B5 株から溶出した内毒素の波長 190~700nm の間の吸収を示す。

### ガラス製調整器

調整器は全てガラス製であり、350~400℃で少なくとも 30 分間加熱し、パイロジェンを除去している。

### UV 照射

UV 照射実験は収束ビーム装置 (Calgon Carbon Corporation) で行った。

200~400nm の波長幅を有する中圧 UV ランプの相対スペクトル強度は Fig.2 に示すとおりである。

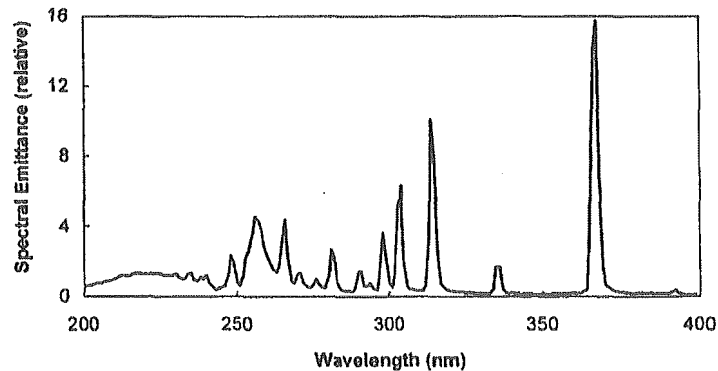


FIG. 2. Relative spectral emittance of medium-pressure UV lamp in the wavelength range from 200 to 400 nm. (Adapted from reference 2a with the permission of the publisher.)

### UV 照射条件

内毒素は Milli-Q Plus で処理された脱イオン水に添加され、300 と 400EU/ml の濃度で二つの別々の実験に供された。脱イオン水の pH は 5.9 であり、実験は室温 (22~24℃) で行われた。脱イオン水は、OH ラジカルの前駆物質の限界光輝のような潜在的なマトリックスの問題を避けて使用された。

UV 照射される水の一部として 5mL が、最初のサンプルの照射に先立って、既知量の内毒素を含むフラスコから採取された。これらの照射されていないサンプルは、同時にペトリ皿に置かれた。全てのペトリ皿は照射される間を除いて、暗状態に保管された。

非照射サンプル（その値は Fig.3 に 0 は  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  で示している）は実験の開始時にペトリ皿に置かれた水のサンプルである。

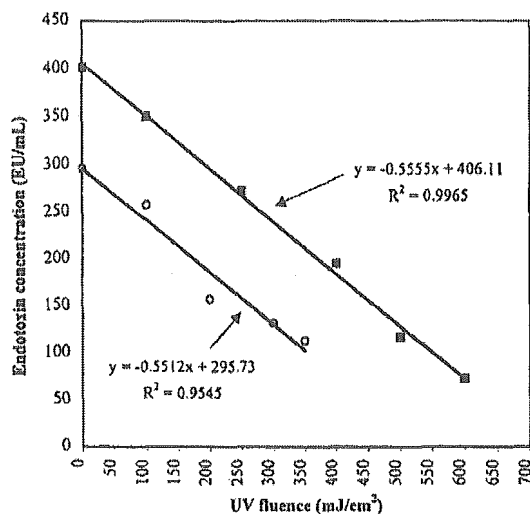


FIG. 3. UV fluence versus endotoxin remaining in spiked deionized water samples. Results from two separate experiments with differing initial endotoxin concentrations (multiply the millijoule per square centimeter value by 10 to convert to joules per square meter).

### 内毒素不活化

内毒素の不活化は UV の 100 から 600  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  の間で比例していることが明らかとなった。Fig.3 では、各実験に対して二つのラインと式が実験結果として示されている。

Table 1 は、UV 暴露後の理論的な内毒素の濃度を示している。

TABLE 1. Theoretical endotoxin concentration after UV exposure

UV fluence ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )	Theoretical endotoxin concn (EU/ml) after UV irradiation of samples with an initial endotoxin concn (EU/ml) of:					
	10	25	50	100	150	200
40	0	3	28	78	128	178
60	0	0	17	67	117	167
80	0	0	6	56	106	156
100	0	0	0	45	95	145

*Bacillus anthracis* の胞子の UV 耐性*B. anthracis* Sterne の胞子に対する UV 代替としての *Bacillus subtilis* の胞子の確認UV Resistance of *Bacillus anthracis* Spores Revisited: Validation of *Bacillus subtilis* Spores as UV Surrogates for Spores of *B. anthracis* Sterne

Wayne L. Nicholson ら

## 要約

最近の生物テロリズムの関心事は、*Bacillus anthracis* の胞子に対する紫外線照射への耐性に向けられています。*B. anthracis* Sterne の胞子は、*Bacillus subtilis* の標識株に一般的に使用される株よりも 254nm の UV に対して 3~4 倍の耐性を有しているということが文献レビューで明らかにされている。この報告を確認するために、*B. anthracis* Sterne の胞子を単離し、UV による不活化の実験が、*B. subtilis* の 2 種類の標識株 WN624 と ATCC 6633 を用いて行われた。

この実験データは、*B. subtilis* の胞子に対して効果的である標準 UV 処理が、*B. anthracis* の胞子の不活化に対しても十分効果があるということと、標準 *B. subtilis* の株の胞子が、*Bacillus anthracis* の胞子の UV 不活化に対する biodosimetry モデルとして確実に使用できるということを示している。

## 実験結果

Fig.1 各 *Bacillus* の胞子の UV 不活化曲線A : *B. subtilis* ATCC6633B : *B. subtilis* WN624C : *B. anthracis* Sterne

比較のため、Hoyer によって定量された、*B. subtilis* ATCC6633 の胞子の UV 不活化曲線を各グラフに示している。

データのポイントと error bars は、4 つの独立した試験から得られた平均値と標準偏差である。

$S/S^0$  は、UV 照射による生存率を示している。

S : UV 照射されて生存可能な胞子

$S^0$  : 照射されていない懸濁液から得られた胞子

3 つの胞子のタイプの UV 不活化曲線から、我々は、文献値と比較するために LD90 と D 値を計算した。その結果を TABLE 1 に示している。我々の実験条件下では、*B. anthracis* Sterne の胞子は、LD90 と D 値がそれぞれ 275、140J/m<sup>2</sup> であり、それぞれの値は、同様にコントロールされた条件下での *B. subtilis* の胞子の計算結果と非常に近似していた。そしてこのことは前述の文献に報告されていた 3~4 倍という値ではなかった。

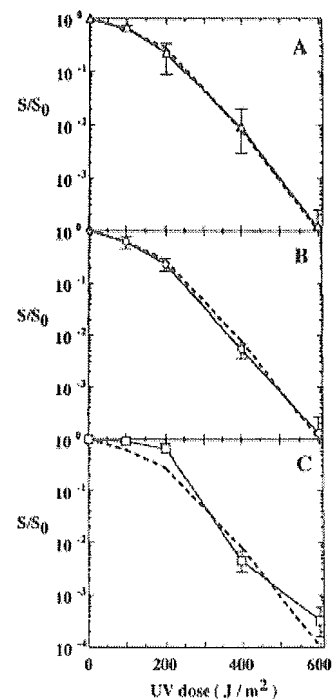


FIG. 1. UV inactivation curves of spores of *B. subtilis* ATCC 6633 (A) (triangles), *B. subtilis* WN624 (B) (circles), and *B. anthracis* Sterne (C) (squares). For comparison, the freely shaded line in the background of each panel represents the UV inactivation curve of spores of *B. subtilis* ATCC 6633, as determined by Hoyer (5). The data points and error bars are the averages and standard deviations of results from four independent trials.  $S/S^0$  represents the fraction calculated by dividing the viable spore titer at any given UV dose (S) by the spore titer obtained from the nonirradiated suspension ( $S^0$ ).