

高・低湿度時の CMD 及び GSD の比較を行った結果、水懸濁の場合 CMD は 8%増加し、PBS 懸濁の場合 6%増加した。高湿度時、水及び PBS 懸濁の粒径範囲 GSD は 1.53 とほぼ同じであった。ウシ胎仔血清のみを溶液として使用した場合、噴霧器内に泡が発生したため直接比較することは不可能となった。高湿度時、ウシ胎仔血清の CMD 及び GSD 値 (表 2) は低湿度の結果(表 1) より算出した。湿度を 36%から 68%と増加した場合、粒子サイズの中央値は 16%上昇した。

3. 3 異なる懸濁溶液によってエアロゾル化されたとき、*S. marcescens* が受ける紫外線滅菌照射被害(UVG I に対する感受性)の分析

低湿度 (36%) 時、蒸留水及びウシ胎仔血清に懸濁した *S. marcescens* の Z 値 (2.2 及び 1.7m² J⁻¹) が最も大きかったため紫外線滅菌放射被害が高かった。PB, 人工唾液及び PBS に懸濁した *S. marcescens* は (Z = 0.72~0.92m² J⁻¹) 紫外線滅菌放射被害をそれほど受けなかった。

6-ジェットコリソン噴霧器の 4, 5 及び 6 段の *S. marcescens* の紫外線滅菌放射被害を比較すると低湿度時、人工唾液及び PBS の保護作用が培養可能な粒子サイズと直接関連しており、紫外線滅菌放射に対する感受性は粒子サイズが小さくなるにつれ低くなる (表 3 を参照)。

表 3. 噴霧器[†]を用いた異なる *S. marcescens* 用培地及び湿度[‡]でエアロゾル化した際の UVGI に対する感受性 (Z)

段	懸濁溶液							
	蒸留水		PBS		ウシ胎仔血清		人工 唾液	PB
	高湿度	低湿度	高湿度	低湿度	高湿度	低湿度	低湿度	低湿度
4			1.07 $\bar{\gamma}$ 0.56	0.12 $\bar{\gamma}$ 0.11		-0.17 $\bar{\gamma}$ 0.45	1.40 $\bar{\gamma}$ 0.02	
5			0.77 $\bar{\gamma}$ 0.19	0.10 $\bar{\gamma}$ 0.04	1.30 $\bar{\gamma}$ 0.32	0.48 $\bar{\gamma}$ 0.82	0.75 $\bar{\gamma}$ 0.01	0.80 $\bar{\gamma}$ 0.17
6	2.20 $\bar{\gamma}$ 0.35 [‡]	0.92 $\bar{\gamma}$ 0.16	0.40 $\bar{\gamma}$ 0.12	0.14 $\bar{\gamma}$ 0.03	1.90 $\bar{\gamma}$ 0.51	0.78 $\bar{\gamma}$ 0.33	0.81 $\bar{\gamma}$ 0.22	1.03 $\bar{\gamma}$ 0.17
計 [‡]	2.20 $\bar{\gamma}$ 0.35a	0.92 $\bar{\gamma}$ 0.16b	0.72 $\bar{\gamma}$ 0.18b	0.11 $\bar{\gamma}$ 0.02c	1.70 $\bar{\gamma}$ 0.37a	0.61 $\bar{\gamma}$ 0.26b	0.84 $\bar{\gamma}$ 0.04b	0.92 $\bar{\gamma}$ 0.16b

[‡]低湿度 (36%) ; 高湿度 (68%)

[†]6-ジェットコリソン噴霧器 (CN-38 モデル ; BGI) 20lb/in²で運転

ウァンデルセン試料採取装置の各段のサイズ (μm) は 4 段 : 2.1~3.3, 5 段 : 1.1~2.1, 6 段 : 0.65~1.1 (Andersen Samplers, Inc)

[‡]UVGI に対する感受性 m² J⁻¹ (平均 $\bar{\gamma}$ 信頼区間 ; $\alpha = 0.05$) , CFU30 以上の段及び UV オフ時

[‡]Z 値は全段での 30CFU 以上の合計。a, b, c は統計上相違しないことを示す (多重比較に用いるボンフェローニの補正, P < 0.05)

PBS に懸濁した細菌の感受性値（Z）及びその粒子口径の間に回帰直線が得られた（ $Z=0.36$ 口径 $+0.12$ ； $R^2=0.97$ ）。しかし、PB及びウシ胎仔血清溶液では回帰直線は得られなかった。

高湿度では、UVGI感受性は低下し、低下した量はそれぞれの溶液で異なった（表3）。PBS溶液の場合、紫外線放射滅菌に対する保護作用と粒子のサイズとの関連性は見られなかった。ウシ胎仔血清溶液では、粒子のサイズが大きくなるにつれ保護作用が増加した。一部の同型培養では、大きい粒子でのウシ胎仔血清溶液の紫外線放射滅菌に対する保護作用は明らかであったが、マイナスのZ値もあった。Z値がマイナスであることはUVオン時のほうがUVオフ時より回収されたコロニー形成単位（CFU値）が大きいことを示す。マイナスZ値は信頼区間を増加した（表3.高湿度時ウシ胎仔血清溶液を参照）。

3.4 溶液濃度及びUVGIの有効性

細菌の有無及びUVGIオンオフ時に関わらず蒸留水以外の溶液での粒径範囲はほぼ同じであったため、細菌有り及びUVGIオフ時の結果のみ報告する。

表4. 噴霧器^アを用い異なった *S. marcescens* 用培地を36%の湿度でエアロゾル化した際の全粒子の数及び平均サイズ

測定基準	参考物質, 細菌無し			懸濁溶液			
	DOP ^イ	キャビネット環境内の空気	蒸留水	蒸留水	PBS	人工唾液	ウシ胎仔血清
全粒子の数 ^エ ($\bar{x} 10^6 m^{-3}$)	194	0	0.02	4.60	237	250	301
CMD(μm)	1.25	0	0.81	1.00	1.40	1.60	0.87
GSD	1.29	0	1.11	1.25	1.20	1.20	1.26

^ア6-ジェットコリソソ噴霧器（CN-38モデル；BGI）20lb/in²で運転

^イDOPは不揮発性参考物質であり、エアロゾルサイズを測るために用いる。

^ウ大気バックグラウンド

^エAPI粒子サイズ測定器（TSI Inc.）粒子サイズ範囲：0.1~10 μm ，密度：1g m⁻³，連続運転時間：1分（速度：2.5l/分）

湿度が36%時の細菌を含む・含まない、異なった溶液の粒子範囲を測定し、DOPエアロゾルのサイズと比較した（表4）。細菌を含まない蒸留水内に粒子が存在したのは噴霧器内の残留物が原因であると考えられる。残留物の濃度（0.02-10⁶m⁻³）は細菌が溶液に懸濁した時（4.6-10⁶m⁻³）と比較すると些少な値である。

全細菌による培養可能細菌の割合は、PBS（237 $\times 10^6/m^3$ ）の場合50,000：1と高かった。不

活性物質のシャドウイング効果を調べるため、*S. marcescens* を含む蒸留水を一つの噴霧器に入れ、もう一つの噴霧器にPBS + 0.8%NaCl (*S. marcescens* 無し) を入れ同時並行で運転を行った。この結果約 50,000:1 (全細菌:培養可能細菌), CMD2.1 μm が形成された。湿度の影響を検討するため、上記条件下で高湿度時、*S. marcescens* を含む蒸留水を用いてUVGIに対する感受性を調べた結果UVGIに対する感受性は2系列で相違($Z=0.92\pm 0.16\text{m}^2\text{J}^{-1}$)していた。これらの結果より、実験条件下ではシャドウイング効果が無かったと言える。本実験では空気動学的直径を計り粒子のサイズとした。しかしながら、粒子の物理的なサイズは比重、形状(動的形状係数)及びサイズ(1 μm 以下の粒子では滑り補正係数を使用)(6)によりことなる。幾何学的粒子サイズは算出しなかった。

3. 5 湿度及び紫外線滅菌放射による *S. marcescens* の不活性化

紫外線滅菌放射及び低湿度で乾燥することにより培養可能細菌は減少する。紫外線滅菌放射及び低湿度で乾燥する際の *S. marcescens* 不活性化の有効性を比較した。

湿度が 68 から 36%下げた際、同量の培養可能細菌が減少するために必要な線量紫外線滅菌放射は次式により算出した。

湿度を下げた際の細菌の残存率 = 細菌数_(低湿度) / 細菌数_(高湿度)

蒸留水使用時 = 683/859 = 0.795

PBS 使用時 = 5385/19498 = 0.276

同量の培養可能細菌を減少する際の必要線量紫外線放射 = $\frac{\ln(1/\text{細菌の残存率})}{\text{UVGI に対する感受性}}$

蒸留水使用時 = $\ln(1/0.795)/0.92 = 0.25 \text{ J m}^{-2}$

PBS 使用時 = $\ln(1/0.276)/0.11 = 11.70 \text{ J m}^{-2}$

高湿度時、同量の培養可能細菌を減少するには蒸留水の場合 0.25 J m^{-2} 及びPBSの場合 11.70 J m^{-2} 線量紫外線放射が必要であった。

4. 結論

4. 1 微粒子径

人体への健康影響の大半は、対象となる場所に空気中の微生物が堆積した結果、引き起こされることから、異なる溶液からなる生物エアロゾル粒子径の決定と予測は重要である。

懸濁溶液の生物エアロゾル粒子径によって引き起こされた変化は、複雑である。異なる溶液内での粒子径の種類は、粒子の拡張または収縮、懸濁溶液内の不揮発性分の付着、媒体の影響による凝集度合い、これらの2つかそれ以上の組み合わせられた事象に関係している可能性がある。微生物群が空気中に飛散し懸濁溶液が乾燥した後も不揮発性残留物が微生物群の表面に残っており、微生物群を含む小滴が乾燥するとすぐに安定した状態となるという事象から、懸濁溶液の粒子径の直接的な影響が理解できる。

小滴径は同様の配分としたことを考慮すると、超純水による懸濁溶液を除いてすべての GSD はほぼ等しい ($GSD=1.56$)。純水は気化して粒子の周辺に残留物を残さないことから、超純水による懸濁溶液が比較的単分散の培養粒子を発生させることは必然的な結果である。その他の懸濁溶液では、霧状に吹き付けによる小滴径の配分が一定しており、CMDs が異なる懸濁溶液の影響を反映している。粒子径の増大と、RH を増加させることによる、培養での回復率上昇については、すでに報告し、結論した。我々のデータは、異なる懸濁溶液による影響を比較した初めてのものである。RH を増加させた場合、ウシ胎仔血清のみの懸濁溶液の粒子径は、超純水やリン酸緩衝生理食塩水による懸濁溶液よりも、よく反応したことを報告する。

4. 2 湿度、粒子径、紫外線滅菌照射影響量

RH が低い場合、リン酸緩衝生理食塩水による懸濁溶液の粒子径が増大し、紫外線滅菌照射の影響が増加する傾向を示した。人工唾液の懸濁溶液粒子径についても同様の結果が得られた。また、ウシ胎仔血清のみの懸濁溶液の粒子径は、RH が低い場合に粒子径縮小等の影響は認められないが、RH が高い場合は粒子径の縮小という形で影響が表れ、これはリン酸緩衝生理食塩水や人工唾液とは正反対の傾向であった。

これらの結果は、各媒体の物性にて説明できる可能性がある。塩分を含む媒体が乾燥状態で巨大な結晶構造をつくることから、塩分層での不均衡を発生させ、紫外線滅菌照射が粒子へと浸透するものと推測する。塩は、粒子径に由来するより大きな結晶とより大幅な不均衡層によって、立方体の結晶を構成する、しかしながら、この現象は RH が高い場合には認められないため、おそらくは塩が水中に溶解して均質の紫外線滅菌照射に対する吸収層を構成することが原因であると考えられる。

4. 3 紫外線滅菌照射の効果による微粒子の変化

本研究では、エアロゾルの有無が紫外線滅菌照射効果の低下に影響を及ぼさなかった。我々は、次の仮定のもとでエアロゾル化したリン酸緩衝生理食塩水の粒子径を計算した。仮定 (1) リン酸緩衝生理食塩水は完全に乾燥している, (2) 形状が立方体である, (3) 密度は 2.17g/mL, (4) 直径 1.25 μm の小滴を構成している, (5) 懸濁液中の塩分濃度は 0.96% である。この仮定では、いずれのリン酸緩衝生理食塩水粒子も $9.74 \times 10^{-15}\text{g}$ の塩を含むこととなり、長さ 0.17 μm の立方体と等量である。また、粒子数 2×10^8 個/ m^3 という仮定のもと、エアロゾル化した粒子ひとつの体積が 5mm^3 のリン酸緩衝生理食塩水で満たされた空気の体積を計算した。これらの計算が、エアロゾル粒子は広い範囲で分布しており、そのなかのほんの一部のみが紫外線によって変化したという、本研究の結論を裏付けるものである。

4. 4 実験結果が示すこと

本研究は、様々な使用に対する適切な懸濁溶液利用を比較・決定する際に、有効なデータである。さらに、異なる懸濁溶液の粒子径の種類により、研究室にて決定した紫外線滅菌照射の効果に変化する可能性がある、という新たなメカニズムを我々は提案する。

紫外線滅菌照射の研究にて微生物群と同種の懸濁溶液を、使用することを推奨する。例えば、人間の呼吸器システムから放出されたエアロゾルをシミュレートする場合には、懸濁溶液には人工唾液を使用することが望ましい。

カリシウイルス群の不活性化

Inactivation of Caliciviruses

Erwin Duizer ら

National Institute for Public Health and the Environment (RIVM)

公衆衛生及び環境のための国家協会

(要約)

胃腸炎の原因となる食物や水系感染症ウイルスのほとんどはノロウイルスである。培養方法の欠如は使用される培養ウイルスを変換回路と不活性化の内部において増加する。本論文における不活性化は、腸内イヌ科カリシウイルス群 no.48 (CaCV), 呼吸器ネコ科カリシウイルス群 F9 (FeCV), FeCV・CaCV と PCR における減少の単位の不活性化と相互関連のあるノロウイルスを対象としている。浮遊しているウイルスの不活性化は 0°C~100°C までの範囲における温度と経過時間が関係する。0~150mJ/cm² の範囲における UV-B 照射は不活性化の要因となり、両方のウイルスに対し、34mJ/cm² の強度において 3D (D=1 log₁₀) で減少する。70%濃度エタノールによる不活性化は効率的でなく、30 分経過して 3D の割合の減少であった。塩化水素溶液は 300ppm 以上でやっと効果が現れる。FeCV は CaCV に対し、pH3 以下あるいは pH7 以上において高い安定性を示す。すべての処理に対し、RNA ウイルスが発見されることは、不活性化を減少させる。ノロウイルスは動物カリシウイルス群より敏感であることはなく、過小な pH 及び過大な pH に対しては強く抵抗した。全体的に、両方の動物ウイルス群は熱や UV-B を照射した際、エタノールや次亜塩素酸塩で培養した際において同様な反応形態を示した。低い pH における CaCV の低い安定性は典型的な腸内ウイルス (あるいはカリシウイルス) の反応を示してはいない。エタノールや高次亜塩素酸塩の濃縮による反応は、ノロウイルス群及びウイルスのない安全な水に伴い、媒介物の除去に対し表面的なウイルスの不活性化が必要であることを示している。

(キーワード)

不活性化, カリシウイルス, CaCV, FeCV, ノロウイルス

1. はじめに

胃腸炎の原因の代表となるウイルスはノロウイルスである（小さな構造を持ち、ノロウィークのようなウイルスとして知られている）。ヨーロッパ地域では、これらの高感染症であるウイルスは、胃腸炎の68～80%と言われているが、90%の胃腸炎の原因ではないかと思われて見積もられている。

ノロウイルスはカリシウイルス科の一種である。カリシウイルス群は重要な獣医であり、またヒトの病原菌であり、様々な種類の臓器感染による症状の幅広い原因となる。

ほとんどのカリシウイルスは、国内のネコより分離され（呼吸器ネコ科カリシウイルス群F9[FeCV]）病気の原因となるが、ある菌は病因学的に下痢に関係していた。イヌにおいてカリシウイルスに関連した病気は一般的ではないが、あるイヌ科カリシウイルス（CaCV）菌は下痢や水疱性の生殖器障害に関連していた。

以下の表1にウイルスに対する手引書・対象・アンプリコンを示す。

表1 手引書・対象・アンプリコン

ウイルス	PCR	プライマーとシークエンス		ORF1 nt	アンプリコンの大きさ (bp)
		正	逆		
ノロウイルス	Q-RT	5'-CTC CTC AGA ACC ACA TTT GG	5'-TAG CCT GTA TGA TGT CAG G	4365-4573	209
	RT	<i>JV12Y</i> , 5'-ATA CCA CTA TGA TGC AGA YTA	<i>JV13I</i> , 5'-TCA TCA TCA CCA TAG AAI GAG	4278-4604	327
イヌ科カリシウイルス	Q-RT	5'-GGT GGT GTG TCC TTC AAA AC	5'GGC ATA ACA GAA TGT ACA AA	5094-5317	223
	RT	<i>BR1</i> , 5'-CTG GGG WTG YGA YGT TGG	<i>YGDD</i> , 5'-AAT CTC ATC ACC ATA AGT	4778-5282	505
ネコ科カリシウイルス	Q-RT	5'-TAA TTC GGT GTT TGA TTT GGC CTG GGC T	5'-CAT ATG CGG CTC TGA TGG CTT GAA ACT G	2452-2543	83
	RT	<i>BR1</i> , 5'-CTG GGG WTG YGA YGT TGG	<i>FeCV-YGDD</i> , 5'-GAC ACC ATC ATC CCC GTA	4311-4778	502

2. 結果

温度による不活性化

高温時における不活性化 3D ($D=1 \log_{10}$) となるための必要時間を図 1 に示す。

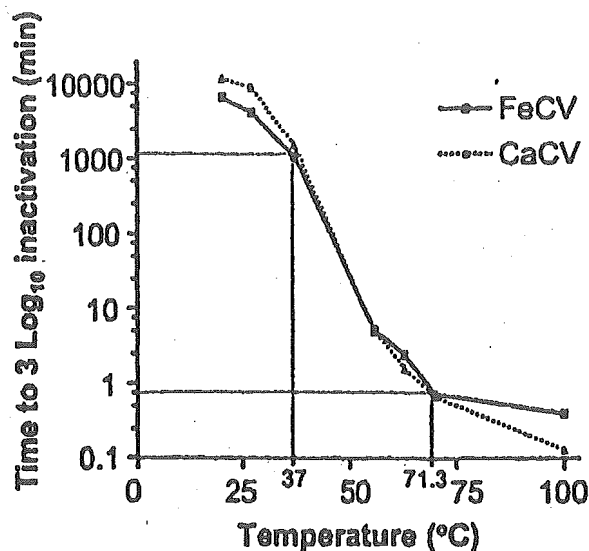


図 1 DMEM (タンパク質 3 to 4 $\mu\text{g/ml}$) におけるウイルス 50%生存率 (TCID_{50}) に対し、異なる温度における要求される時間

3D となるまでの必要時間は 37°C と 56°C の間で急速に減少しており、24 時間から 8 分となっている。71.3°C (低温殺菌温度) では、両方のウイルスに対し不活性化 3D となるための時間は 1 分となっている。

UV による不活性化

UV-B の照射における FeCV 及び CaCV の残存率の比較を以下の図 2 に示す。

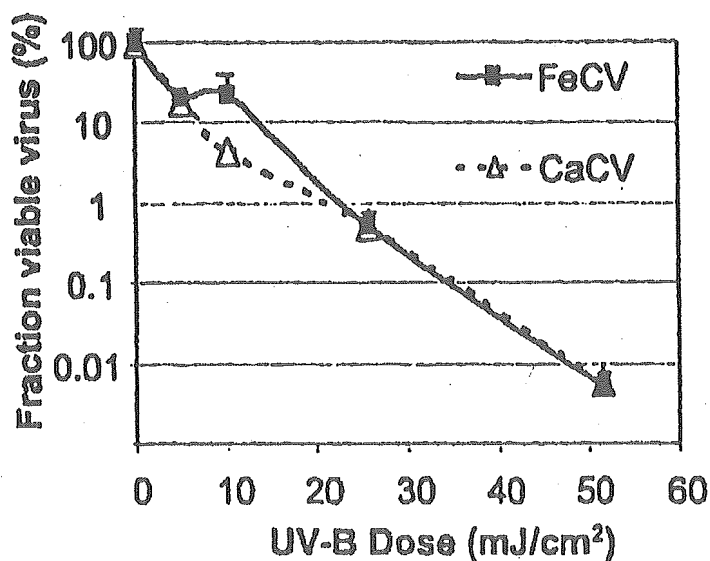


図2 0℃におけるUV-B照射によるカリシウイルスの不活性化率

不活性化2DとなるにはFeCVに対しUV照射21mJ/cm², FeCVに対しUV照射22mJ/cm²であった。これと比較し、両方のウイルスに対し、不活性化3Dとなるには34mJ/cm²であった。

pH

CaCVに対し、不活性化5D以上はpH5以下またはpH10以上であった。その結果を以下の図3に示す。

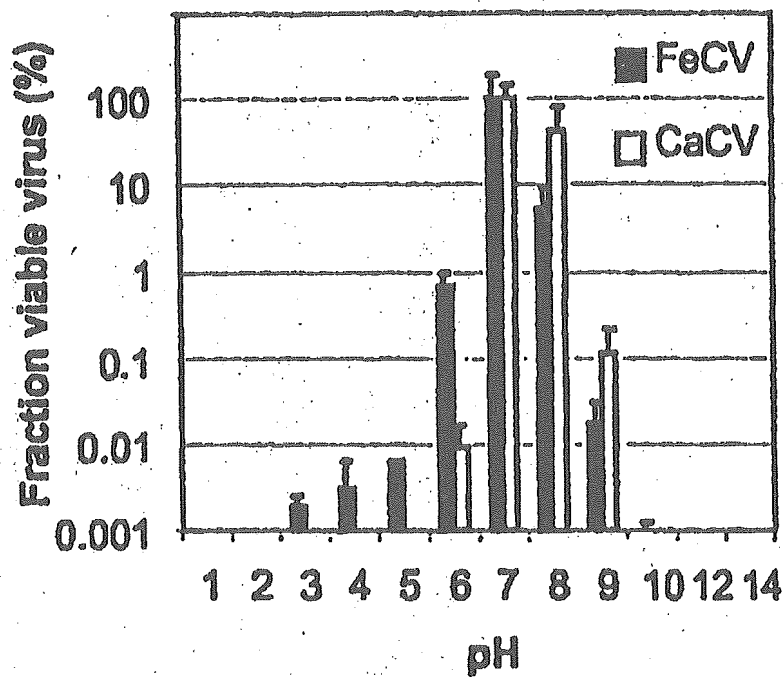


図3 異なるpHにおける37℃で30分間培養した際のカリシウイルスの不活性化率。エラーバーは標準偏差1を示す(n=4)。

エタノールによる不活性化

70%エタノールによる不活性化は2つのウイルスでは同程度とされた。その結果を図4に示す。

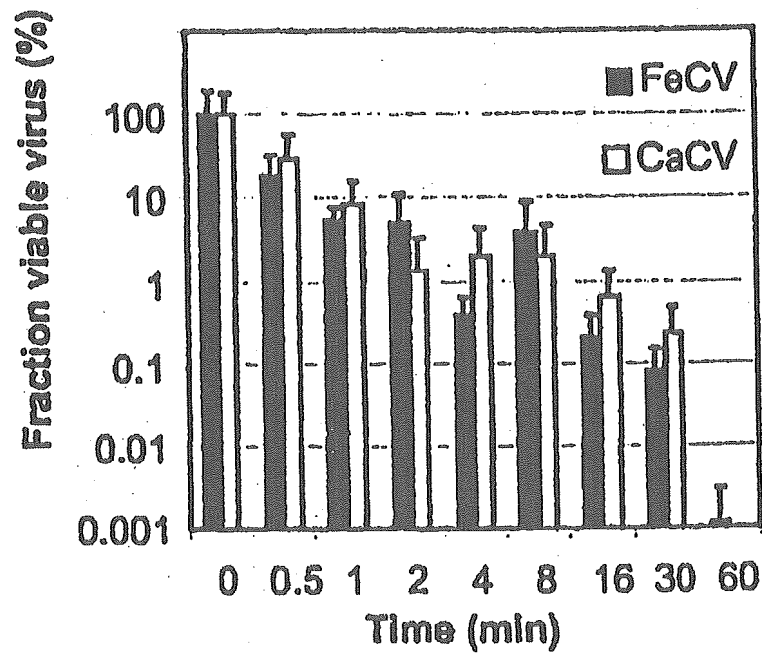


図4 70%エタノールで満たされた容器におけるカリシウイルスの不活性化率。エラーバーは標準偏差1を示す(n=4)。

次亜塩素酸塩による不活性化

ウイルス-DMEMにおける次亜塩素酸塩による不活性化は、1Dとなるまでは30ppmの遊離塩素が必要となる。その結果を図5に示す。300ppmではCaCVは3D不活性化3D以上となるが、FeCVは不活性化2Dとしかならない。

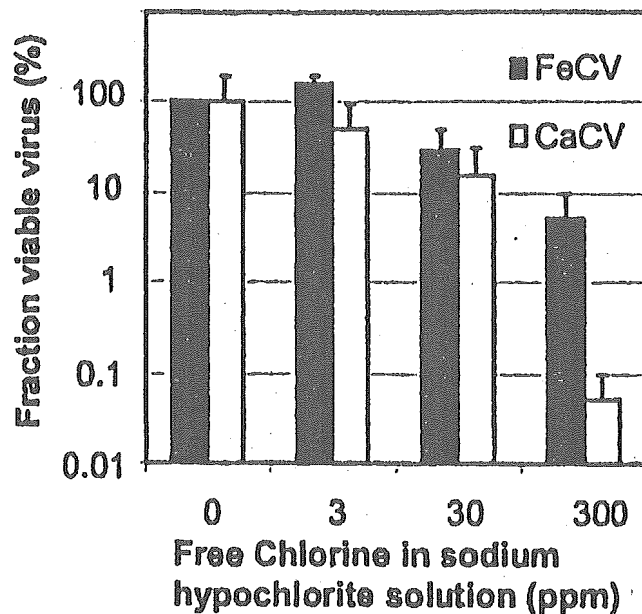


図5 次亜塩素酸塩による容器内温度を10分間保った場合のカリシウイルスの不活性化率。エラーバーは標準偏差1を示す(n=4)。

不活性化されたウイルス内のRNAウイルス発現

希釈したウイルス貯蔵のRNAウイルスと完全に不活性化されたウイルスは典型的でリアルタイムRT-PCR理論に基づくものであった。その結果を表2に示す。

表2 不感染処理を行った後のカリシウイルスRNAのRT-PCR発現

完全不活性化処理方法	FeCV		CaCV		ノロウイルス	
	RT-PCR 検査結果	Q-RT-PCR dCt	RT-PCR 検査結果	Q-RT-PCR dCt	RT-PCR 検査結果	Q-RT-PCR dCt
熱						
37°C,120h	++	0.4	++	3.8	++	2.8
37°C,168h	++	0.8	++	3.3	++	4.5
100°C,1min	++	0.9	++	5.2	++	1.9
100°C,3min	++	7.8	++	12.1	++	>7.5
UV						
103mJ/cm ² , 0°C	+++	0.2	++	2.5	++	0.4
206mJ/cm ² , 0°C	+++	-0.1	++	3.6	++	3.0
pH						
2,30min,37°C	---	6.4	---	11.0	++	0.2
3,30min,37°C	+++	5.6	+--	5.9	++	-0.3
10,30min,37°C	+++	3.5	+--	7.7	++	1.6
12,30min,37°C	---	11.3	---	17.3	++	7.4
次亜塩素酸塩						
3,000ppm,10min,RT	++	8.2	++	12.1	++	2.8
6,000ppm,2min,RT	+++	13.0	+--	>20.7	---	7.3
6,000ppm,10min,RT	-++	14.0	-+-	>20.7	---	>9.0

希釈された3つすべてのウイルスは、希釈濃度の上昇を伴いリアルタイムRT-PCRサイクル閾値(Ct値)の増加を示した。その結果を図6に示す。

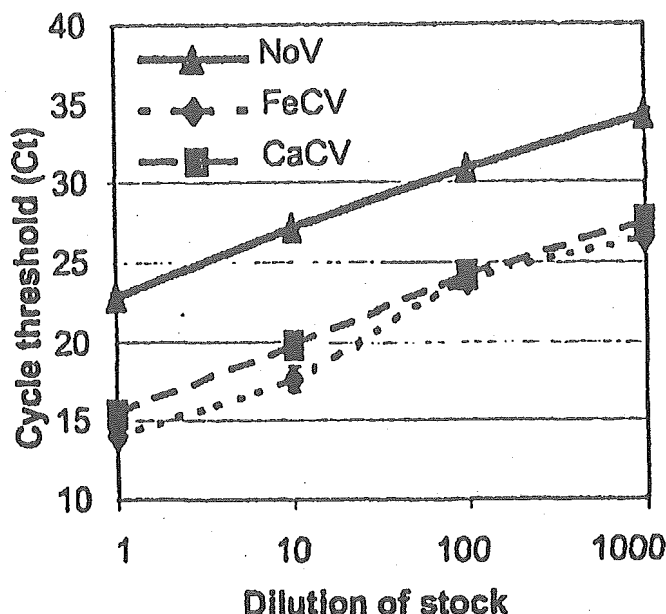


図6 PCR時間におけるカリシウイルス及びノロウイルス (NoV) RNA に対する Ct 値。転写の前段階において、RNA を在庫から抽出し、希釈した。各々のデータは標準偏差 2 を示した (n=2)。

○考察

本研究において CaCV 及び FeCV の両方のカリシウイルスは、検査液中で培養する際に 20℃までの温度では長期的に残ってしまうことを示した。

ウイルスに対し 37℃から 100℃までの温度変化を与えた際、56℃を超えなければ、不活性化の急激な変化はみられなかった。このことは、不活性化 3D とするためには低温度では不可能であることを示した。

よって、ウイルスの培養は通常培養 (63℃で 30 分間) または従来培養 (70℃で 2 分間) とする方が、高温短時間 (72℃で 15 秒間) で行うより望ましいとされる。さらに、高温短時間培養はカシルウイルス不活性化 1D となり、食物または飲料を安全とすることが達成されない。

FeCV の感染力を低減 (不活性化 3D とするために 34mJ/cm² 照射) するための UV-B 照射は、253.7-nm 照射と同じだけが必要である。しかしながら、両方の照射 (253.7nm 及び 280~320nm) の両方は似通った照射の同一ウイルス貯蔵に対し、反応が証明された。

pH 範囲において、FeCV の安定性は (例えば pH3 以上 pH9 以下) CaCV の pH 範囲の安定性と比べ、劣っていた。

2つのウイルスは 70%エタノールや次亜塩素酸塩に対して高い安定性を示した。300ppm までの次亜塩素酸塩において FeCV と CaCV に対しさらに高安定性を示すには、驚くべきことである。

感染が発見されない程度で行われた理論値のほとんどは、RNA が残っていることを示した。高濃縮 (次亜塩素酸塩) 高 pH または低 pH, または照射時間 (熱・UV 照射) は感染を根絶するために RNA 感染の上昇を必要とする。

ほとんどの処理において、カリシウイルス RNA の減少とノロウイルス RNA との減少の関連を発見した。このことは、ウイルスによって発生するキャプシド（ウイルスのコートたんぱく質）が熱処理方法・UV 照射・遊離塩素の処理により3つすべてウイルスに対し比較された。しかしながら、低 pH の後にキャプシドの安定性に対し顕著な相違点が発見された。ノロウイルスの RNA は pH2 で 30 分間 30°C で暴露した後に完全に保護された一方で、FeCV と CaCV の RNA のほとんどは減少した。このことが示すのは、本来の腸内ノロウイルスは、動物カリシウイルスの両方とは酸に対する安定性異なっていることがわかり、CaCV はほとんど本来の腸内病原菌ではないことが示された。

結論として、試験室での FeCV の利便性（例えば、標準培養に対する高耐性と滴定における細胞変性）、低 pH での安定性を考慮し、FeCV の方を CaCV の使用と比較し、ヒト腸内ノロウイルスとして採用する。ノロウイルスに対するモデルとしての FeCV の価値は他のウイルス群の使用と比較し顕著であり、典型的な腸内ウイルスはノロウイルスの存続の不活性化に対し試験に必要な圧力や感染リスクを考慮し、重要でありかつ選択するに望ましい。

モデル化した配水システムにおける UV 消毒：
生物膜の成長と微生物群集

UV disinfection in a model distribution system:
Biofilm growth and microbial community

Nicki Pozos ら

<要旨>

二つの配水システムモデルを並行して運転し、配水システム中の生物膜や微生物群集構成への UV 消毒の影響を調べた。一つのシステムでは UV ランプの照射を受け、もう一つのシステムでは対照実験として、UV 照射がない以外は同じ条件とした。UV 照射下の生物膜は、対照実験と比較し、水学的滞留時間を 12 時間から 2 時間へ減少させることによる栄養物質の利用しやすさの増加に対して、より敏感であった（すなわち従属栄養微生物の定常時密度がより大きく増加した）。しかしながら、UV 処理は生物膜の微生物群集に対して常に一定の効果があるわけではなく、HPC 密度を制御する過程は、生物膜を構成する微生物中の特定の菌株に対して独立であることを示している。微粒子による遮蔽は、UV 感受性をもつ微生物の生存に貢献している証拠があった。この仮説は、ある一つの実験で UV 照射下の生物膜群集と対照実験系とで高い類似性があることだけでなく、UV システムにおける UV 感受性をもつ微生物が存在することと一致している。日和見感染性病原体の細菌への侵入現象を仮想するため、生物膜群集が定常状態に達した後、それぞれの系に日和見感染性病原体を加えたところ、日和見感染性病原体は UV 処理によって影響を受けないが、そのかわり従属栄養微生物の生物膜密度と相関が見られた。

キーワード：飲料水、紫外線 (UV) 消毒、生物膜、DNA 指紋、ITS

1. はじめに

配水システム中の生物膜は病原性微生物やその指標生物の供給源である可能性があり、公衆衛生上問題となっている。飲料水の条件において生存し、再増殖し、生物膜を形成する能力をもつ病原体がいる可能性があることが証明されている。本研究では、UV 照射が影響するモデル化した飲料水配水システム中の生物膜と、消毒を行わない対照実験と比較することが主目的である。特定の目的は、(1)生物膜単独の UV の感受性、(2)流体体積と従属栄養大腸菌の生物膜密度、(3)病原体の生物膜への付着能力、(4)DNA 指紋を通して生物膜中の微生物群集の構成を特徴付けること、である。

配水システムにおいて、生物膜の増殖に関する UV 消毒の影響に焦点をおいた研究はこれまで少ない。過去に行われた 3 つの研究においては本研究とは焦点が異なっている。

DNA 指紋法は、ITS 分析を含め、自然中の微生物群集を特徴づけ比較するのに用いられてきた。これまで DNA 指紋法を用いた配水システム中の生物膜を特徴付ける報告はなかった。

2. 試料と方法

2-1 配水システムモデル

飲料水配水システムを仮想するため、生物膜の成長に関し、純粋培養と飲料水条件での混合培養のいずれの条件においても多くの研究で用いられている環状の反応槽を用いた。この反応槽は、外側の静止した円筒と内側の回転する円筒から構成され、口径 0.1m のパイプ中に 0.3m/s の流速で流れる状態を仮想するよう運転した。各々の反応槽には 20 個のポリ塩化ビニル製のスライドが含まれている。反応槽は、光化学反応が発生しないよう光から遮断されている。

二つのリアクターを並行に運転した。一つの反応槽では UV 照射を受けた水道水を流し、もう一つの対照反応槽では同じ水道水で UV 照射を受けない水を流した。対照実験の反応槽は、他の要因から独立に UV 消毒の効果を調べるために用いられるもので、一般の水道水を流した場合を代表することを意図したものではない。

流速は 1.4mL/分と 8.4mL/分に設定し、水理学的滞留時間 (HRT) をそれぞれ 12 時間と 2 時間とした。HRT が 2 時間の条件は配水管に水が流れている状態を表現するために選択されており、Camper[17]の研究では、HRT が 2 時間のときに最も微生物の活動が反応槽内ではなく生物膜中で行われることが示されている。一方、HRT が 12 時間という条件は、配水システム中の死に水状態を表現するよう選択された。

生物膜が成長する可能性の高い状態を仮想するため、栄養物質濃度が高く (500 $\mu\text{g/L}$)、温度の高い (20°C) 条件の元で運転している。微生物の成長には 15°C 以上の気温が関連していると考えられており、実際の配水システムにおける水温の温度帯は 20°C である。50 $\mu\text{g/L}$ 以上の生物分解性有機炭素 (AOC) は配水システム中の大腸菌の発生に関連している。

仮想した水道水の水質は 500 $\mu\text{g/L}$ の AOC, 100 $\mu\text{g/L}$ の硝酸, 0.085% のリン酸の緩衝溶液とした。仮想した水道水は、河川水から毎週採取され、4°C で保存された従属栄養微生物を添加された。この微生物は、5000 $\mu\text{g/L}$ の上記の有機物, 1000 $\mu\text{g/L}$ の硝酸, 0.085% のリン酸緩衝溶液を含む溶媒中で培養された。このように培養し、最終的に $10^2\sim 10^3\text{CFU/mL}$ の濃度に調整された。

UV 照射には低圧 UV ランプを用い、照射量は 106mJ/cm^2 とした。

生物膜と溶液の試料は、従属栄養細菌と大腸菌を収集し、同質化し、分析に用いた。

2-2 日和見感染性病原体の培養

生物膜中の従属栄養細菌密度が定常状態に達した後、日和見感染性病原体を連続的に系に加え、最終的に 10^3CFU/mL とし、侵入現象を仮想した。

2-3 培養菌の UV 感受性の決定

生物膜中から分離された培養菌を回収し、UV 感受性を試験した。HRT が 12 時間の対照実験系から大腸菌を 2 サンプル取り出し (12-C1 と 12-C2)、同様に HRT が 2 時間の対照実験系から従属栄養細菌を 2 サンプル取り出した (2-H1 と 2-H2)。また、HRT が 12 時間の UV 照射系から従属

栄養細菌を2サンプル取り出した(12-H1と12-H2)。大腸菌は、UV照射系に無く対照実験系にある微生物的菌株を代表させるために用いた。河川水培養系(RWC)はUV照射の前に微生物群集に与える平均的な影響を表現するために用いた。

6つの微生物サンプルとRWCを 10^5 (CFU/mL)程度に薄め、低圧UVランプを用いて254nmの波長のUVを照射した。

2-4 DNAの濃縮と分析

DNAゲノムの濃縮過程は以下のとおりである。

1. ポリメラーゼ連鎖反応を用いてDNAのITS部位を拡大する
2. 結果生じる断片をポリアクリルアミドジェル上で電気泳動により分離する
3. 得られたジェルを固定し、記録する

それぞれのDNA指紋中のバンドを検出し、同じサイズの断片同士にバンド階級を割り当て、各サンプルのDNA指紋を決定した。

異なるサンプル同士の微生物群集構成の比較は、二つのDNA指紋の比較に用いられるダイスの同一性指標(Dc)を用いて定量化した; $Dc=2j/(a+b)$,ここでjは比較する二つのDNA指紋に共通するバンドの数であり、a及びbはそれぞれ一つ目と二つ目のDNA指紋のバンドの数である。ダイスの同一性指標は比較されるDNA指紋間で共通するバンドの割合のみを考慮しており、バンド密度は考慮されていない。微生物群集のDNA指紋は高い確率で再生産が可能である。同一のDNAのダイスの同一性指標の平均値は94%である。同じ日に回収された同一の生物膜サンプルのDNA指紋は88%であり非常に類似している。

3. 結果及び考察

3-1 HPC密度と群落構成

反応槽中の従属栄養細菌の濃度及び生物膜密度を図1に示した。従属栄養細菌の水中濃度はUV照射や滞留時間に大きな影響は受けなかったが、対照実験系ではUV照射系より早く水中濃度が定常状態に達した。これは、対照実験系において成長できる微生物がずっと高濃度であったためである。

HRTが12時間の系における定常状態の生物膜の従属栄養細菌の平均密度は $5.89 \pm 0.22 \log \text{CFU/cm}^2$ (対照実験系)及び $5.46 \pm 0.24 \log \text{CFU/cm}^2$ (UV照射系)であり、平均値はそれほど大きな違いはなかった。しかしながら、HRTが2時間の系においては $6.11 \pm 0.19 \log \text{CFU/cm}^2$ (対照実験系)及び $6.81 \pm 0.25 \log \text{CFU/cm}^2$ (UV照射系)であり、統計的に有意な差が見られた。このことから、UV照射処理は、UV照射をしない処理に比べて、12時間の滞留時間では大きな影響はないが、2時間の滞留時間では生物膜密度が大きいことがわかった。また、滞留時間を12時間から2時間に変えることは、対照実験系においては大きな影響を与えないが、UV照射系においては

生物膜密度を大きく増加させることがわかった。

HRT が 2 時間の実験では、流れの速さと、それに伴う栄養分の流れは HRT が 12 時間の実験系に比べて 6 倍以上大きい。UV 照射系では、HRT が 2 時間の系において、より利用しやすくなった栄養分に対する反応が対照実験系に対し著しく大きい。従属栄養細菌の生物膜の定常時密度は UV 照射系では 12 時間の HRT に比べて 2 時間の HRT では 22 倍に増加するが、対照実験系では 1.7 倍に増加するにすぎない。UV 照射系におけるこのような生物膜の大きな反応性は、生物膜は主に表面で最初に生育する”プライマリー”細胞から生まれる”セカンダリー”細胞により構成されているということで説明がつく。”セカンダリー”生物膜細胞の栄養要求量は”プライマリー”細胞より小さいため、”セカンダリー”細胞の割合が高い場合、安定した密度の状態が持続する可能性が高くなる。表面に付着できる細胞が流水中にほとんどなく、流水中の細胞が表面に付着する速度が、既に付着している細胞が増殖する速度よりずっと小さい場合、”セカンダリー”細胞が支配的になることが期待されるであろう。大量の細胞の付着がなく、他の制限要素（例えば殺菌性物質の残渣）がなければ、生物膜中の従属栄養細菌の定常状態密度の制御に対し栄養分の利用性が支配的要素となるだろう。

対照実験系の生物膜は、UV 照射系に比べ、槽内保持時間が短くなることで栄養分の利用性が大きくなればなるほど、これに対する反応性がより弱くなる。従って、対照実験系においては、生物膜の定常状態密度に対し、他のどの要素よりも栄養分の利用性が貢献しているようである。一つ可能性のある影響には、槽内への著しい付着量が考えられ、これにより UV 照射系の生物膜に比べ、”プライマリー”細胞の割合が大きくなる。対照実験においては、UV 照射系よりプライマリー細胞の付着が著しかったと考えるのは妥当である。なぜなら、対照実験系においては流水中の微生物濃度や多様性が UV 照射系より著しく大きかったからである。従って、槽内の流水中に持続的に生息できない微生物であっても、反応槽の流水中に継続的に加えられることによって生物膜に付着する機会が十分にあったであろう。

2 時間の HRT における従属栄養細菌の生物膜密度に対する UV 照射処理の影響が著しく大きく観察されたことは、UV が常に特定の生物膜群集を選択しているためではないようであった。もし UV 消毒が特定の生物膜群集を選択しているならば、DNA 指紋のダイスの指標が、同じ HRT での UV 照射系のサンプル間で類似性が高く、UV 照射系と対照実験系で類似性が小さいことを期待するであろう。しかしそうではなく、表 1a に示すとおり、同じ HRT の UV 照射系サンプルは、常に対照実験系での場合より類似性が小さかった。例えば、12-1、12-2、2-1、2-3 を比較すると、ダイスの指標は UV 照射系のサンプル(31%、38%)は対照実験系のサンプル(それぞれ 35%、52%)より小さかった。その上、あるケースにおいては（例えば 12-1 の実験）表 1b に示すとおり、同じ滞留時間のサンプルの DNA 指紋との指標(31%)より対照実験系のサンプルの DNA 指紋との指標（83%）の方が大きかった。DNA 指紋により生物膜データを比較すると、定常状態の生物膜密度を制御する要素は生物膜を形成する特定の微生物菌株に対し独立であることが示唆される。

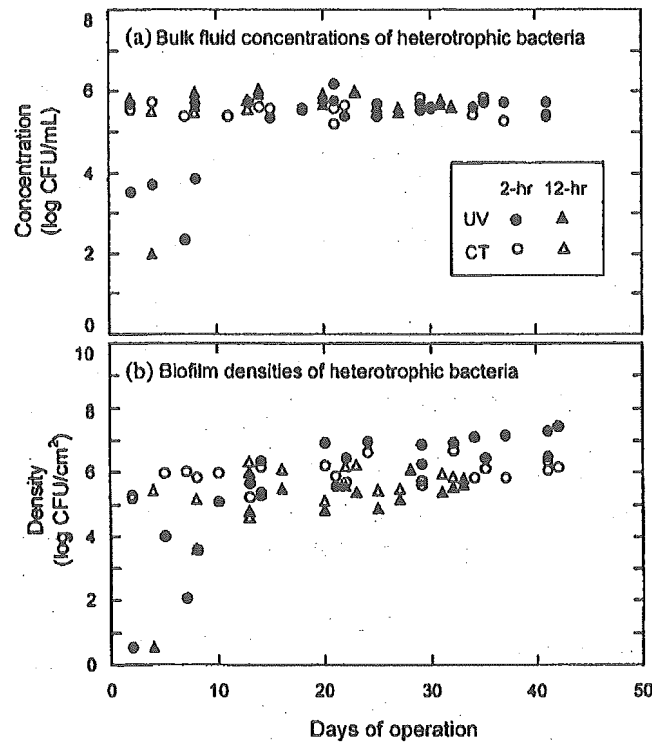


図1 UV照射実験及び対照実験の、滞留時間2時間及び12時間における反応槽中の従属栄養細菌濃度及び生物膜密度

各々のデータの点は、一つの日のサンプルを示す。同じ記号は、同じ実験間で同じ一定の傾向があるため、同じHRTにおける同じ実験のデータに用いている。

表1 UV照射実験と対照実験、滞留時間2時間と12時間の、実験終了時の生物膜におけるDNA指紋間のダイスの類似性指標の集計表

1a部			1b部	
比較	UV照射実験(%)	対照実験	実験	UV照射と対照実験間の類似性(%)
12-1&12-2	31	35	12-1	31
2-1&2-2	42	24	12-2	42
2-1&2-3	38	52	2-1	38
2-2&2-3	73	41	2-2	73
平均	46	38	2-3	46

反応槽の流水中の生物群集については、HRTが12時間の実験において一つ、及びHRTが2時間の実験において一つのみを調査している。反応槽内の流水中の生物群集は、UV照射系と対照実験系の両方において、HRTが2時間の場合よりHRTが12時間の実験の生物膜群衆により類似していた(図2)。UV照射系においては、反応槽内と生物膜群集とのダイスの類似性指標は、12-2

において 89%であったが、2-2 においては 67%しかなかった。これに対し、対照実験系においては 12-2 の実験でダイスの類似性指標は 53%であり、2-2 の実験においては 27%しかなかった。

HRT が 2 時間の実験 (2-2) において生物膜と反応槽流水中の微生物群集の類似性が低い妥当な説明は、保持時間がより短いことで増殖速度が大きい微生物が反応槽内に選択的に生き残るが、反応槽内に付着した相においては競争力が高くないことである。他の研究事例にも同様の現象は見られる。

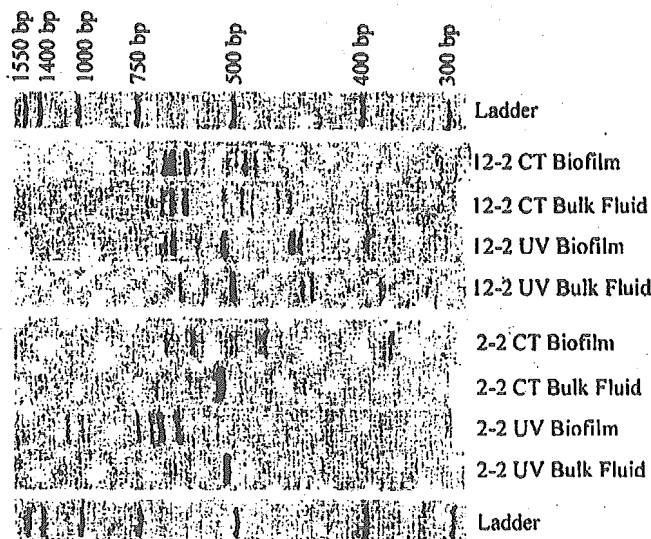


図 2 実験 12-2 及び 2-2 における、UV 照射実験と対照実験から回収した最終的な生物膜と反応槽の ITS 指紋

3-2 培養菌の UV 感受性と粒子遮蔽

6つの分離微生物及び RWC(河川水培養系)微生物の量-反応関係曲線と図 3 に示す。従属栄養細菌と大腸菌は別々に示している。6つの微生物の菌株と RWC の UV 照射に対する反応を決定するため、量-反応関係曲線の最初のなだらかに肩がでる領域より先の、傾きが負となる領域に対し直線近似を用いた(表 2)。UV 感受性が高いほど、量-反応関係曲線の傾きがより急になって示される。

おそらく UV 照射系の生物膜の微生物菌株がシステム中で UV 消毒に耐え抜いていると考えられるため、UV 照射系から分離された菌株は比較的 UV 消毒に耐性があるということが考えられる。しかしそうではなく、UV 照射前の流入水における平均的な微生物である RWC よりも著しく UV 耐性があったのは、UV 照射系から採取した 4 つの菌株のうち一つのみであった(図 3 及び表 2)。加えて、UV 照射系中の微生物は、対照実験系中に存在して UV 照射系に存在しない大腸菌よりも UV 照射に対しより耐性があることが予測される。しかし実際はそうではなく、一つの大腸菌(12-C1)は試験された中で最も感受性が大きかったものの、大腸菌は UV 照射系から分離された全ての微生物より UV 照射に対し感受性が著しく強いわけではなかった。

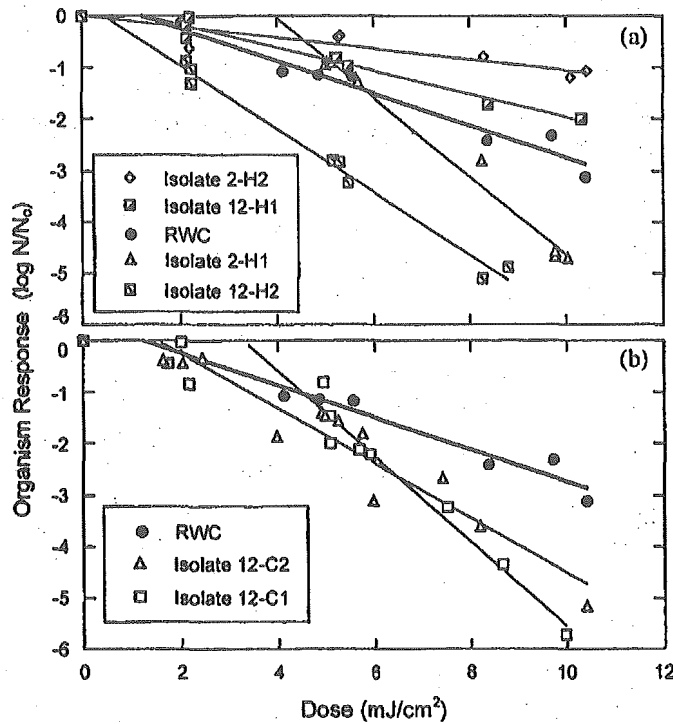


図3 6つの微生物及び河川水培養微生物（RWC）の実験データ及び近似直線。
 (a)UV 反応槽から分離した従属栄養細菌, (b)対照実験反応槽から分離した大腸菌。RWCの同じ量-反応関係曲線は、比較のため両方の曲線上に示した。

表2 95%信頼区間における最適近似直線の傾き及び切片（図3参照）

微生物サンプル	順位	傾き	切片	流出水濃度 (CFU/ml)	細胞数 (CFU)
12-C1	1	-0.83 ± 0.17	-2.75 ± 1.14	$\sim 10^{-80}$	$\sim 10^{-75}$
2-H1	2	-0.77 ± 0.12	-3.06 ± 0.94	$\sim 10^{-74}$	$\sim 10^{-68}$
12-H2	3	-0.62 ± 0.08	-0.29 ± 0.42	$\sim 10^{-61}$	$\sim 10^{-55}$
12-C2	4	-0.53 ± 0.12	-0.82 ± 0.69	$\sim 10^{-51}$	$\sim 10^{-45}$
RWC	5	-0.31 ± 0.12	-0.39 ± 0.92	$\sim 10^{-28}$	$\sim 10^{-22}$
12-H1	6	-0.22 ± 0.04	-0.28 ± 0.25	$\sim 10^{-18}$	$\sim 10^{-13}$
2-H2	7	-0.10 ± 0.11	-0.00 ± 0.83	$\sim 10^{-6}$	~ 1

分離した菌とRWCをUV照射の感受性が高い順から低い順に並べている；傾きが小さくなる順。「流出水濃度」は、量-反応曲線による外挿に基づいた流出水の理論的 maximum 濃度である。「細胞数」は、各々の微生物サンプルがUV反応槽に実験中に流入する細胞数の理論的 maximum 数である。

UV照射への感受性をより深く調査するため、所定の実験時間にわたりUV照射を受けた後に環状反応槽中に流入する微生物の理論的 maximum 数を全ての微生物及びRWCに対して決定した(表2)。以下の保存の仮定を設けた；(1) 各微生物は仮想したUV照射前の飲料水(10^5 CFU/mL)中におい