

大腸菌ファージを指標微生物とした紫外線照射量の測定

中野 仁* 足立伸一*

耐塩素性病原微生物であるクリプトスポリジウム対策として、これまで効果が期待できないとされていた紫外線照射処理が、低照射量で感染性を消失できることが明らかになり、省令の改正により「紫外線照射槽を通過する水量の95%以上に対して、紫外線(254 nm)の照射量を常時 10 mJ/cm²以上確保できる」ことを条件に水道施設への適用が可能となった。

そこで大腸菌ファージを指標微生物として、室内実験による感受性試験と紫外線照射装置にファージを添加した液を通水する試験を行ったところ、短い照射時間にもかかわらず、同じ試験条件下での測定値の安定性、再現性に優れ、正確な照射量が測定できることが明らかとなった。

キーワード：紫外線、クリプトスポリジウム、大腸菌ファージ、指標生物

key words : ultraviolet, cryptosporidium, coliphage, bioindicator

耐塩素性病原微生物であるクリプトスポリジウムにより水源等が汚染され、飲料水や水道水に混入してこれまでしばしば集団的な下痢症状を発生する事例があった。水道原水に混入するおそれのある場合には、浄水施設にろ過等の設備を設けることとなっているが、設置コストや維持管理頻度の面から、必要なる過設備が設置されていない施設が簡易水道のような小規模施設に数多く残存している。平成20年3月末時点では全国の約2500の施設においてクリプトスポリジウムを除去できるろ過設備が設置されておらず、早急な対策が求められている。大阪府内においても平成18年5月に能勢町山辺川簡易水道(451世帯)の浄水で検出され、給水停止になったことは記憶に新しい。

254 nmを主波長とする紫外線は、微生物のDNAに直接作用して不活化し、塩素やオゾンを使用した場合に比べ変異原性物質を作り出しにくい利点があり¹⁾、清澄で懸濁物質や紫外外部吸収が少ない水に対する消毒には効果的であるが、クリプトスポリジウムの不活化には大量に照射する必要がある、現実的ではないとされていた。しかし、その後の研究により、少ない照

射量で感染性が消失することが明らかにされた^{2,3)}。

これを受けて、耐塩素性病原微生物対策に紫外線処理を位置づけた「水道施設の技術的基準を定める省令の一部を改正する省令」が平成19年3月30日に公布され、同年4月1日より施行された。このなかで「紫外線照射槽を通過する水量の95%以上に対して、紫外線(254 nm)の照射量を常時 10 mJ/cm²以上確保できるもの」としており、この10 mJ/cm²の照射でクリプトスポリジウムの99.9%が不活化されるとしている。

そこで紫外線照射設備を水道施設に導入するにあたっては、この条件を満足することをあらかじめ実証することが求められており、その実証試験方法⁴⁾が示された。具体的にはあらかじめ指標微生物の紫外線感受性を測定(感受性試験)し、紫外線照射装置に同一指標微生物を供することによって、その生残率から紫外線照射装置の与えた照射量を求める(通水試験)方法である。

今回、実証試験方法に準じて微生物を指標とした場合の測定値の安定性や再現性を確認するとともに、今後の紫外線消毒や光酸化処理の研究に資するために検討を行った。

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課

Measurement of Ultraviolet Exposure with Coliphages as Indicator

Microorganisms.

by Hitoshi NAKANO and Shinichi ADACHI

実験方法

1. 供試微生物

指標微生物として人間には感染せず、大腸菌に感染するウイルスであるファージを用いた。使用した微生物は独立行政法人製品評価技術基盤機構から分譲された下記を使用した。

大腸菌：*Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919 (NBRC No.3301)

大腸菌ファージ：*Escherichia coli* phage Q β (NBRC No.20012)

2. 培地

大腸菌とファージの増殖用液体培地の組成を下記に示した。これを蒸留水 1 L に溶解し、1N 水酸化ナトリウム溶液で pH を 7.0 \pm 0.2 に調整したものをを用いた。

| | |
|--------------------------------------|--------|
| ポリペプトン | 10 g |
| 酵母エキス | 5 g |
| ブドウ糖 | 1.5 g |
| NaCl | 5 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.2 g |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 0.05 g |

大腸菌ファージを重層法で測定する際の下層寒天培地は、上記液体培地に寒天を 1.1%濃度になるよう添加したものを、上層軟寒天培地は 0.8%濃度になるよう調整したものをを使用した。

3. 大腸菌ファージの増殖法

試験に供するため高濃度にする必要があり、その増殖手順を下記に示した。

試験管に入れた液体培地 8 mL に大腸菌の斜面保存培地からコロニーを釣菌し接種する

↓

恒温水槽で 36℃、3.5 時間振盪培養する

↓

200mL 三角マイヤに入れた新たな液体培地 100mL に上記培養液を全量を入れる

↓

保存高濃度 Q β 液を 1 mL 接種する

↓

恒温振盪培養器で 37℃で 3.5 時間振盪する

↓

培養液を 6,000 rpm、4℃で 10 分間遠心分離する

↓

分離上澄み液を孔径 0.45 μ m の滅菌済みフィルターでろ過滅菌する

4. 大腸菌ファージの測定法

- ①測定前日に下層寒天培地を固化したシャーレを用意し、室温もしくは 36℃の恒温器内に放置し、培地の汚染がないことの確認と表面の乾燥を行う。
- ②試験当日、試験管に入れた液体培地に大腸菌を接種し、36℃、3.5 時間振盪培養したものをを用意する。
- ③リン酸塩希釈水で段階的に希釈した試料 1 mL を 40℃に保温した試験管に入れ、培養直後の大腸菌 0.3 mL、滅菌塩化カルシウム溶液 (CaCl₂ 1.13 g /100 mL) を 0.05 mL 添加する。
- ④これに上層軟寒天培地を 3 mL 添加し、混和したあと下層培地が入ったシャーレに流し込み、再度混和する。
- ⑤十分硬化したのち 36℃で 15 時間培養し、大腸菌を溶菌してできたプラーク (写真 1) の数(PFU)を測定する。

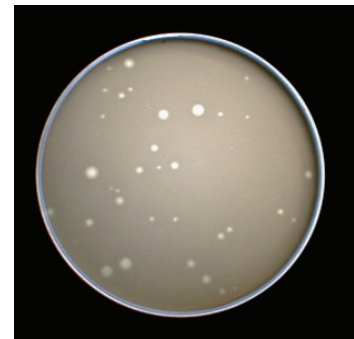


写真 1 平板上のプラーク

5. 感受性試験方法

1) 試験装置の概要

感受性試験にコリメート法を用い、その概要図を図 1 に示した。試験装置は紫外線ランプ、コリメートチューブ、供試微生物液を入れたシャーレで構成し、全てを安全キャビネット内に設置した。この方法は配置した紫外線ランプから、コリメートチューブで囲まれた空間を通った紫外線のみを受ける方法で、菌液面はランプからのほぼ平行光を受けている。

2) 使用器材

使用した器材は次の通りである。

紫外線ランプ：(株)東芝製 殺菌ランプ GL 20 の中央部、幅 9 cm を除いて他の部分はアルミ泊で被覆
 コリメートチューブ：内径 70 mm、長さ 70 mm のプラスチック円筒の内部に黒色フェルトを貼付
 シャーレ：内径 60 mm、外径 66 mm のガラス製

3) 紫外線強度計

供試液面の紫外線強度の測定には、実証試験方法に記された NIST (米国標準技術局) で校正された米国ウルトラバイオレット社製 UVX METERRADIO を用いた。

4) 試験手順

感受性試験を実施する際の手順を下記に示した。

- 1 紫外線ランプを 5 分以上点灯し、強度を安定化させる。
- 2 一旦消灯し、被検液 5mL を入れたシャーレにコリメートチューブをセットし、紫外線ランプの中央真下に配置する。
- 3 コリメートチューブの上部を遮光し、紫外線ランプを点灯する。
- 4 1 分後に遮光を解除し、その時点をスタートとする。
- 5 所定の照射時間後、ランプを消灯する。
- 6 新しい被検液を入れたシャーレを用意し、照射時間を変え上記を繰り返す

6. 通水試験方法

1) 試験装置の概要

通水試験装置の概要図を図 2 に示した。供試微生物槽、通水ポンプ、流量計、紫外線照射槽から構成されている。また、バルブの切り換えにより系内の配管等を消毒できるよう、循環ラインが設けられている。

試験装置は 65 W 低圧水銀ランプを用いた照射装置

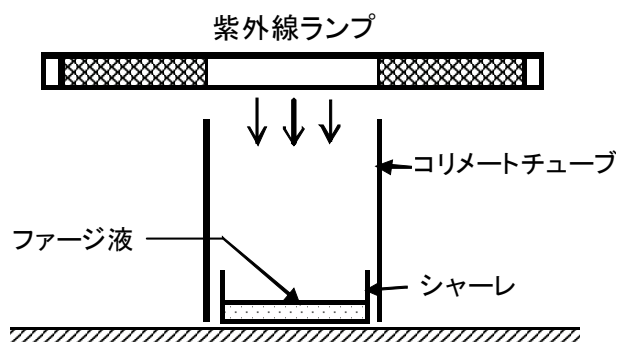


図 1 感受性試験装置概要図

で、照射槽は直径が 16 cm の円筒状で、ランプも含めた内部容積は約 31 L である。

2) 通水手順と試料採取

通水試験の手順を下記に示した。

- ① 供試水は紫外線透過率 95% 以上の水道水を用い、供試微生物槽に貯める。
- ② 供試微生物槽に遊離残留塩素濃度が少なくとも 1 mg/L 以上となるよう次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加し、循環ラインを用いて配管内等を殺菌する。
- ③ サンプリングバルブの口部分を 75% エタノールでよく拭き、その後開いて塩素を含んだ循環水を吐出させ殺菌する。
- ④ ポンプを停止し、供試微生物槽にチオ硫酸ナトリウム剤を添加して塩素を中和する。
- ⑤ 塩素中和後の供試水を再度循環、サンプリングバルブから採水して残留塩素が検出されないことを確認する。
- ⑥ 供試微生物槽にファージ液を添加し、濃度を均一化させるため槽内を循環攪拌する。
- ⑦ 供試液の紫外線透過率が 95% であることを確認する。
- ⑧ 通水ポンプを稼働し、通水量を少なくとも 3 条件変化させて試験を行い、各々 3 検体の採水を行う。

結果および考察

1. 感受性試験

試験の安定性、再現性を評価するため、感受性試験を 4 回実施した。内径 60 mm のシャーレに供試液を 5 mL 添加したときの液層厚は 1.8 mm であり、紫外線の透過率の影響を考慮せず試験を行った。

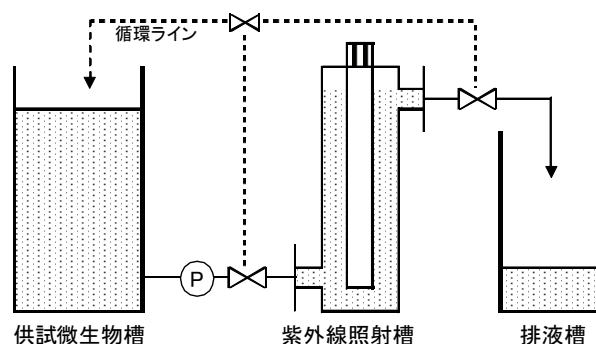


図 2 通水試験装置概要図

一例として初回試験時の照射時間とファージ数の結果を表1に示した。紫外線ランプから液面までの距離は87 mmで、液面での紫外線強度は1.35 mJ/cm²であった。照射時間は10・20・30・40秒とした。供試液は増殖操作後の大腸菌ファージ液をリン酸塩希釈液で1000倍希釈したものであり、初期濃度は1.9×10⁸ PFU/mLであった。なお、増殖後の濃度は毎回10¹¹ PFU/mLのオーダーであり、安定した培養が可能であった。

初期濃度(N₀)に対する各照射時間後の濃度(N)の比(N/N₀)と、紫外線照射量(=液面強度×照射秒数)の関係を図3に示した。不活化曲線の傾きは-0.188であり、寄与率は0.993であった。この回帰式から求めた初期濃度の1/10まで不活化するのに必要な紫外線照射量は12.2 mJ/cm²であった。また、不活化速度定数を下記の式から求めると5.32であった。

不活化曲線

$$y = e^{-0.188x} \quad \text{--- ①}$$

y = 紫外線照射後の生残率

x = 紫外線照射量

不活化速度定数の算出

$$S = \exp(-D/D_0) \quad \text{--- ②}$$

S = 紫外線照射後の生残率

D = 紫外線照射量

D₀ = 不活化速度定数

① 式より

$$y = S, D = x$$

よって

$$(-D/D_0) = -0.188 \times D$$

不活化速度定数 D₀ = 5.32

表1 照射時間別ファージ数

| 照射時間 | 0秒 | 10秒 | 20秒 | 30秒 | 40秒 |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| × 10 ² | — | — | — | — | 116 |
| × 10 ³ | — | — | — | 70 | 13 |
| × 10 ⁴ | — | — | 88 | 8 | — |
| × 10 ⁵ | — | 105 | 11 | — | — |
| × 10 ⁶ | 188 | 13 | — | — | — |
| × 10 ⁷ | 22 | — | — | — | — |
| PFU/mL | 1.9 × 10 ⁸ | 1.1 × 10 ⁷ | 8.8 × 10 ⁵ | 7.0 × 10 ⁴ | 1.2 × 10 ⁴ |
| 生残率 | 1 | 5.8.E-02 | 4.6.E-03 | 4.0.E-04 | 1.0.E-04 |

その他の3回の試験結果と併せて紫外線ランプから液面までの距離、液面での紫外線強度、傾き、寄与率、不活化速度定数を表2に示した。

寄与率は極めて高く、直線性(安定性)に優れていた。また、不活化定数も5.32~5.71の範囲にあり、再現性に優れていた。文献に示されている不活化速度定数は5.90⁵⁾、5.31⁶⁾であり、今回の実験結果とほぼ同じ値であった。また、大腸菌ファージQβの初期濃度を1/10にするのに必要な照射量は12.2~13.1 mJ/cm²であった。

2. 通水試験

河川水や地下水などの消毒対象水が、紫外線照射装置によって実際にどの程度の紫外線量を受けたか評価する方法として、供試微生物槽にファージを添加し、紫外線照射装置を通過後の生残率から求める実験を行った。

実験は65 W 低圧紫外線ランプを内蔵した装置であり、3 m³の供試微生物槽に感受性試験に供したのと同じ増殖後のファージ液を100 mL添加し、通水量を日量換算で300 m³、400 m³、500 m³と変えて測定した。各通水量での照射装置内の滞留時間(照射時間)は約9秒、7秒、5秒であった。

試料の採取は各通水量試験毎に時間をあけて3回採取し、試料は各希釈段階で2枚のシャーレを用いて測定した。この測定条件で求めた微生物槽内の濃度と各

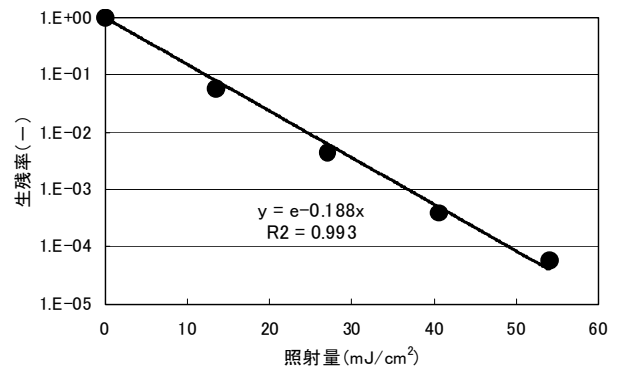


図3 紫外線照射量と不活化率の関係

表2 感受性試験結果

| No. | 距離 (mm) | 液面強度 (mW/cm ²) | 傾き | 寄与率 | 不活化速度定数 |
|-----|---------|----------------------------|--------|-------|---------|
| 1 | 87 | 1.35 | -0.188 | 0.993 | 5.32 |
| 2 | 87 | 1.37 | -0.178 | 0.999 | 5.62 |
| 3 | 87 | 1.39 | -0.175 | 0.998 | 5.71 |
| 4 | 93 | 1.28 | -0.178 | 0.987 | 5.62 |

まとめ

通水量での平均濃度、生残率を表3に、生残率と通水量の関係を図4に示した。通水量を変化させた場合の生残率（対数表示）は直線性があり、寄与率も1.00であった。

この図の回帰式より仮に日量 450 m³ で通水処理した場合、生残率(y)は

$$Y = 2E-06e^{0.0129 \times 450}$$

で計算され、0.00066 になる。そして前記式②より、不活化定数が D₀ の指標微生物を紫外線照射槽に通水し、その時の生残率が S であった時の換算紫外線量(U)は下記式で示されることから、

$$S = \exp(-U/D_0)$$

$$U = -D_0 \ln(S)$$

よって $U = -5.41 \times \ln(0.00066) = 39.6 \text{ mJ/cm}^2$ と計算された。

耐塩索性病原微生物対策として位置づけられた紫外線処理における紫外線照射装置が備える要件として、「紫外線照射槽を通過する水量の95%以上に対して、常時 10 mJ/cm² 以上の照射量を確保できること」とあるが、本装置に日量 450 m³（照射時間 約 6 秒）を通水しても、これを十分満足する照射量を得られることが判断できる。

表3 通水量別ファージ数

| | 微生物槽 | 300m ³ | 400m ³ | 500m ³ |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| × 10 | — | 42 | 154 | |
| × 10 ² | — | 4 | 15 | 55 |
| × 10 ³ | — | — | — | 5 |
| × 10 ⁴ | — | — | — | — |
| × 10 ⁵ | 51 | — | — | — |
| × 10 ⁶ | 4 | — | — | — |
| PFU/mL | 4.9 × 10 ⁶ | 4.2 × 10 ² | 1.5 × 10 ³ | 5.5 × 10 ³ |
| 生残率 | 1 | 8.6E-05 | 3.1E-04 | 1.1E-03 |

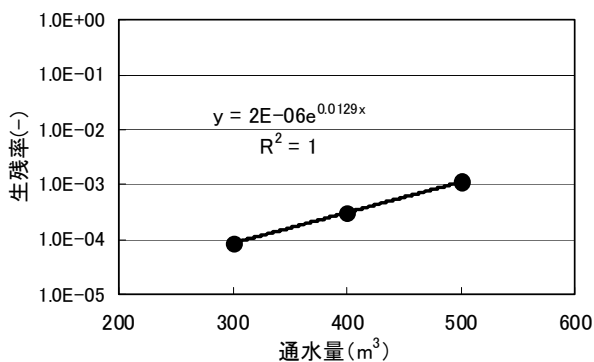


図4 通水量別生残率

筆者は既報⁷⁻⁹⁾において、各種排水処理水に対する紫外線殺菌についてメスシリンダーを用いて検討を行ったが、この際の紫外線照射量はランプ表面から最も離れたメスシリンダー壁面に相当する距離での紫外線強度と試料の紫外線透過率、照射時間で計算しており、完全混合状態の中で実際にどれだけの照射量を受けたかは測定できていない。

今回「水道施設の技術的基準を定める省令の一部を改正する省令」により、紫外線照射処理が耐塩索性病原微生物の不活化に有効であることが示され、正確な照射量を求めるための試験方法⁴⁾が提案された。

それに基づき安全性が高く、高濃度培養が可能な大腸菌ファージ Qβ を指標微生物として用い、その紫外線感受性と紫外線照射装置に通水した時の不活化率から、受けた照射量を求めることを試みた。

4 回実施した感受性試験では、片対数グラフで示した不活化曲線の傾きは-0.18~-0.19 の範囲であり、寄与率も 0.99 以上と安定性、再現性に優れていた。そして、これから求めた不活可速度定数は 5.29~4.71 であった。

次に照射槽でどれだけの紫外線量を受けたかを測定するため、感受性試験に供したのと同じ日に増殖操作を行った大腸菌ファージ Qβ を供試微生物槽に添加し、通水量（速度）を変えながら不活化率の測定を行ったところ、通水量と生残率には高い直線性があった。

これらのことから、紫外線を用いた室内での照射実験から大規模な装置に至るまで、大腸菌ファージを生物線量計として用い、正確な照射量を求めることができることを確認した。

排水処理分野では、放流先でアユや海苔の養殖が行われているなどの特殊な場合のみ紫外線による消毒が使われている。今回、浄水処理への導入が認められたことから、排水処理の分野においてもろ過後のような懸濁物質が少ない水への適用が期待される。

文献

- 1) 竹田 茂, 稲田貴嗣, 伏脇裕一, 森 康明: 塩素、オゾン、紫外線消毒した生活排水の変異原性試験に

- よる安全性の評価, 水環境学会誌, **29**, 45-48 (2006)
- 2) 平田 強 : 塩素消毒の補完技術としての紫外線消毒 - 水道におけるクリプトスピリジウム対策として, 水環境学会誌, **28**, 238-241 (2005)
- 3) 森田重光, 平田 強 : 紫外線の原虫不活化効果, 日本水環境学会シンポジウム講演集, 63-64 (2003)
- 4) (財) 水道技術センター : 紫外線照射装置 JWRC 技術審査基準 (低圧紫外線ランプ編), 平成 20 年 1 月 10 日
- 5) Kamiko, N. and Ohgaki, S. : RNA coliphage Q β as a bioindicator of the ultraviolet disinfection efficiency, Water Sci. Tech., **21**, 227-231 (1989)
- 6) United States Environmental Protection Agency : Ultraviolet disinfection guidance manual for the final long term 2 enhanced surface water treatment rule, (2006)
- 7) 中野 仁, 伊藤忠男, 丸山敏雄 : 排水処理における紫外線殺菌の実用化研究 (その 1) 水質と照射線量について, 第 30 回日本水環境学会 (1996)
- 8) 中野 仁, 伊藤忠男, 丸山敏雄 : 排水処理における紫外線殺菌の実用化研究 (その 2) 実設備での紫外線殺菌効果実証実験報告, 第 30 回日本水環境学会 (1996)
- 9) 中野 仁 : 紫外線殺菌に及ぼす水質と照射線量の関係, 大阪府立公衛研所報, **36**, 199-206 (1998)