

生物線量計の原理とその応用

～微生物で光を測る～

Principle and Application of Bio-actinometry

～ measurement of photo energy by microorganism ~

大瀧 雅寛

Masahiro OTAKI

1. はじめに

水環境における病原微生物の制御は大きな課題である。そもそも1980年代までは病原微生物の制御、即ち消毒といえば、塩素注入処理で決まりであった。ところが1970年代後半から、塩素消毒の際に擬発ガン性の副生成物が生じてしまうという問題が論じられ、塩素消毒の見直しが盛んに検討されてきている。塩素の代替消毒手法としては、オゾン、二酸化塩素、UV（紫外線）などが挙げられているが、その中でUVは副生成物の心配が少なく、維持管理も簡単という長所から注目されており、消毒効果についても様々な研究がされてきている。また近年、様々な紫外線照射ランプが開発され、その特性及び適用域などが盛んに研究されてきている¹⁾。

それらの研究においては投入する紫外線エネルギー量は最も基本的なデータとして取り扱われる。これは紫外線線量と呼ばれ、単位面積あたりに投入されるエネルギー量として $[W \cdot s/cm^2]$ や $[J/m^2]$ で表される。また単位時間当たりの線量は線量率といい、 $[W/cm^2]$ や $[J/s/m^2]$ で表される。通常、消毒効果のある殺菌線の線量率測定はUV線量計（UV照射メーターともいう）を用いて行われてきた。しかしこの線量計は254nm付近の波長のみを測定するものであるため問題が生じる。

図1を参照してもらいたい。ここには種々のランプの照射波長スペクトルが示されている。古くから使用されている、いわゆる一般の殺菌灯とは低圧UVランプである。これは上述のUV線量計が測定できる254nmの照射光しかもっていない。従ってこのランプを用いている以上、UV線量計を用ればその線量測定には十分であった。しかし近年、一本あたりの照射エネルギーが大きく、ランプの小型化が可能とな

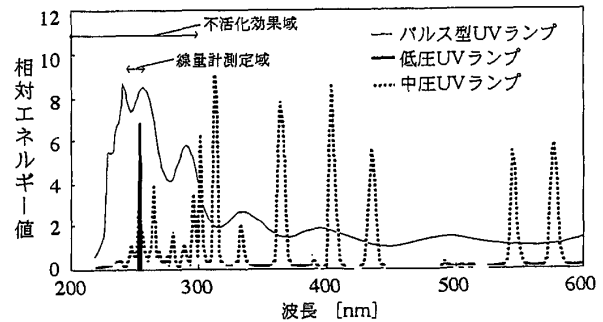


図1 パルス・低圧・中圧UVランプの照射波長スペクトル

る中圧UVランプが実用化されつつある。また数十倍のエネルギーを不連続的に照射するパルス型UVランプなどが開発され研究がなされている。図1にそれらのスペクトルを示しているが、それらは従来型の低圧UVランプとは異なり、広い照射波長スペクトルを持つことがわかるであろう。

さて微生物の不活化力^{注1)}をもつ光は波長が300 nm以下の光であることがわかっている²⁾。従って254 nm以外にも照射域をもつ中圧UVランプ及びパルス型UVランプの場合、不活化力をもつ光の線量率を測定するのに、254 nm付近しか測定できないUV線量計では不十分ということになる。ここでは特にこのような広い波長域をもつランプの、不活化力を持つ光の総エネルギー量、すなわち不活化効果線量率を測定する新しい手法について解説する。

2. 生物線量計の原理

生物線量計とは個々のランプの線量率の測定に微生物を用いる手法である。簡単に言えば「どれだけ紫外線を当てれば死ぬかがわかっている微生物を用いて、どれだけ死んだかを測れば、どれだけ紫外線が当たったかを逆算できる」ということである。

注1)不活化力： 紫外線による消毒作用は微生物の遺伝子損傷による増殖能力の抑制にあり、殺しているのではない。そのため不活化という言葉が使われる。

紫外線による微生物の不活化モデルについては様々提唱されているが、最も支持されているのが標的論による説明²⁾であろう。これは微生物が紫外線の光の粒(光量子)を浴びたとき、微生物内の標的(DNA及びRNAがこれにあたる)にヒットする確率から生残率(次式(1)の N/N_0)を推定するものである。微生物によってはその標的に一回あたれば、不活化するものもあれば、複数回あたってやっと不活化するものもある。複数回あたって不活化する場合はマルチヒットモデルとして次式によって表されている。

$$N/N_0 = 1 - (1 - e^{-k \cdot I \cdot t})^n \quad (1)$$

N : 照射後微生物数、 N_0 : 照射前微生物数
 k : 不活化速度定数、 I : 紫外線線量率
 t : 照射時間、 n : 致死ヒット数

上式中の n とは換言すれば不活化するのに要するヒット数のことである。図2は $k \cdot I$ を仮に $0.1 [1/sec]$ とした場合の不活化の様子を示したものである。

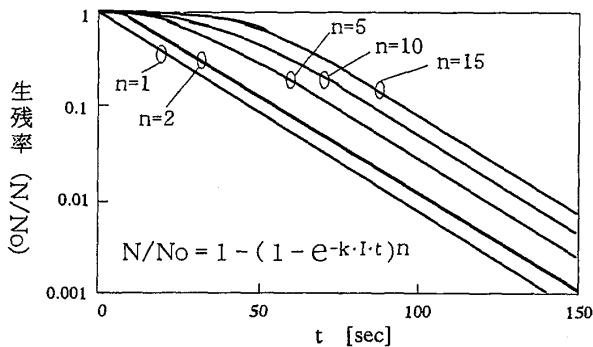


図2 マルチヒットモデルの挙動
 $(k \cdot I = 0.1 [1/sec])$ として計算した)

n が大きくなるに従って照射時間初期の不活化の遅れを持つ曲線(これを肩のある曲線と読む)の、肩の部分が大きくなるという特徴をもつ。その遅れ

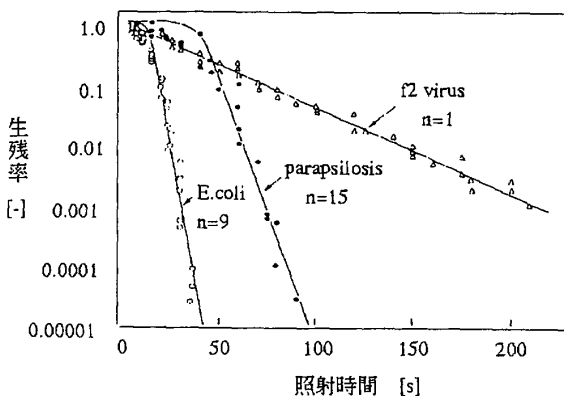


図3 各微生物の不活化曲線³⁾

の後、全て傾きが $k \cdot I$ の平行な直線となっている。

実際に種々の微生物を用いた実験結果³⁾を図3に示す。微生物によって、 $k \cdot I$ の値が異なるので、直線部分の傾きは異なるが、下図に示されるように細菌類の不活化については、 n が複数であり、肩のある曲線になるものが多い。

一方ウイルスの場合、 n が1のものがほとんどである。従って(1)式は(2)式となるので、一次反動的に不活化されることになる。

$$N/N_0 = e^{-k \cdot I \cdot t} \quad (2)$$

生残率の対数と照射時間をプロットすると、直線関係が得られることになる。その傾きは $k \cdot I$ を表すことになる。従って k 値が既知のウイルスであれば、 I が得られる。 k 値は低圧UVランプ即ち254nmの光のみを用いた実験より得られた値を通常用いる。従って I 値は不活化に効果のある波長域の光を、全て254nmの不活化エネルギーに換算して求めていることになる。例えば、265nmの光は不活化力が254nmの光に比べて1.2倍あるので、同じエネルギーを照射した場合でも、この手法では1.2倍のエネルギー量の不活化効果線量率として算定されることになる。

当研究室においては、ウイルスとして大腸菌ファージQ β 注2)を良く用いる。このウイルスは一次反動的に不活化され、不活化定数 k が $0.17 [cm^2/mW]$ であることがわかっている。これまでの実験結果から再現性が非常に高いことがわかっている。

さて紫外線による不活化機構はDNA及びRNAに直接作用して遺伝子損傷を起こすことにより発現する。これはウイルスであろうと細菌であろうと、多細胞生物であろうと変わらない。従って本手法で測定した不活化効果線量率とは、上述のように254nmの持つウイルス不活化エネルギー量に換算した量であるが、ウイルスとはその構造が大きく異なる細菌にも不活化効果線量率として扱うことができる。

図4は波長スペクトルの異なる低圧UVランプと中圧UVランプにおいて、大腸菌群の不活化実験結果を示したものである。ここでは横軸を254nm付近のみ

注2)大腸菌ファージ: ウイルスの中でも、細菌細胞にとりつくものをファージと呼ぶ。よってこれは大腸菌にとりつくウイルスという意味である。

を測定するUVメーターに基づいてではなく、ウイルスを用いて測定した不活化効果線量率でそろえているのだが、大変良く一致している。即ち波長域がことなるランプによる細菌等のウイルス以外の不活化評価に、ウイルスの不活化を基にした線量率を用いて行うことができることを示している

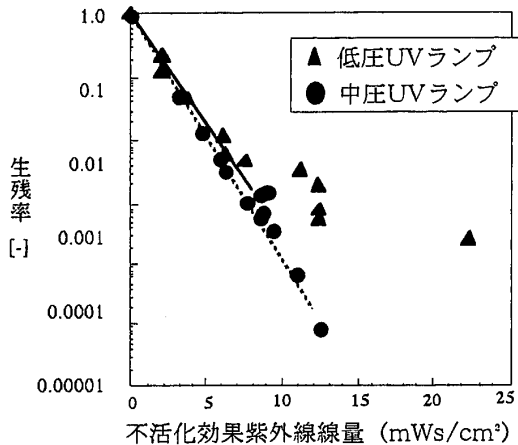


図4 中圧及び低圧UVランプによる大腸菌群の不活化率⁹⁾

3. 生物線量計の応用

上述した生物線量計には次のような特色がある。

- 1) 様々な波長域をもつ種々のUVランプの消毒効果を不活化効果線量率で統一的に評価することができる。
- 2) 従来のUV線量計ではセンサーの位置における線量率の測定しかできないが、生物線量計では反応容器全体に投入されるエネルギー量を測定することができる。
- 3) 通常の可視光では変化しないので、測定時に暗室で行う必要がない。

この生物線量計の基本的な原理は、化学物質の光分解率から線量率を求める化学的光量計と同じであるが、上述の特色1)と2)で述べたように、不活化効果を測定するという点、および可視光では濃度が変化しないため、遮光して実験を行う（暗室で実験を行う）必要がなく汎用性が高いという長所を持つ点で異なっている。

特色の2)については、これを活かした応用が行われている。例えば反応装置の形状が複雑で、ランプ

からの照射出力がわかっているものの、反応装置全体の不活化効率については算定が難しいような場合が実際には良くある。そのような場合でも生物線量計を用いて測定すればよい。即ち特殊なモデル、数値計算を用いることなく、装置全体の不活化効果線量率を得ることができる。これは例えて言えば、車の平均燃費を計算するのに、エンジンの回転数変化と燃焼室の容量から細かく合計して燃費を計算するよりも、走行距離と消費ガソリン量から計算した方が、手っ取り早いのに似ている。

4. 生物線量計の限界

以上、生物線量計の原理は簡単であり、その操作性の汎用さから、適用範囲が広いのだが、この方法にも問題点がいくつか存在する。

a) 微生物の不活化機構に関する問題点

細菌類には多くの場合、紫外線による遺伝子損傷を修復する機構が備わっている⁹⁾。特に300nm以上の光エネルギーを利用する光回復という機構がある。ウイルスはこの光回復という機構を持たないため、ウイルスを用いた生物線量計の場合、この300nm以上の光エネルギーの関与を考慮していないことになる。すなわち300nm以上の波長光を持つ中圧UVランプやパルス型UVランプの場合、不活化と同時に光回復も起こっている可能性がある。従ってウイルスでの不活化効果線量率を細菌に適用した場合、同時に起こる光回復量が無視できないものであれば、不活化効果線量率は過大評価となってしまう。今のところ、図4に示したように、大腸菌群では中圧UVランプにおいて不活化効果線量率が過大評価にはなっていないことが確認されているが、パルス型UVランプのような300nmのエネルギーも大量に照射される場合では、光回復能の有無が影響するのではないかとの実験結果も得られており、その適用限界について検討されるべき課題も多い。

b) 吸光度の影響

装置全体の不活化効果線量率測定においては、処理対象水の吸光度の影響をどう評価すればよいかと

いう問題がある。浄水処理に適用する場合は消毒処理の前に、水中の不純物はかなりの割合で取り除かれているので影響は少ないと考えられる。ただし下水処理など吸光度がかなり高い水に関しては、影響を考慮する必要がある。

一般に水中の光反応は、その水の吸光度に依存する。すなわち光の吸光が大きい場合は、光強度がランプから離れるに従って減衰し、反応速度が低くなる。一般に光の減衰は次式のLambert-Beer則に従うことがわかっている。

$$I = I_0 \cdot 10^{-Ad} \quad (3)$$

I: 減衰後の線量率、 I_0 : 入射光の線量率
A: 吸光度、d: 光路長

この関係を用いて装置全体の光の減衰を算定すれば良いのだが、複雑な形状の装置や装置内の流動条件なども考えると単純には計算できない。今のところ現実的な方法としては、モデル吸光物質としてフミン質や人工濁質を添加することにより、対象水の吸光度を現状に合わせて調整した上で、生物線量計を用いて測定することが考えられる。

c) 測定線量率範囲

生物線量計で測定できる線量率の範囲は、用いる微生物の濃度に依存する。式(2)に示されるように、線量計として用いるウイルスは一次反応的に不活化するが、不活化率が測定できる範囲は、ウイルスの初期濃度によって決まる。つまり1/初期濃度より低い生残率は測定できない。例えば、照射するランプの線量率が強すぎて、用意できる微生物試料の濃度では数秒で全部死滅してしまうような場合は、そのままでは測定できないことになってしまう。

対応策として、照射光と試料の間に透過面積を調整した透過板を設置し、任意の割合で照射光を調節して測定する方法が考えられる。透過する面積(板に空ける穴の面積)を全体の1/10、1/4、1/2とした透過版を用意し、生物線量計を用いて測定した線量率が、設定した割合で減少しているかを実験で確認した。

図5はその結果である。非常に良い相関が得られており、光の透過面積を設定した透過板を用いれ

ば、非常に大きな線量率をもつランプにおいても生物線量計を用いて測定できることが確認された。

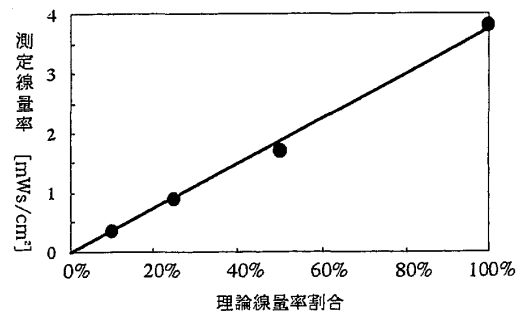


図5 設定照射率割合と測定線量率の相関

実際の大出力ランプを用いた複雑な形状をもつ反応装置内の平均不活化効果線量率を測定することが可能であることが示唆され、その応用範囲は大きいものであると期待される。

4. おわりに

今回、解説した生物線量計は様々な特色をもつ応用範囲の広い技術である。当研究室では、この手法を用いて、様々なランプの照射強度を不活化効果線量率という、一つの評価軸で比較しようと試みている。しかしここで紹介したように、光回復を持つ細菌に適用できるかどうかなど、未だに未解決部分も存在していることも確かである。今後さらに研究を続けて、この手法の適用限界を明確にしていかなければならないと考えている。

5. 参考文献

- 1) 大垣眞一郎：紫外線照射による消毒技術の基礎概念、造水技術、Vol.15, No.1, pp.33-39, 1989.
- 2) 近藤宗平：分子放射線生物学、学会出版センター, 1984.
- 3) B.F. Severin, M.T. Suidan and R.S. Engelbrecht, Kinetic modeling of UV disinfection of water" Wat. Res., vol.17, No.11, pp.1669-1678, 1983.
- 4) 大瀧雅寛、鹿島田浩二、石渡淳、赤井田悟史、大垣眞一郎、「紫外線照射処理および紫外線-光触媒処理における細菌の光回復」、環境工学研究論文集 Vol. 34, pp.75-82, 1997
- 5) Dulbecco, R., "Photoreactivation", Radiation Biology, Vol.2, pp.455-486, McGraw Hill Book Co. Inc., New York, 1955.