

日本防菌防黴学会 第50回年次大会

シンポジウム6: 光殺菌法の標準化の必要性

2023年 8月 30日 (水) @ 千里ライフサイエンスセンター

紫外線の特性を考慮した 微生物に吸収される線量評価の必要

○准教授 秋吉 優史

大阪公立大学 工学研究科 量子放射線系専攻、
放射線研究センター、
大阪国際感染症研究センター兼任

Special thanks: 古田雅一、角野友美、神野八恵美、橘田早苗

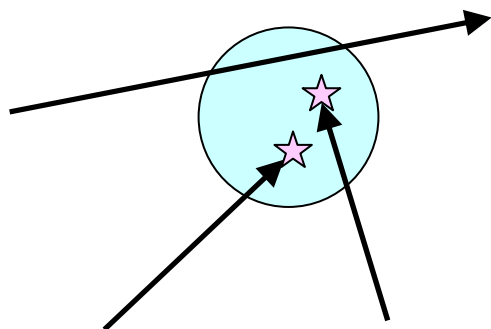
E-Mail: akiyoshi-masafumi@omu.ac.jp

<http://anticovid19.starfree.jp/>



吸収線量とは

$$\text{吸収線量 (Gy)} = \frac{\text{吸収された放射線のエネルギー (J)}}{\text{対象とする系の質量 (kg)}}$$

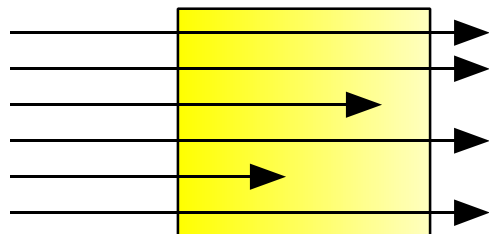


ある体系に於いて**吸収**した放射線の電離エネルギーをその体系の質量で割った量が吸収線量(J/kg)。不均一な照射の場合体系の取り方(分母の大きさ)によって値が異なってくる。

吸収線量(Gy)は電離放射線に対して定義された量で、紫外線については相当する量が定義されていないため、**質量吸収光量(J/kg)**と言う用語を**暫定的に提案**する。

強透過性放射線

$$H_p(0.07) \leq 10 H_p(10)$$

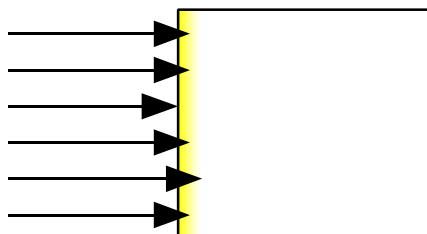


整列拡張場

ほとんど素通りでほぼ均一にエネルギーを与え、表面から1cmの微小体積に対する吸収線量(1cm線量当量)が人体全体の実効線量を代表すると見なす。

弱透過性放射線

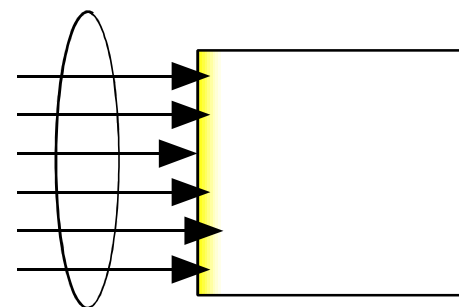
$$H_p(0.07) > 10 H_p(10)$$



整列拡張場

表面近傍にのみ局所的にエネルギーを与え、深さ70μmでの点での吸収線量(70μm線量当量)が皮膚の等価線量を代表する。

紫外線



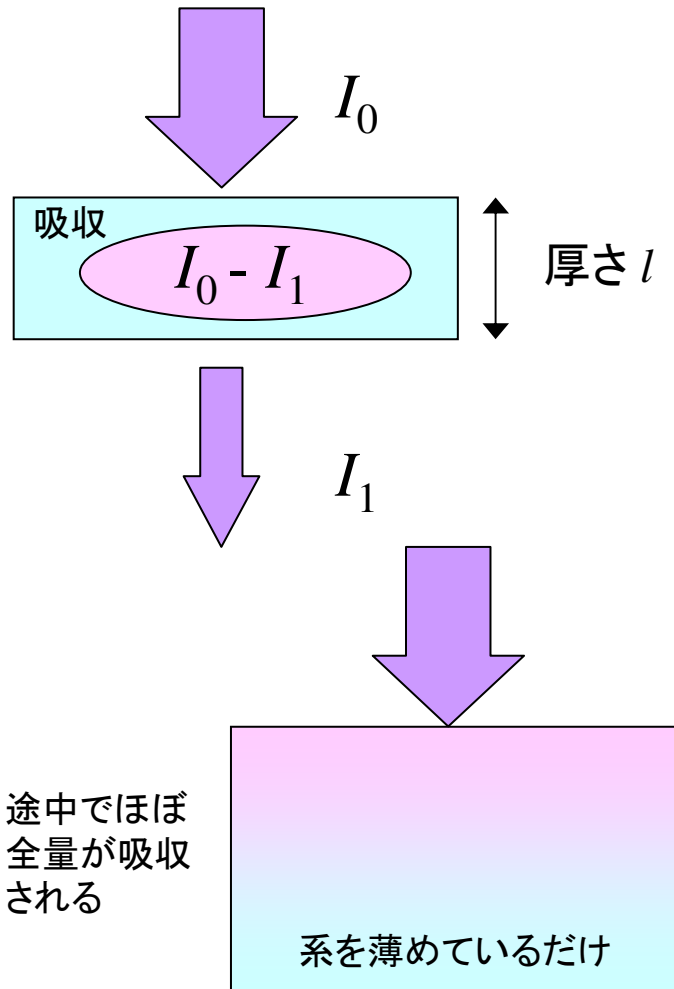
人体の皮膚では数10μmの範囲で吸収されてしまう。これまで微小体積へのエネルギー付与の評価は行われておらず、単位面積あたりのエネルギーフラックス(J/m²)で評価。

吸光度から求める質量吸収光量(1)

吸収された紫外線のエネルギー (J)

質量吸収光量 (J/kg) =

対象とする系の質量 (kg)



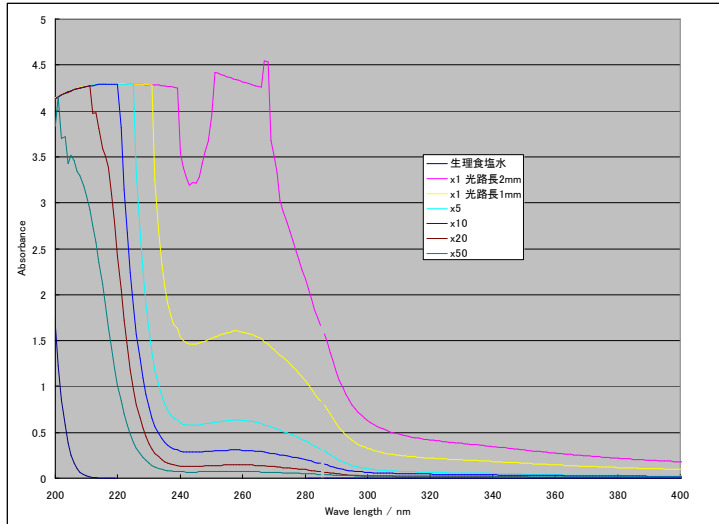
ランベルト・ベールの法則

吸光度 $A = -\log_{10}(I_1 / I_0) = \epsilon c l$
(ϵ : 吸光係数、 c : 媒質濃度、 l : 光路長)

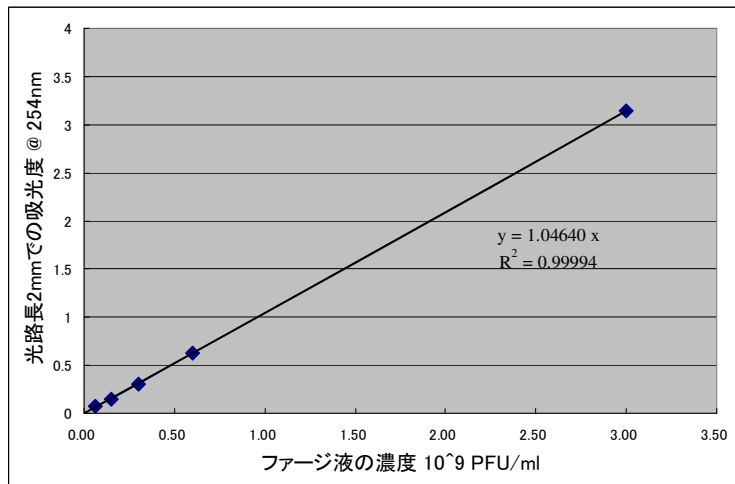
から、系に吸収されるエネルギー $I_0 - I_1$ は $I_0 (1 - 10^{-\epsilon c l})$ と表わすことが出来、吸光度が1だと90%、2だと99%吸収されたことになる。系が厚いほど、媒質濃度が高いほど、吸収されるエネルギー自体は大きくなる。

しかしながら、あまりに厚かったり、媒質濃度が高くなると、途中でほぼ紫外線の全量が吸収されそれ以上吸収されるエネルギーは増えず、媒質の量が増えるに従い媒質の単位質量あたりに吸収されるエネルギーは小さくなる。

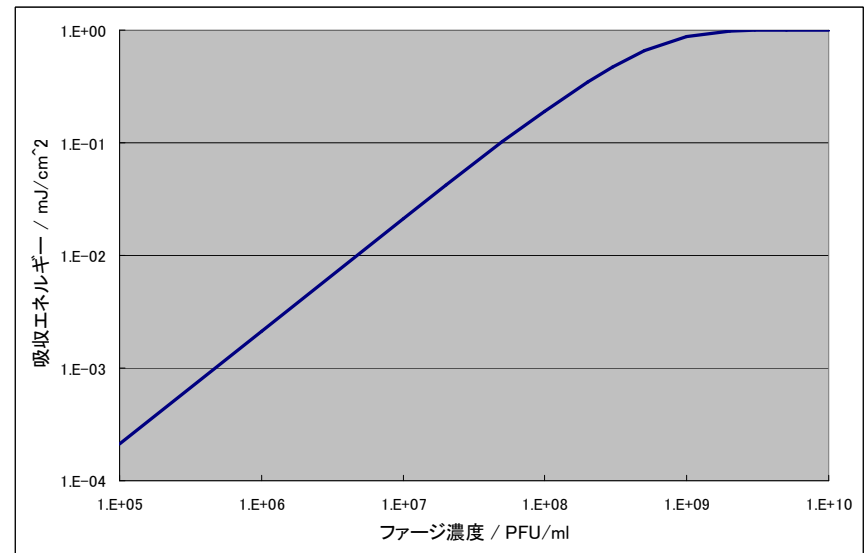
吸光度から求める質量吸収光量(2)



バクテリオファージQ β のファージストック(原液、 3.0×10^9 PFU/ml)を5, 10, 20, 50倍に希釈していき、初期濃度の異なるファージ液を調整した。これを光路長1mm(原液)もしくは2mmの石英セルに入れて紫外可視分光光度計(アズワン ASUV-6300PC, ダブルビーム、石英セル使用)により吸光度スペクトルを測定した。低圧水銀ランプからの紫外線の波長である254nmにおける吸光度をファージ濃度で整理し、ファージ濃度(PFU/ml)あたりの吸光係数(ml/PFU \cdot mm)を求め、 ϕ 60mmのシャーレに5mlのファージ液を入れて1mJ/cm 2 を照射した際の**吸収エネルギー**を求めた。



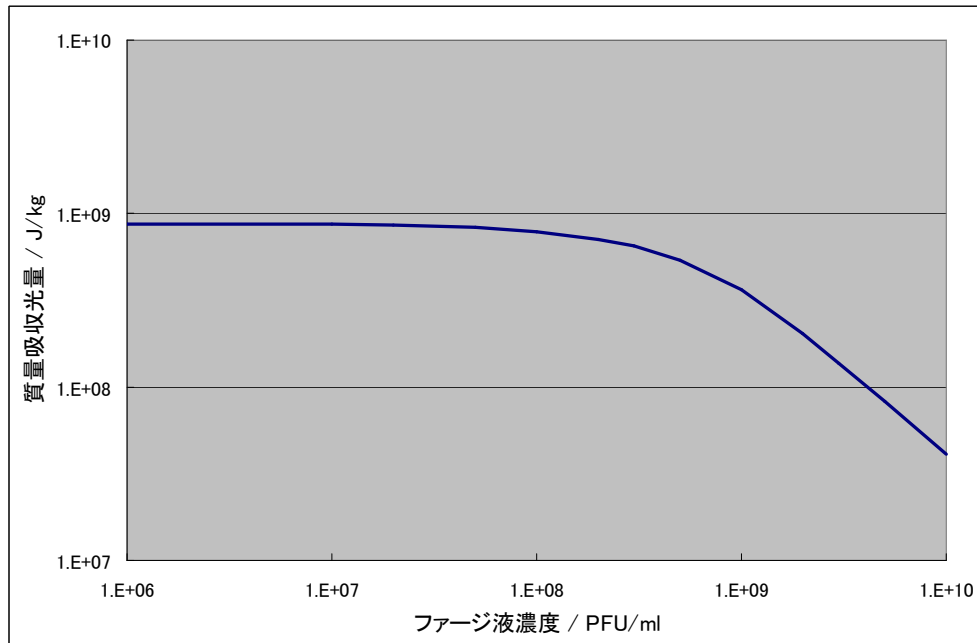
吸光係数 = 5.23×10^{-9} ml/PFU \cdot mm (@254nm)



吸光度から求める質量吸収光量(3)

質量吸収光量を求める際の分母として**ファージの質量**を求めた。バクテリオファージQ β を直径28nm、密度1.2g/cm³の球体と**簡略化**して計算すると、1つあたりの質量は 1.38×10^{-17} gとなった。**ファージ1つで1 PFUと仮定**すると、1cm²のファージ液(**厚さ1.77mm***)中に存在するファージの質量は、ファージ液の濃度 c (PFU/ml) を用いて $1.38 \times 10^{-17} \times 0.177 c$ と表わされる。これを**分母**として、前ページで求めた1cm²あたりの吸収エネルギーを割ると、**質量吸収光量 (J/kg)** が求まる。

* ϕ 60mmのシャーレに5mlのファージ液を入れて照射した



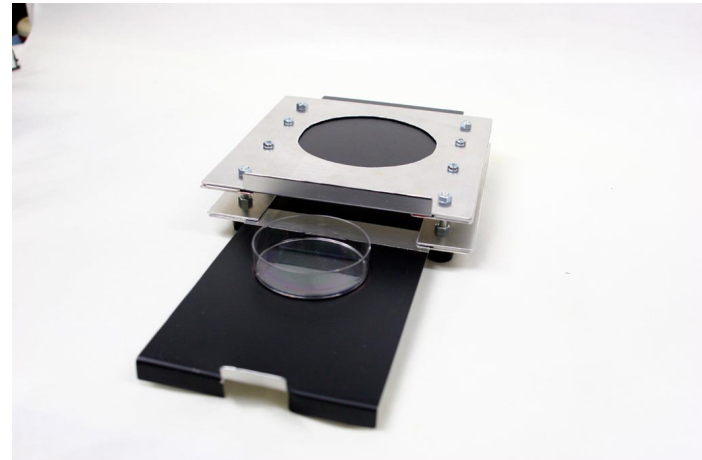
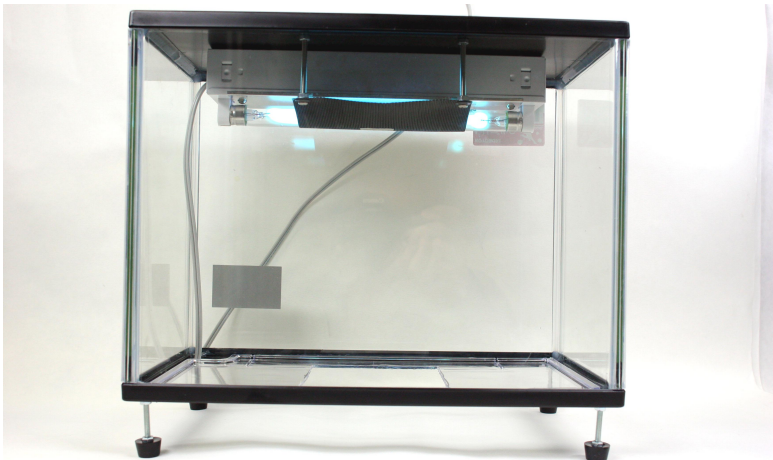
なお、ファージを分散させている生理食塩水による紫外線の吸収は無視可能であり、ここで求めた吸収線量は**系全体を平均化した場合**の値である点に注意を要する。

計算した質量吸収光量は、わずか1mJ/cm²の照射で1G J/kgにも達するという巨大な値となった。ファージ1つで1 PFUという仮定や、実際の構造から質量を求めていない点、さらに散乱による透過光強度の低下など考慮すべき点は有るが、**放射線での滅菌は数10 kGy程度の照射で十分**であるのとあまりにも大きく乖離している。

ただし、傾向として 1×10^8 PFU/mlを境に吸収線量の低下が見られるという結果が得られた。

生残曲線の初期濃度依存性(1)

実際にバクテリオファージQ β 液に紫外線照射(低圧水銀灯からの254nm)を行った際の生残曲線が、初期濃度によってどのように変化するのかを検証した。照射は ϕ 60mmのシャーレに5mlのファージ液を入れて行い、0.13mW/cm²程度に調整した照射器によって10分(78mJ/cm²程度)まで照射した。各回の照射前後で波長254nmの紫外線に対して校正されている放射照度計(ケニス YK-37UVSD)により照度測定を行い平均を求めた。途中0, 2.5, 5, 7.5, 10分で二段シャッター装置を使用して紫外線を遮光して照射を中断し、0.1mlずつサンプリングした。サンプリング後はシャーレのファージ液に対して照射を継続した。サンプリングしたファージ液は生残率に応じて10倍希釈をn回行った後に0.01mlを分取して大腸菌(NBRC13965)に加え、寒天培地に播種してプラーク数(P)を確認する事により、 $P \times 10^n / 0.01$ PFU/mlとして感染価を求めた。



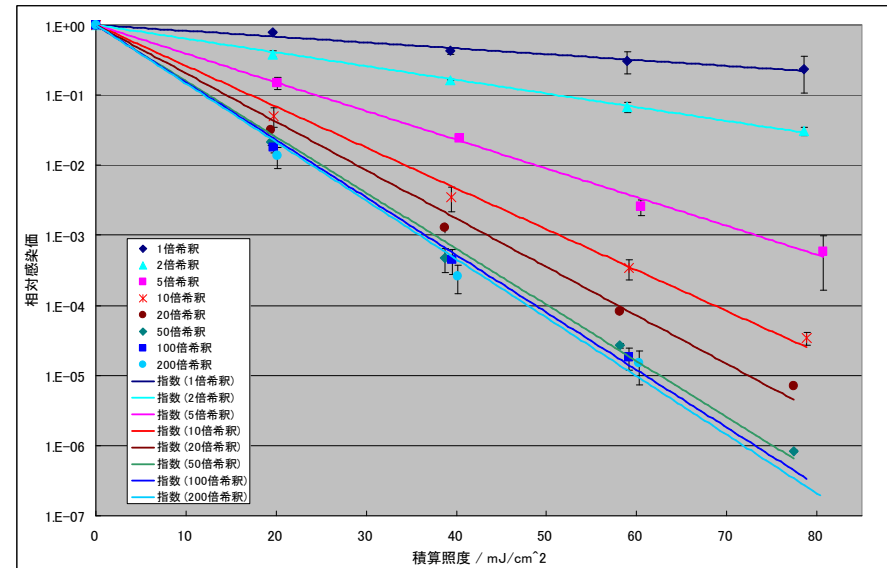
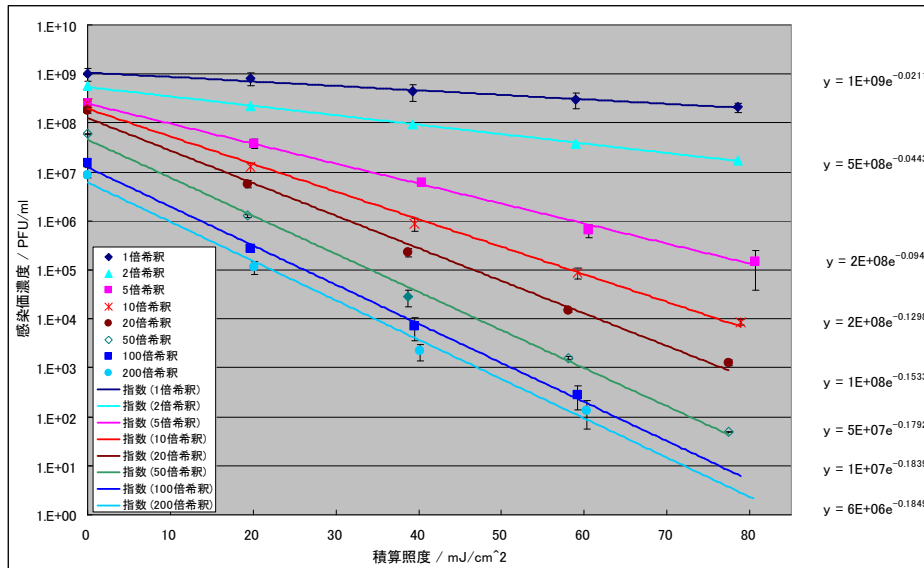
生残曲線の初期濃度依存性(2)

バクテリオファージQ β 及び大腸菌の取扱いは、JIS R1706 (光触媒材料の抗ウイルス性試験方法 - バクテリオファージQ β を用いる方法)に準拠する。

- ① ファージ専用の宿主菌である大腸菌(NBRC13965)を37°Cで20時間前培養する。
- ② 前培養した大腸菌を本培養(JIS LB 5 ml: 前培養 E.coli 5 μ L)する。
濁度を分光光度計により測定し、おおよその菌濃度を確認する。
- ③ 凍結保存されていたファージストック(NBRC 20012)を解凍する。(4°C で保存し、2週間以内に使用する)
解凍したファージストックをペプトン加生理食塩水で希釈して異なる濃度のファージ液を調整する。希釈率は1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍とした。(使用するファージストックの濃度が時期により異なるため、ファージストック及び希釈後照射前の感染価をその都度評価した)
- ④ 60 mm シャーレに希釈したファージを 5 ml 入れ、低圧水銀ランプ (NEC GL-6 + ノーベル照明器具 FT-6) からの 254nm UV-C で照射する。(放射照度: 約 0.13 mW/cm²、点灯後 30分以上経過後に波長 254 nmの紫外線に対して校正されている放射照度計 (ケニス YK-37UVSD) により照度を確認後照射を開始)
- ⑤ UV 照射 2.5分、5分、7.5分、10分経過した時点で一旦照射をシャッター装置により中断し(低圧水銀ランプは点灯したまま)、ファージ液を 0.1ml サンプルングする。
- ⑥ サンプルングしたファージ液を予備実験などで予想されるプラーク数をカウント可能な濃度まで希釈する(10倍希釈を n回行う)。希釈したファージ液 0.01ml を本培養した大腸菌液 0.1ml を 5ml マイクロチューブに入れ、37°C 15分間加温する。あらかじめ 45°C で加温しておいた NBRC トッパアガー 2ml を入れ、手で振って攪拌し、カルシウム添加 LB寒天培地に重層する。
- ⑦ 37°Cで一晩培養し、プラーク数(P) をカウントする事により、 $P \times 10^n / 0.01$ PFU/ml として感染価を求めた。

生残曲線の初期濃度依存性(3)

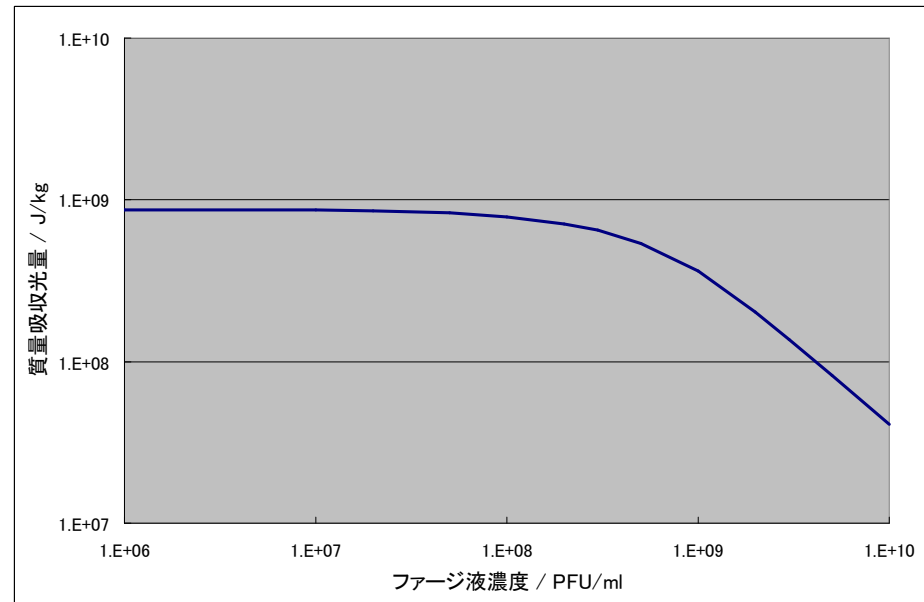
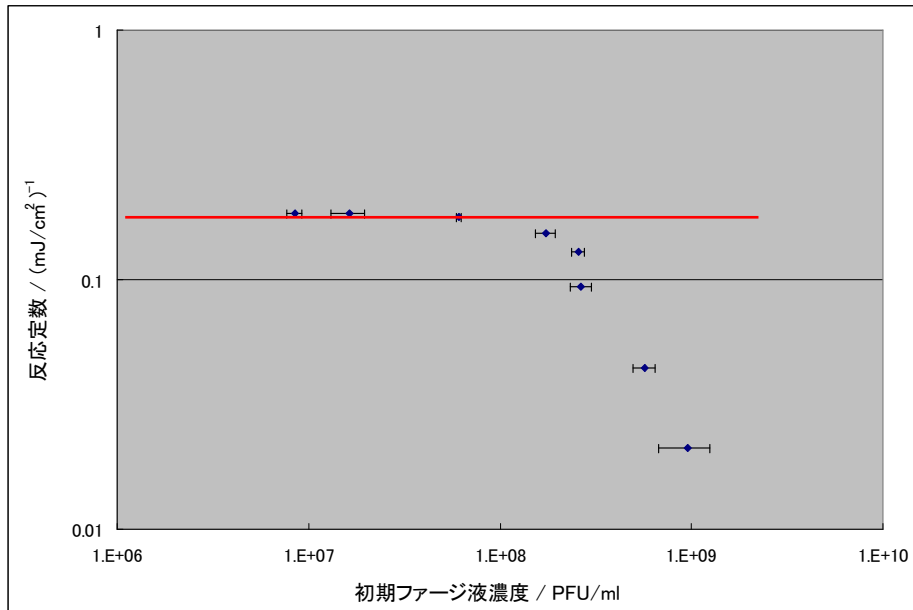
サンプリングしたファージによるプラーク数の測定は2枚のJIS LB平板培地で実施し、平均を取った。照射試験は同じ日に3回行い、平均を取っている。初期濃度は、ファージストック(原液)を m倍希釈して変化させているが、ファージストックの感染価は実験を行った日によって異なっており、m倍希釈というのは整理する上での指標に過ぎない。実際の初期感染価は照射前に実測をしている。結果は、初期感染価が高くファージ濃度が高いほど反応速度定数が小さく、不活化されにくくなった。



生残曲線の初期濃度依存性(4)

縦軸に感染価濃度を対数プロットした際の傾きである、反応定数を初期ファージ液濃度に対してプロットした。

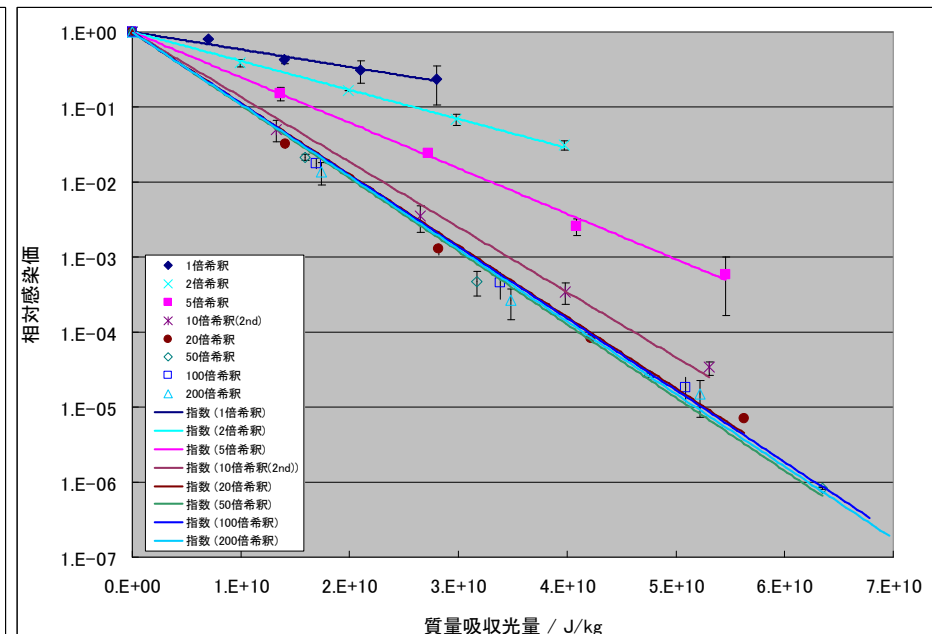
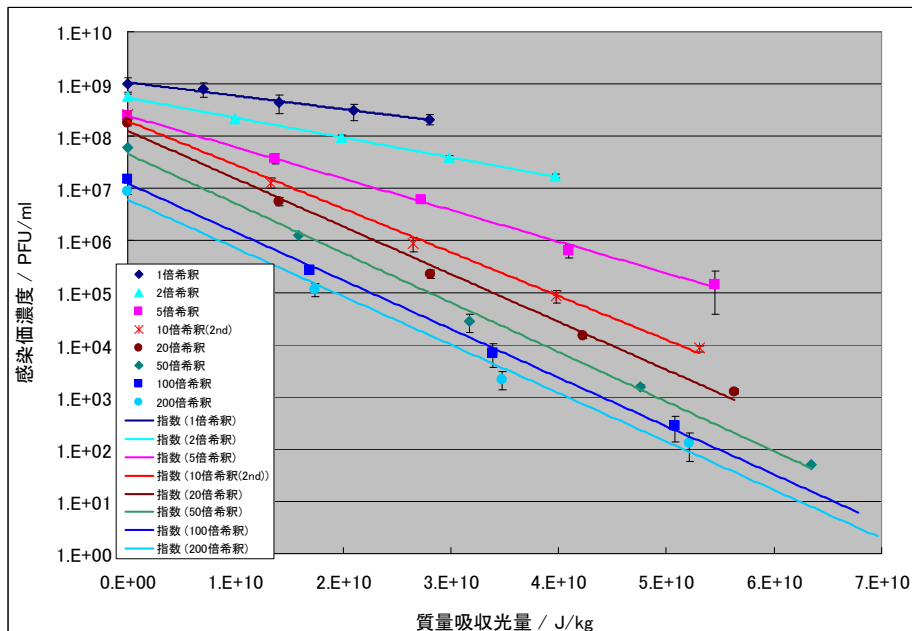
その結果、吸光度から求めた吸収線量のファージ液濃度依存性と非常に良く似た傾向を示し、 1×10^8 PFU/ml 程度を境に、ファージ液が濃くなると不活化されにくくなることが明らかとなった。



質量吸収光量を用いた生残曲線の整理(1)

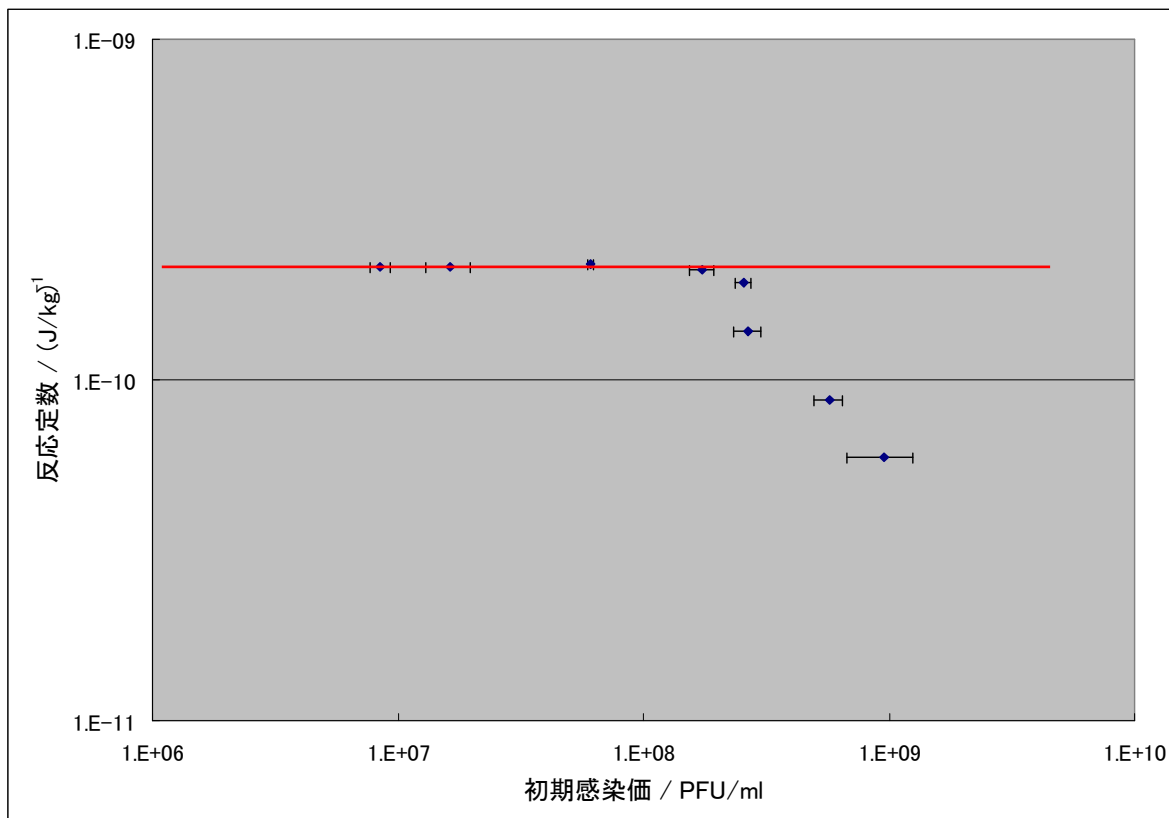
生残曲線の横軸をエネルギーフルエンスである積算照度ではなく、ファージが吸収したエネルギーとして質量吸収光量を用いて整理した。

1×10^8 PFU/ml よりも低濃度の領域では規格化した生残曲線が**ほぼ完全に一致**しており、質量吸収光量で整理することでより信頼性の高いデータを取得できているが、高濃度域では依然として初期濃度により生残曲線の傾きが変化している。



質量吸収光量を用いた生残曲線の整理(2)

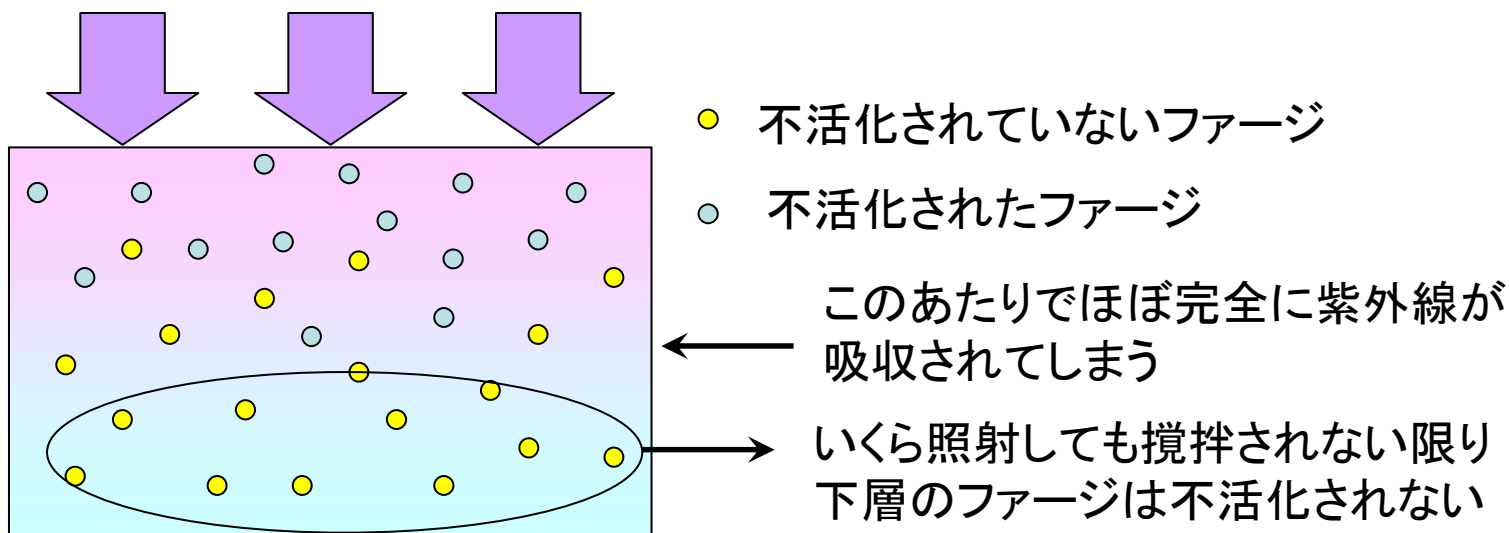
生残曲線の横軸を吸収線量とした場合の生残曲線の反応定数を初期感染価濃度に対してプロットした。積算照度で整理した場合と同様であるが、低濃度域での傾きがほぼ無くなり、 2×10^8 PFU/ml 程度まで信頼できる測定が可能である。



質量吸収光量を用いても完全に補正できない原因

本来吸収線量を用いれば、初期濃度の違いによる系全体へ吸収されるエネルギーの違いを補正できるはずであるが、高濃度域で補正しきれなかったのは、ファージ液の上層部で紫外線が吸収され下層に到達せず、既に不活化されたファージに照射し続けているためであると考えられる。照射中に攪拌するなど均一化を行えば、ある程度改善されると考えられるが既に不活化されたファージがエネルギーを吸収し続けるオーバーキルは避けられず、完全に補正することは困難で有ると考えられる。

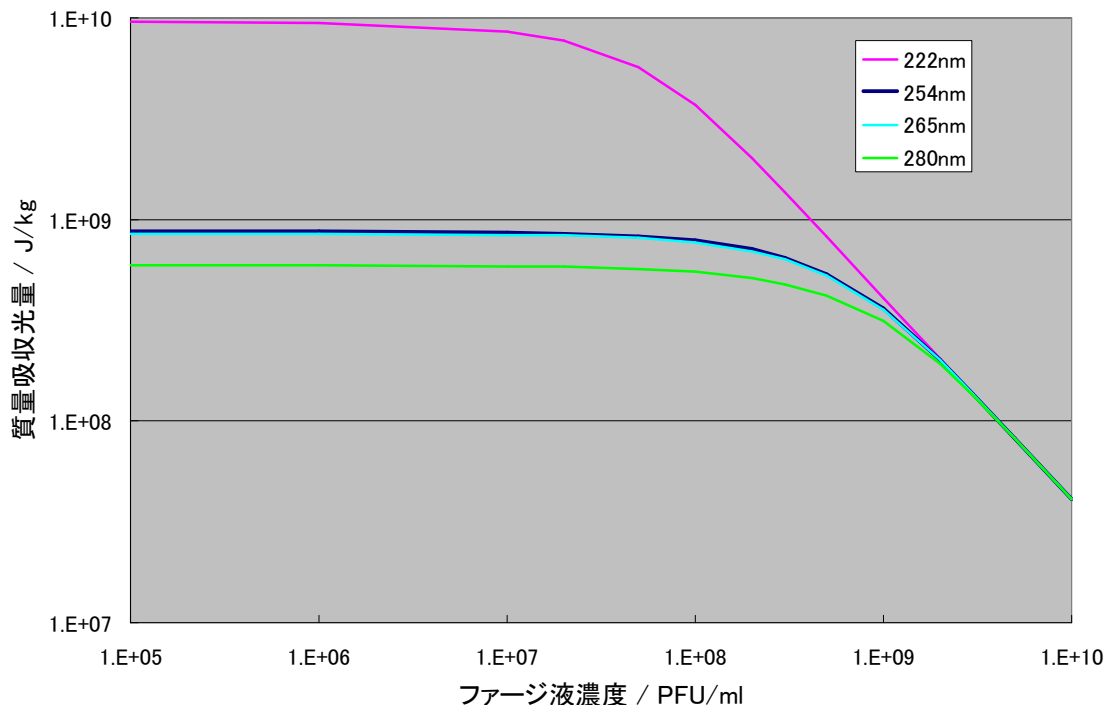
なお、ファージ1つの投影断面積は $\phi 28\text{nm}$ の球体と考えると $6.16 \times 10^{-12} \text{ cm}^2$ であり、 1cm^2 あたりのファージの数は $1 \times 10^8 \text{ PFU/ml}$ の場合で 1.77×10^7 個（1個で1PFUと考えた場合）に過ぎず、全く重なりが無かった場合でも $1.09 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ とわずか0.01%程度を覆っているに過ぎない。



波長が異なる場合の質量吸収光量の違い

254 nm の場合と同様に、222 nm の遠紫外線を照射した場合のバクテリオファージQ β に対する質量吸収光量を計算した。254 nm の場合よりも吸光度が大きい分、**同じ積算照度であっても一桁程度質量吸収光量は大きくなった**。また、254 nm での場合よりも低い濃度から質量吸収光量の低下が見られた。

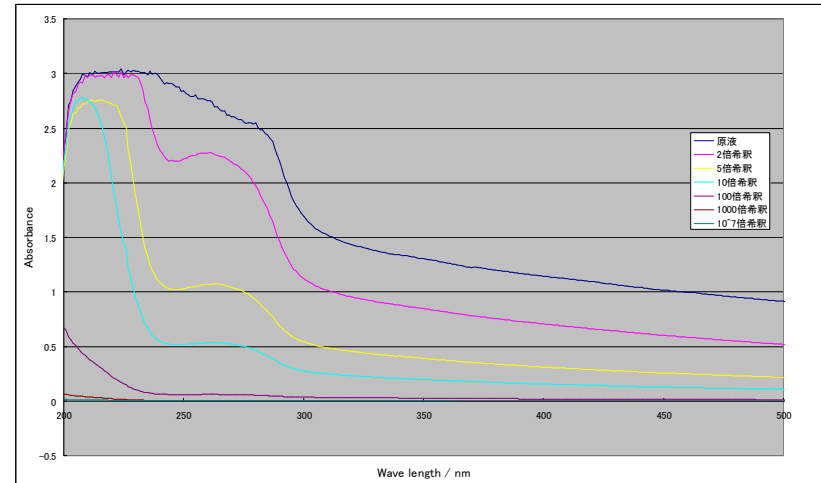
265 nm では 254 nm とほぼ同等であったが、280 nm では吸光度が下がり、質量吸収光量も低下している。ただしこれらはいずれも厚さが1.77mmの系に対する場合の計算結果である。



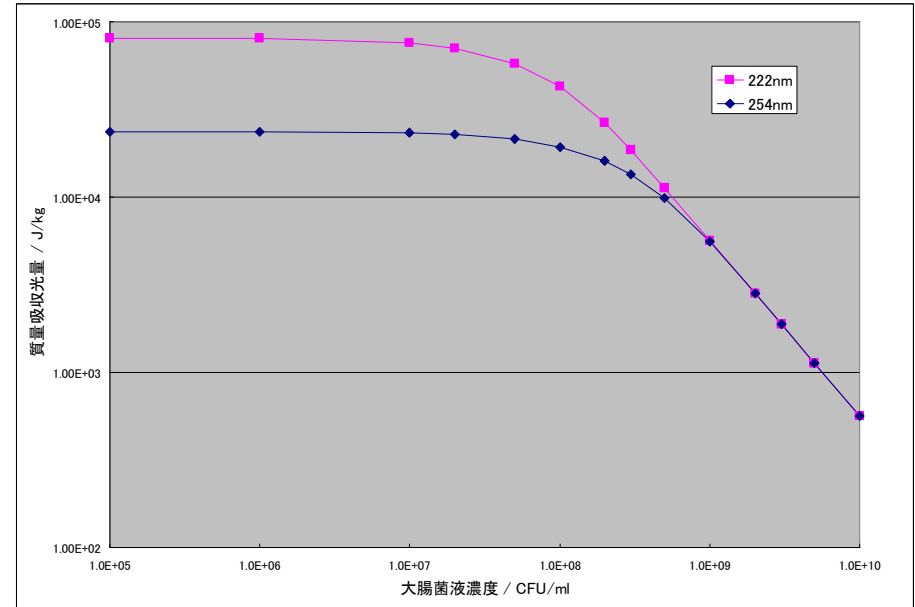
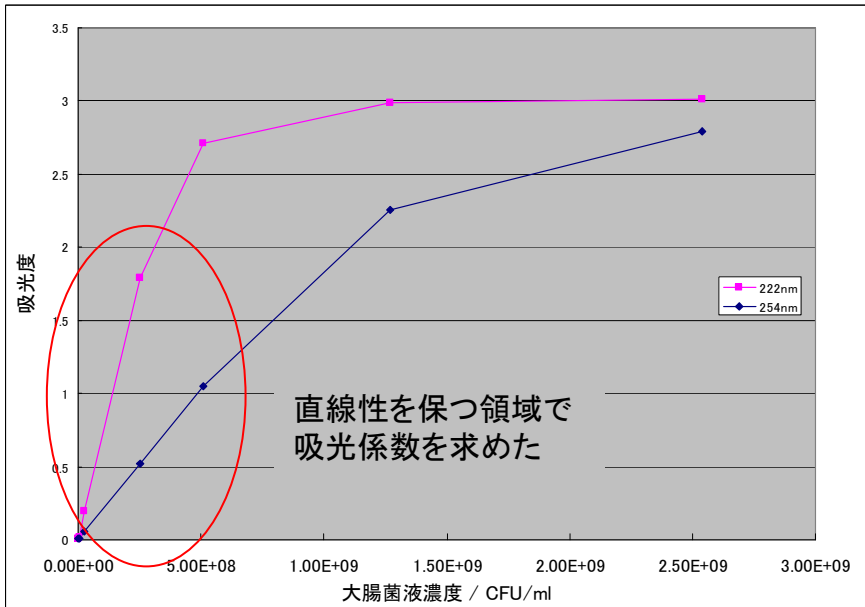
実際に異なる濃度のファージに 222 nm 遠紫外光を照射した場合の生残曲線の取得は、今後実施する予定。

大腸菌に対する質量吸収光量

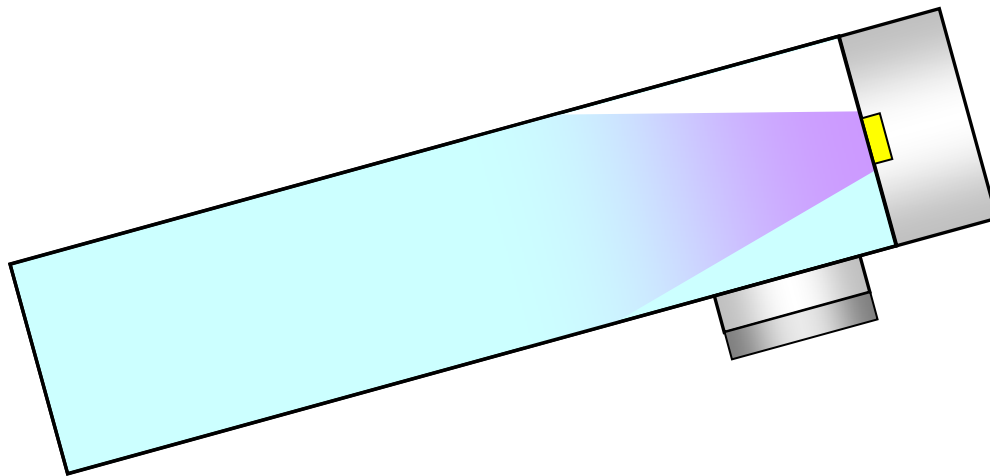
質量吸収光量を求めるために、大腸菌の質量を求めた。大腸菌を直径 $1\ \mu\text{m}$ 、長さ $2\ \mu\text{m}$ 、密度 $1\ \text{g}/\text{cm}^3$ の円柱として計算すると、体積は約 $1\ \mu\text{m}^3$ で質量は $1 \times 10^{-12}\ \text{g}$ となった(*)。大腸菌1つで1 CFUと仮定して、ファージの場合と同様に質量吸収光量 (J/kg) を求めた。その結果数十 kJ/kg 程度の値となり、放射線滅菌の際の吸収線量と比較できる程度の値となった。254 nm の場合で $10^8\ \text{CFU}/\text{ml}$ 程度から質量吸収光量は低下し始めているが、それ以降吸光度も低下するため、実際にはより低下は大きくなる。



(*) <https://biomedicalhacks.com/2020-11-25/ecoli-size/>



水栓内部に対する紫外線照射の考察(1)



SANEI株式会社との受託研究に於いて、水栓中の滞留水に対する紫外線照射による消毒効果について評価を行った。

円筒状の水栓の一端に波長 265 nm の UV-C LED (スタンレー電気) を装着、大腸菌液及びバクテリオファージ Q β 液を入れて照射を行い、一定時間毎にサンプリングし、生残曲線を得た。

また、完全に満水 (65ml) にして水平照射した場合と、少し液量を減らし (50ml) 空間を空けて斜めにして照射した場合との比較を行った。

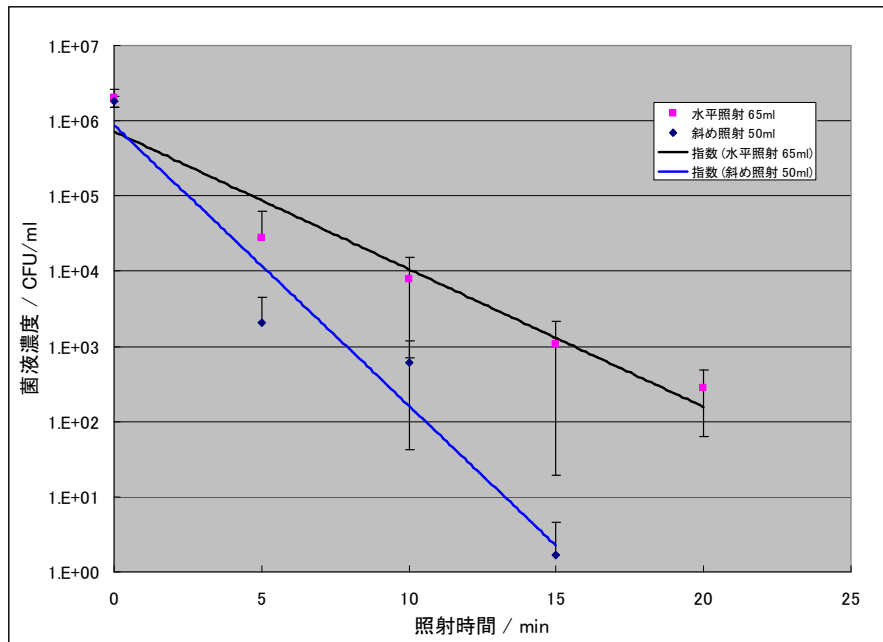
初期濃度は大腸菌で 2×10^6 CFU/ml 程度、ファージで 1×10^7 PFU/ml 程度であった。

水栓内部に対する紫外線照射の考察(2)

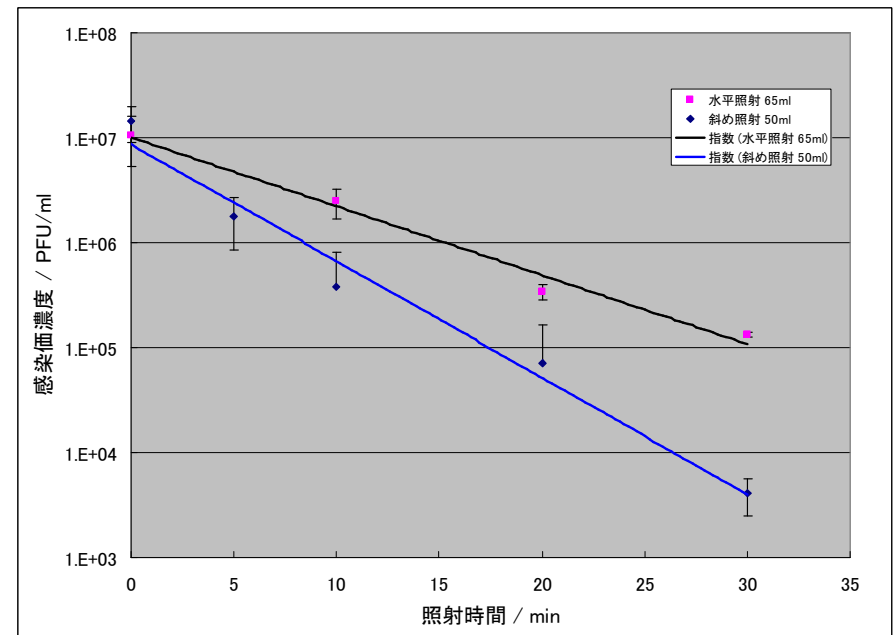
このような体系では、どの点での「放射照度」を時間積分して積算照度を求めれば良いか分からないため、単純に照射時間を横軸として生残曲線を作成した。

結果はいずれも斜め照射の場合の方が生残曲線の傾きが大きく、照射効果が大きかった。これは満水中では全ての紫外線が当該波長で吸収域を持つ液中を進むのに対して、斜め照射の場合は一部空気中を進むため、より広い範囲に照射を行うことが出来ているためだと考えられるが、正確な質量吸収光量の評価は困難である。

シミュレーションによる計算の他、**PVA-KI 等の化学線量計による評価**が求められる。



大腸菌に対する水栓装置での照射効果(n=3)

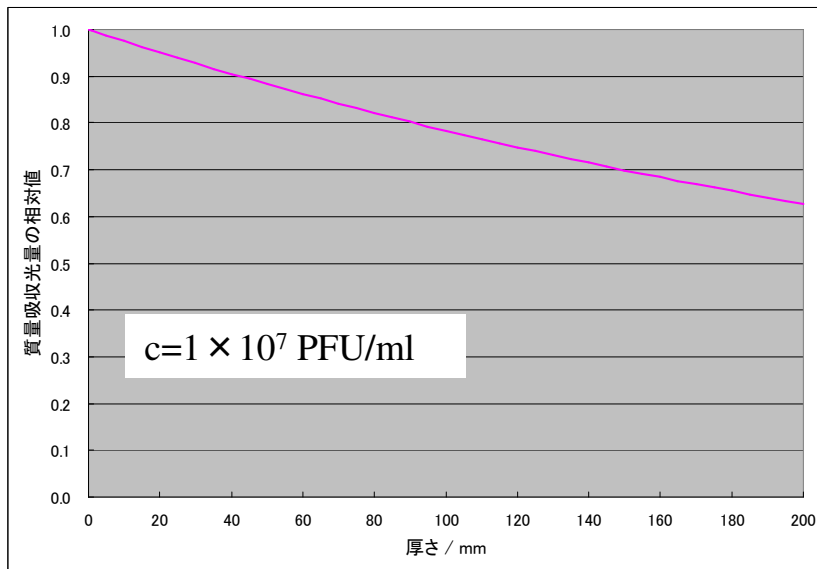


バクテリオファージQβに対する水栓装置での照射効果(n=3)

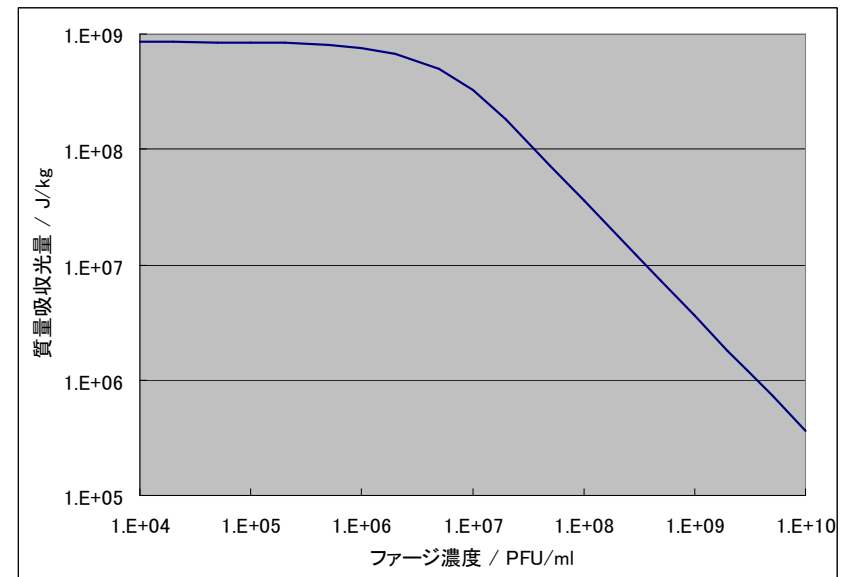
水栓内部に対する紫外線照射の考察(3)

円筒中のバクテリオファージQ β (1×10^7 PFU/ml) に対して 265 nm の紫外線を端面から均一に平行入射した場合に、反対の端面での照度を求め、入射照度を 1 mJ/cm^2 とした場合のファージに対する質量吸収光量の変化を求めた(左グラフ)。単純な系ではこのような形で質量吸収光量を評価することが可能であるが、平行ビームの入射の場合など特殊な場合に限られ、やはり化学線量計での評価が必要。

さらに、実際の系では希薄極限に近く減衰はほとんど起こらないが、例えば200mmの長さの円筒系の場合、 1×10^6 PFU/ml 程度以下であれば質量吸収光量はほぼ一定であるため、この程度の濃度で生残曲線の取得を行えば良く、化学線量計による評価も ϵc が同等になるように調整すれば非常に簡単に質量吸収光量を評価可能である。



液柱の厚さ増加に伴う質量吸収光量相対値の変化



$t=200 \text{ mm}$, $I_0=1 \text{ mJ/cm}^2$ でのファージ濃度と質量吸収光量の相関

水栓内部に対する紫外線照射の考察(4)

質量吸収光量が分かれば、十分に濃度が薄く、厚さが薄い場合の理想的な生残曲線を用いて、どれだけ感染価を下げる事が出来るか評価が可能となる。

もちろん、質量吸収光量が一定となる濃度域で実際に微生物を使った実験を行いバイオドシメーターとして質量吸収光量を求めることも可能だが、熟練した研究員による時間のかかる実験が必要で、コストが高い。

PVA-KI 線量計は簡単な調合で作成可能で、紫外可視分光光度計があれば測定可能。安定な測定が可能となるように今後の標準化が必要。

