

第5回日本放射線安全管理学会 日本保健物理学会合同大会
2024/12/18 3B08

吸収線量の紫外線領域への概念拡張

秋吉 優史

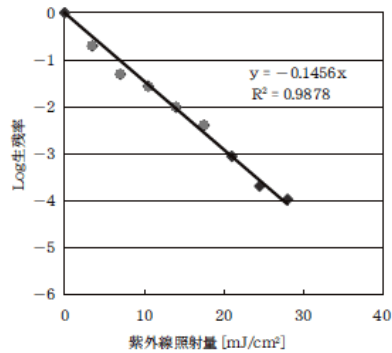
大阪公立大学 工学研究科、
放射線研究センター、
大阪国際感染症研究センター

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

<http://bigbird.eng.omu.ac.jp/AntiCovid19/>



紫外線による殺菌・不活化効果

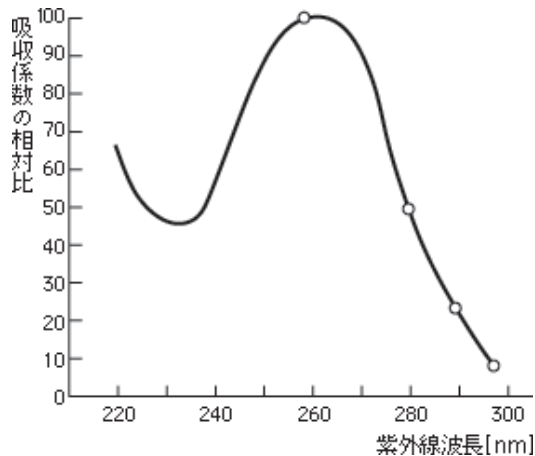


太古の昔から生物にとって紫外線は大敵で、オゾン層が出来るまで生物は陸上に上がることが出来なかった。紫外線は電離放射線には分類されず(法令上空気を電離できるエネルギーを有する光子、荷電粒子を電離放射線と呼ぶ)、DNAの主鎖を切るだけのエネルギーは無いが、配列している塩基同士を励起して接合してしまう場合がある。特に、ピリジミン二量体の生成が紫外線による損傷の主たる物と言われており、DNAの複製を妨げる遺伝子損傷となる。

このように紫外線は放射線のように直接遺伝子を傷つけ、不活化するため対象とする菌、ウイルスの種類を問わない(多少の強い、弱いはあるが)。SARS-CoV-2も紫外線で不活化されることが様々な論文で報告されている。

岩崎電気 芽胞形成菌の紫外線感受性(その2) - 枯草菌芽胞 -
<https://www.iwasaki.co.jp/tech-rep/technical/81/>

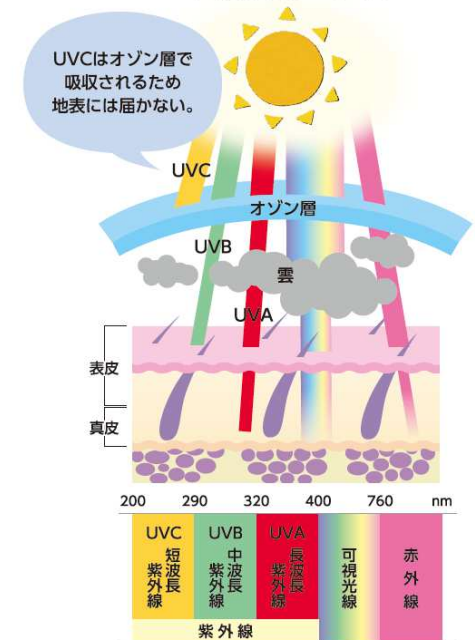
DNAに対する紫外線吸収の波長依存性



紫外線は波長によって長い方から UV-A (400-315nm), UV-B (315-280nm), UV-C (280nm未満) と分類される。殺菌効果のピークは260nm程度で、310nm程度になるとほとんど効果がなくなる。放射線滅菌の場合と同じように、照射量が増えると共に指数関数的に生き残る菌・ウイルスが減少する生残曲線を示す。

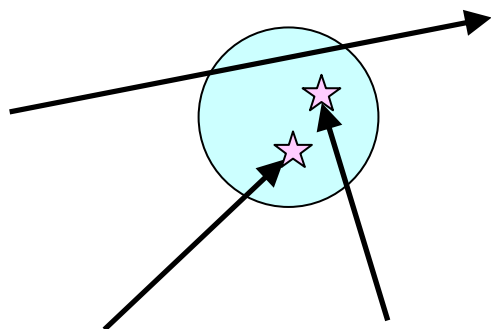
岩崎電気ウェブサイトより

太陽光線の種類



吸収線量とは

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

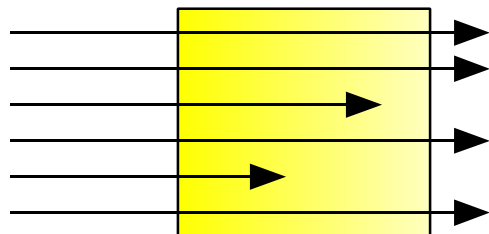


ある体系に於いて**吸収**した放射線の電離エネルギーをその体系の質量で割った量が吸収線量(J/kg)。不均一な照射の場合体系の取り方(分母の大きさ)によって値が異なってくる。

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

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

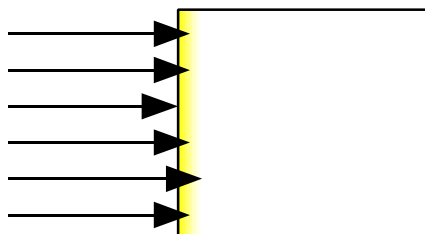


整列拡張場

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

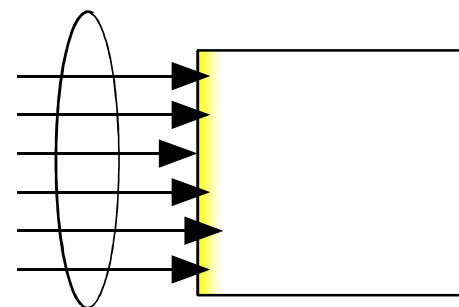
$$H_p(0.07) > 10 H_p(10)$$



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



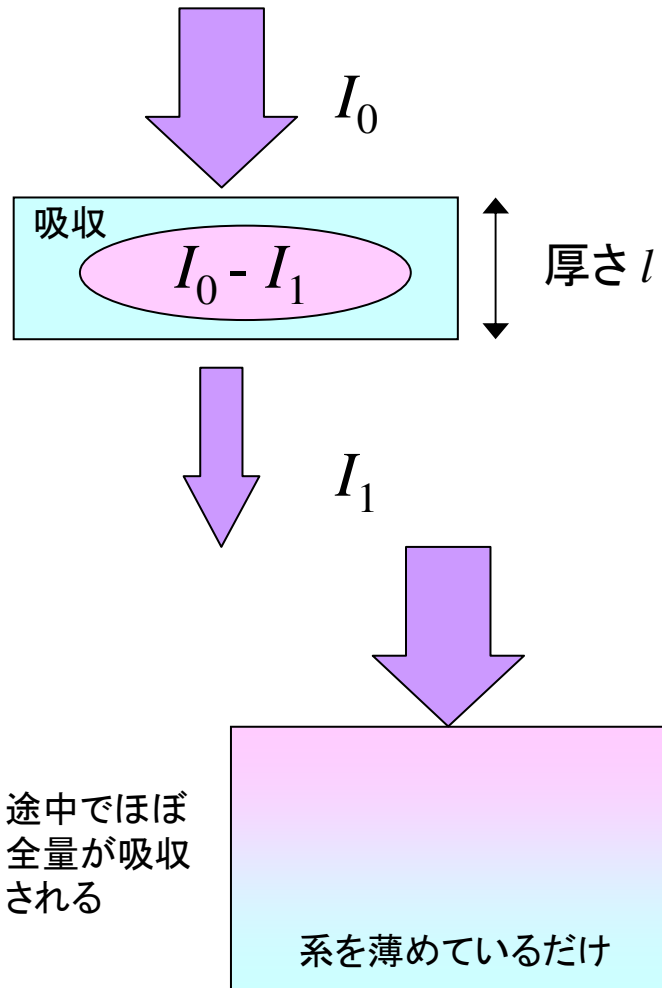
人体の皮膚では数10μmの範囲で吸収されてしまう。これまで微小体積へのエネルギー付与の評価は行われておらず、単位面積あたりのエネルギーフラックス(J/m²)で評価。

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)



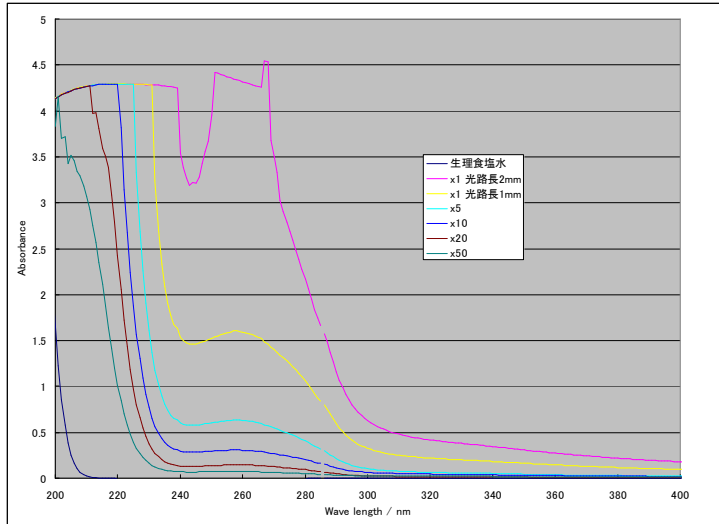
ランベルト・ベールの法則

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)

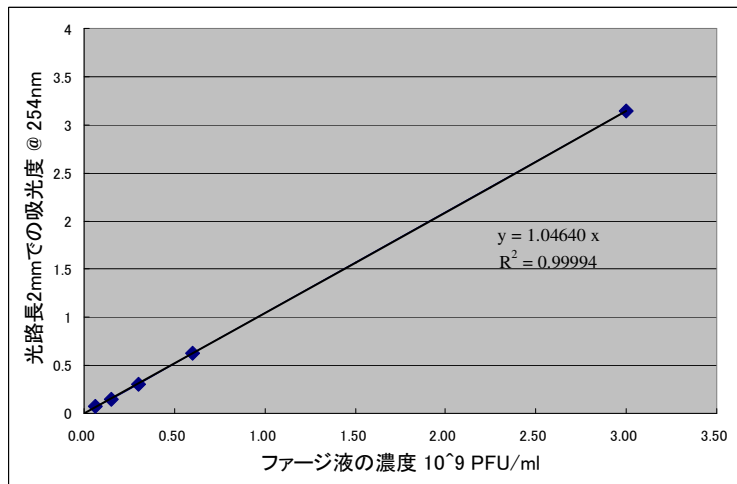
から、系に吸収されるエネルギー $I_0 - I_1$ は $I_0 (1 - 10^{-\epsilon c l})$ と表わすことが出来、吸光度が 1だと 90%、2だと 99% 吸収されたことになる。系が厚いほど、媒質濃度が高いほど、吸収されるエネルギー自体は大きくなる。

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。

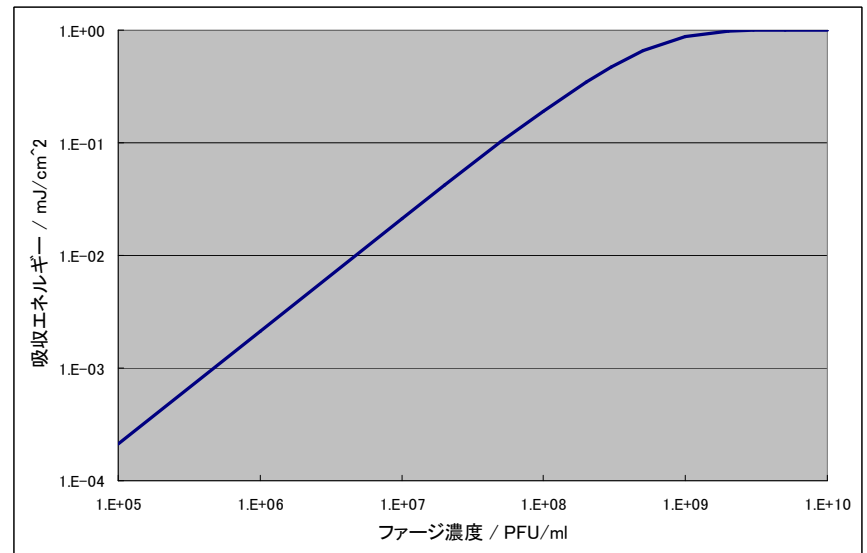
吸光度から求める質量吸収光量(2)



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。



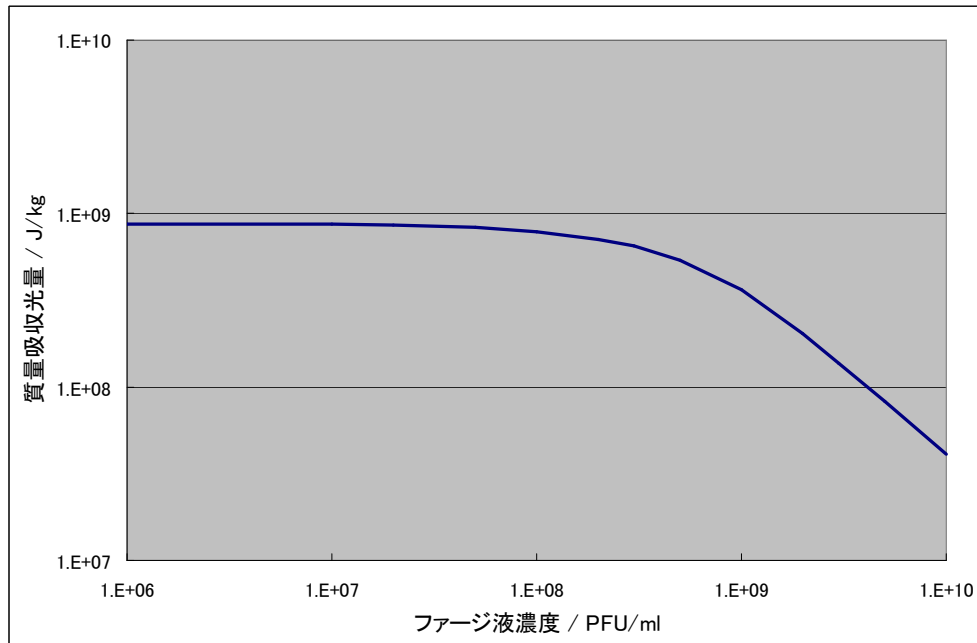
吸光係数 = 5.232×10^{-9} ml/PFU \cdot mm



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



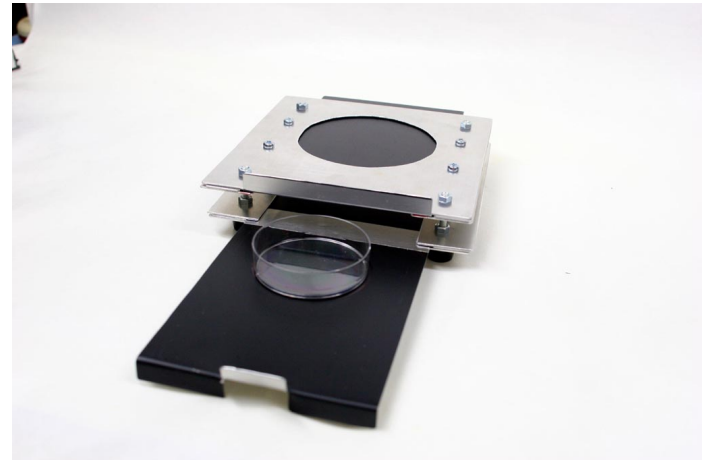
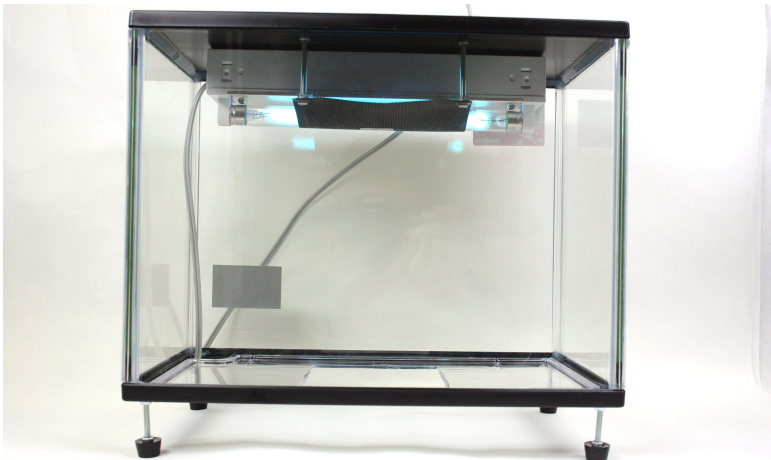
なお、ファージを分散させている生理食塩水による紫外線の吸収は無視可能であり、ここで求めた吸収線量は**系全体を平均化した場合**の値である点に注意を要する。

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。



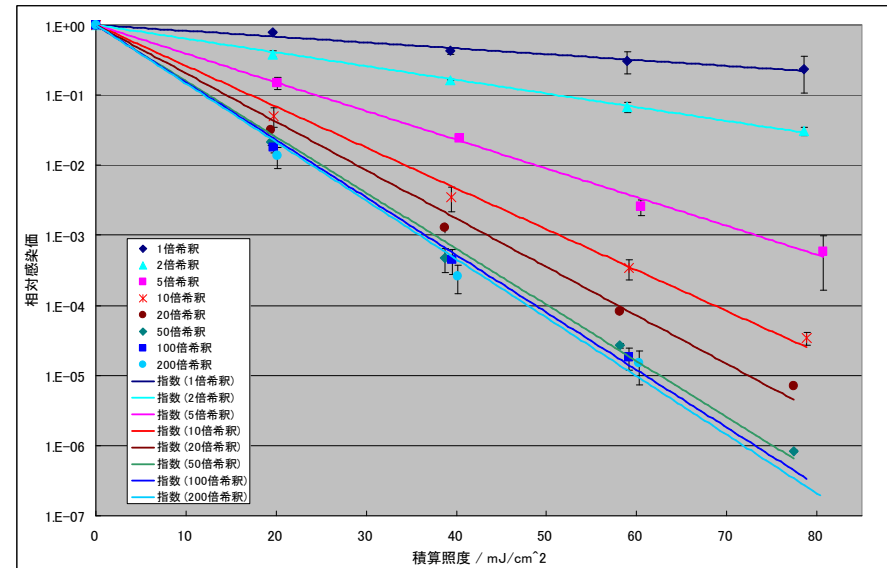
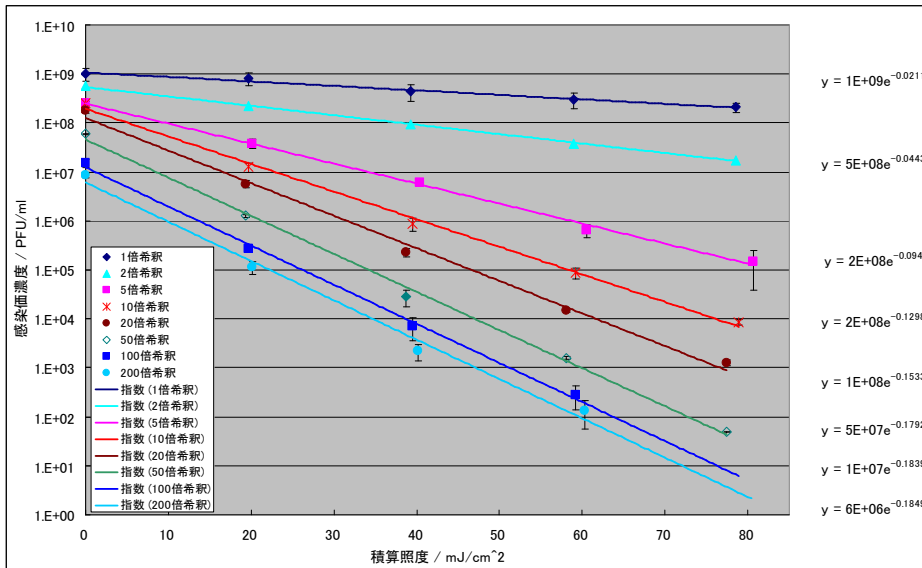
生残曲線の初期濃度依存性(2)

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)

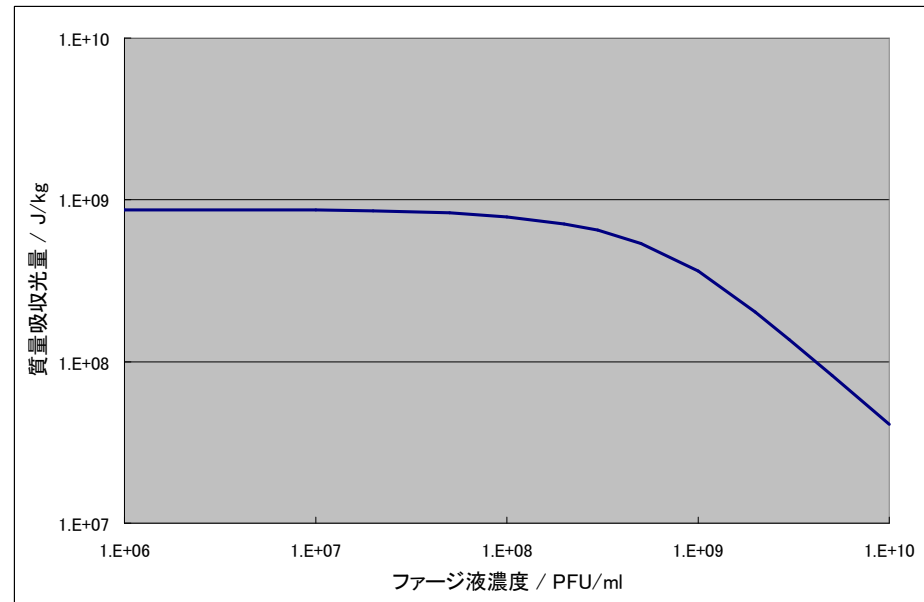
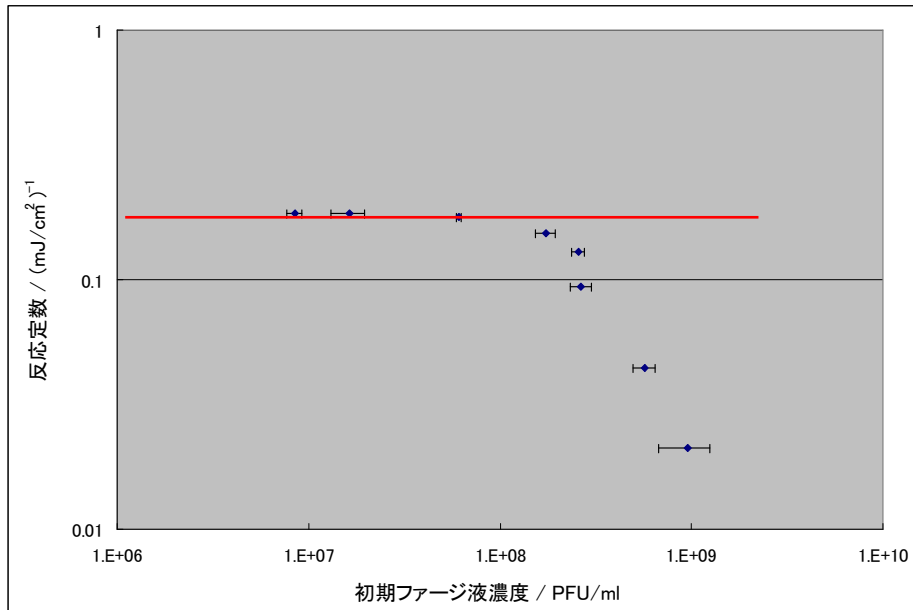
サンプリングしたファージによるプラーク数の測定は2枚のJIS LB平板培地で実施し、平均を取った。照射試験は同じ日に3回行い、平均を取っている。初期濃度は、ファージストック(原液)を m倍希釈して変化させているが、ファージストックの感染価は実験を行った日によって異なっており、m倍希釈というのは整理する上での指標に過ぎない。実際の初期感染価は照射前に実測をしている。結果は、初期感染価が高くファージ濃度が高いほど反応速度定数が小さく、不活化されにくくなった。



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。

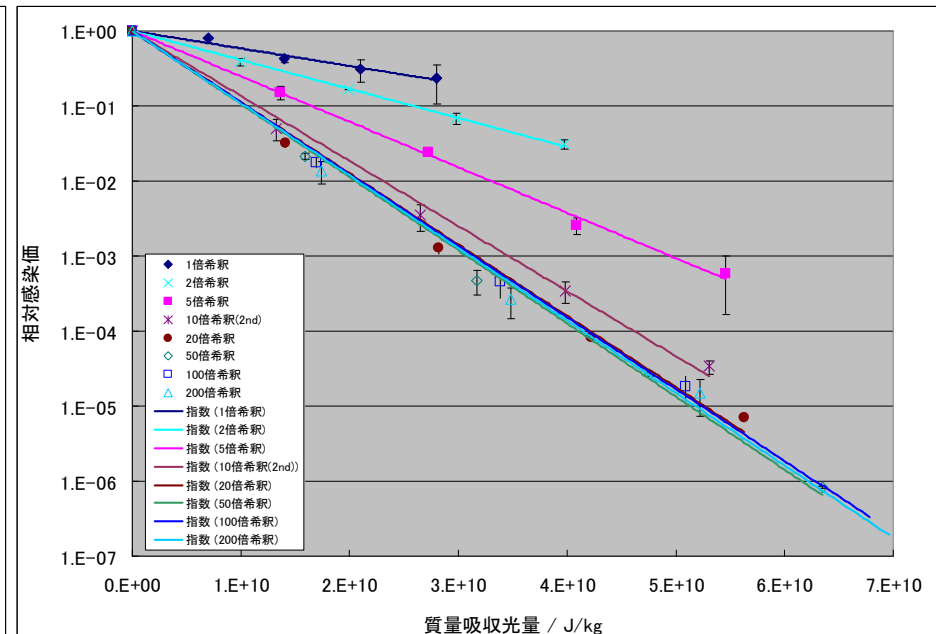
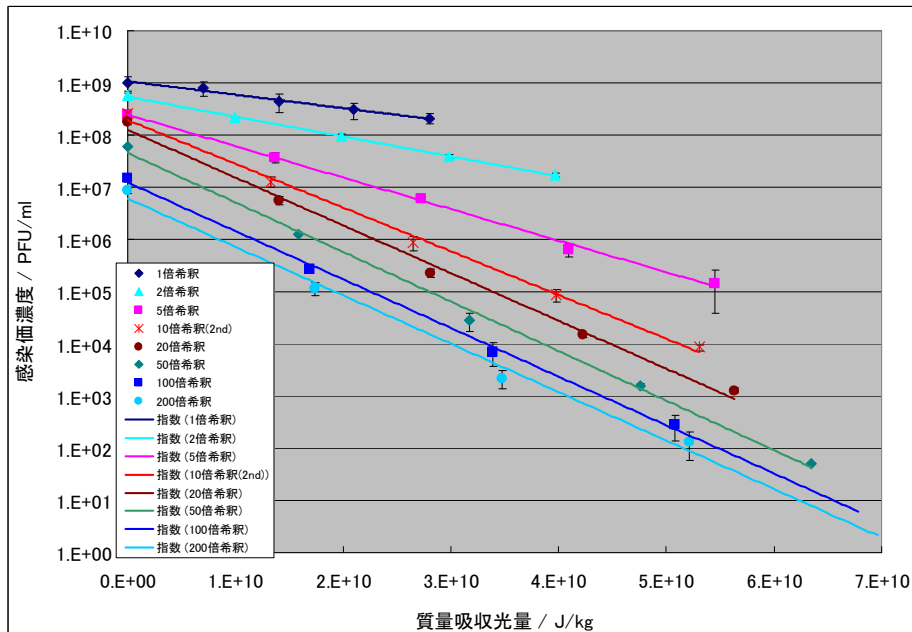
その結果、吸光度から求めた吸収線量のファージ液濃度依存性と非常に良く似た傾向を示し、 1×10^8 PFU/ml 程度を境に、ファージ液が濃くなると不活化されにくくなることが明らかとなった。



質量吸収光量を用いた生残曲線の整理(1)

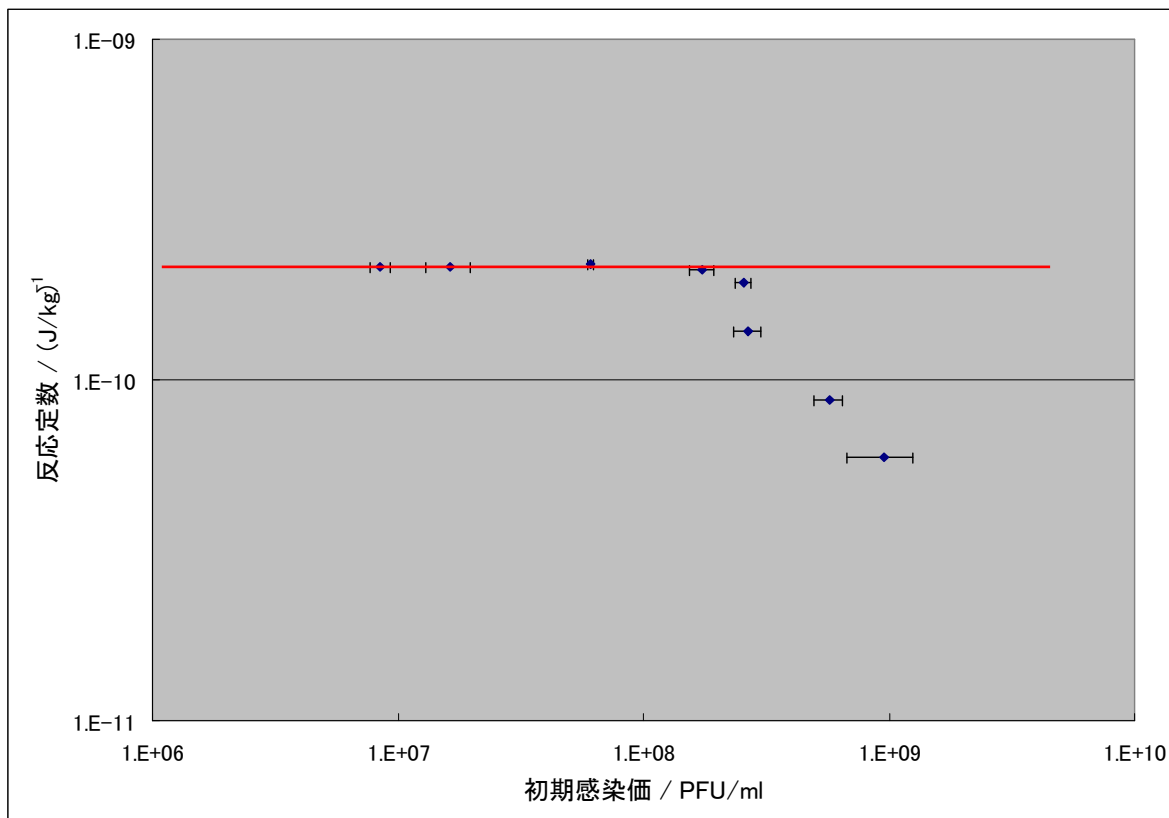
生残曲線の横軸をエネルギーフルエンスである積算照度ではなく、ファージが吸収したエネルギーとして質量吸収光量を用いて整理した。

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)

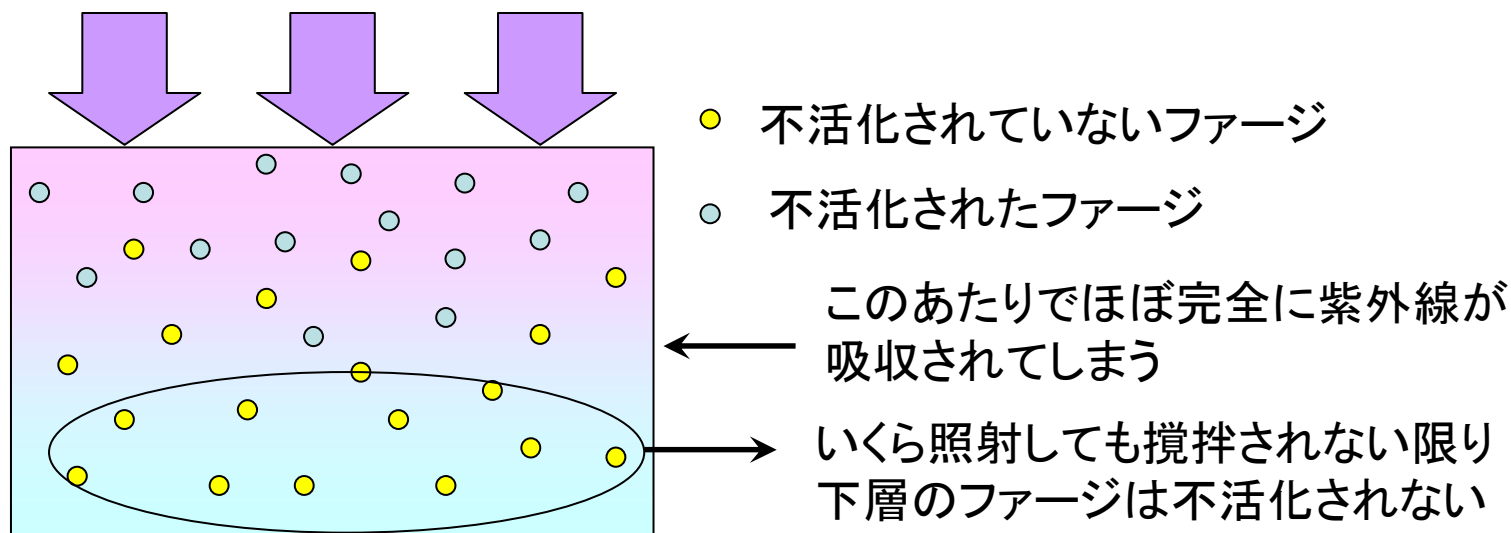
生残曲線の横軸を吸収線量とした場合の生残曲線の反応定数を初期感染価濃度に対してプロットした。積算照度で整理した場合と同様であるが、低濃度域での傾きがほぼ無くなり、 2×10^8 PFU/ml 程度まで信頼できる測定が可能である。



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。

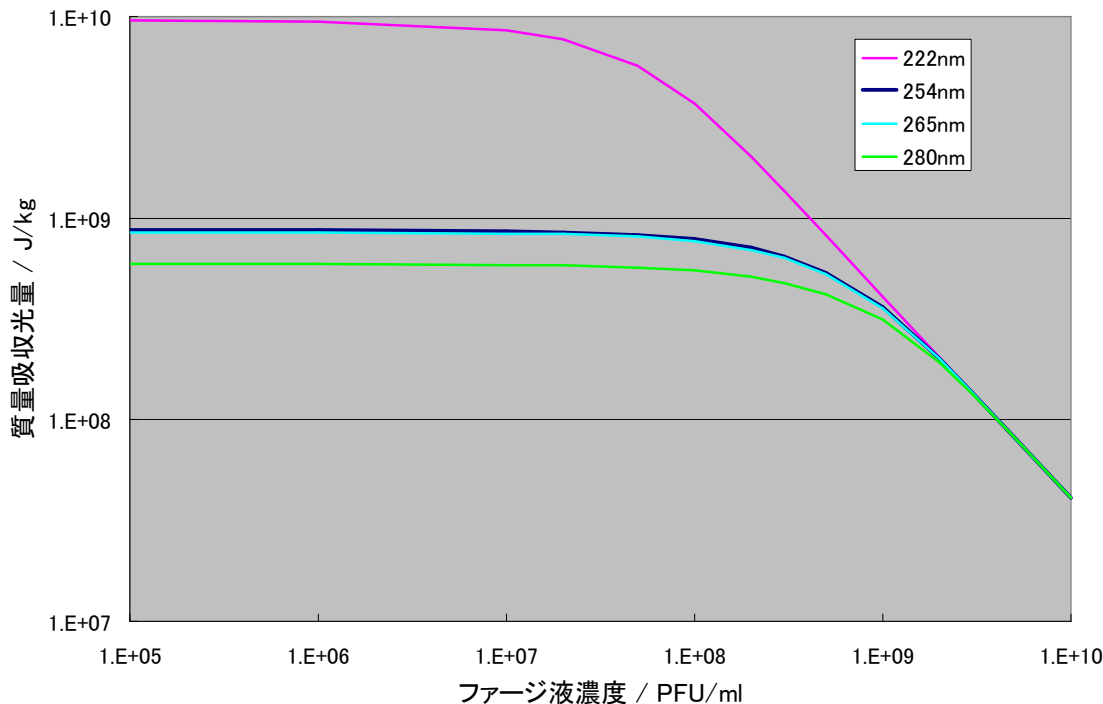
なお、ファージ1つの投影断面積は $\phi 28\text{nm}$ の球体と考えると $6.16 \times 10^{-12} \text{ cm}^2$ であり、 1cm^2 あたりのファージの数は $1 \times 10^8 \text{ PFU/ml}$ の場合で 1.77×10^7 個（1個で1PFUと考えた場合）に過ぎず、全く重なりが無かった場合でも $1.09 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ とわずか0.01%程度を覆っているに過ぎない。



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。



同じ積算照度で照射しても吸収するエネルギーは波長により異なるため、効果が異なる。質量吸収光量を物差しにして評価することで、初めて光子のエネルギーによる効果の違いが見えてくる。

