

称号及び氏名	博士（工学） 大矢根 育子
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 31 日
論文名	「超音波による微生物の殺菌と増殖活性に関する研究」
論文審査委員	主査 西村 六郎 副査 坂東 博 副査 河野 健司 副査 岩瀬 彰宏

## 論文要旨

急速な科学の進歩に伴い生活排水や工業排水による環境汚染が進み、様々な健康被害が生じている。世界保健機構（WHO）の報告によれば、水系微生物による病気で年間 300 万人が死亡しており、今後さらに増加すると予測されている。微生物による水質汚濁は発展途上国のみならず、先進国においてもクリプトスポリジウム、レジオネラ、ジアルジアなど病原性微生物による新興性感染症が問題となっている。中でもクリプトスポリジウムによる汚染は我が国でも報告されており、これに対する指針が 2001 年に改定された。

クリプトスポリジウムは硬い殻を有するために薬品耐性が非常に高く、上水処理過程における塩素処理が全く効かないのが最大の問題点であり、塩素処理以外の殺菌法の確立が急務である。濾過による対策が進められているが、オーシストの直径が 5  $\mu\text{m}$  程度であるため、施設費用が非常に高い。また、オゾンによる殺菌は有効性が確認されつつあるが、ランニングコストや施設の危険性が高いことが問題である。そこで、本研究では超音波を用いた低エネルギーで高効率除去が可能な殺菌システムの開発を目的に研究を行った。

水への超音波照射によって、キャビテーション・バブルとよばれる気泡が生成し、圧縮と膨張を繰り返してそのバブルが崩壊する際に、超高温高圧（数千度・数百気圧）の反応場ができることが知られている。このとき、水分子は OH ラジカルと H ラジカルに熱分解され、様々なラジカル反応が誘起される。また、バブルの崩壊時に 100  $\text{m s}^{-1}$  にも及ぶ衝撃波が生じ、破壊作用を及ぼす。

超音波による微生物殺菌の特徴として、次のいくつかの点が挙げられる。ひとつはオゾン殺菌や膜濾過などの技術に比べて装置が簡易かつ安全、安価であることである。近年、塩素化合物によって生ずるトリハロメタンなどの発癌性物質が懸念される中、超音波殺菌

は薬品添加の必要性がなく、したがって、副生成物の危険性が低いことも大きな特徴といえる。

しかしながら、超音波はその発信源からの距離が離れるにつれ、キャビテーションを発生するのに十分なエネルギーを得ることができないため、これまでスケールアップは難しいとされてきた。さらに、キャビテーションは定在波音圧の腹になるところで集中して起こることが知られているが、一方微生物は定在波の節になる部分に固定されるため、このことが超音波の効果をさらに弱める可能性が指摘されていた。そこで、本論文の第 2 章、第 3 章では酵母・大腸菌・クリプトスポリジウムを用い、これらの問題を解決するために‘スクイーズ膜効果’と呼ばれる圧力の増幅現象に着目した。ここでは超音波反応場を薄い膜状に設計することによりキャビテーションを効率よく発生させる装置について検討し、さらに、超音波処理のスケールアップを目指した。また、第 4 章、第 5 章では、超音波による微生物の増殖活性への影響を、より詳細に解析するために、微生物代謝熱量測定法およびフローサイトメトリー法を用いて測定した結果について記述した。

本論文は 6 章で構成されるもので、各章の内容を以下に示す。

第 1 章では、超音波化学についての概論と、本研究に関わる従来の研究について述べ、本研究の意義と目的を明確にした。

第 2 章では、ホーン型超音波発生装置 (27 kHz) と酵母および大腸菌を用いて、スクイーズ膜効果についての基礎的な実験を行った。酵母および大腸菌の殺菌に及ぼすスクイーズ膜の厚さ、超音波振幅、超音波照射時間、菌体濃度の効果についてコロニー係数法を用いて調べた。その結果、スクイーズ膜厚が 2 mm の時、超音波キャビテーション強度の指標となる OH ラジカルの生成量および殺菌効果が最適値を取ることがわかった。また、振動面の振幅を直接モニタリングすることにより超音波の出力強度を安定かつ正確に求めることができた。振幅と OH ラジカル生成量との関係および殺菌効率との関係について、良い相関関係を得た。さらに、微生物殺菌は擬一次反応で進行し、殺菌速度定数は酵母においては振幅 7  $\mu\text{m}$  (p-p) で  $2.43 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、大腸菌では  $3.21 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  であり、酵母に比べ大腸菌の殺菌速度が非常に速いことがわかった。また、振幅に対するキャビテーション生成の閾値は酵母の殺菌の閾値と一致したが、大腸菌においてはキャビテーション生成の閾値以下でも殺菌が生じていることがわかった。以上の結果より、スクイーズ膜を利用したホーン型超音波発生装置の殺菌効率についての基礎特性を得ることができた。

第 3 章では、第 2 章で確立されたスクイーズ膜効果を利用し、処理量のスケールアップを目的として、小型の装置 ((1) ホーン型) から大型の装置 ((2) 円筒型、(3) 洗浄槽型) の 3 種類の超音波発生装置の殺菌特性をクリプトスポリジウムを用いて調べた。照射後のクリプトスポリジウム生残率は、染色されたオーシスト壁および核の形態観察およびマウスを用いた感染力試験により求めた。(1) ホーン型装置 (27.5 kHz,  $17.3 \text{ W cm}^{-3}$  または  $42.0 \text{ W cm}^{-3}$ ) では、第 2 章で扱った酵母と同程度の殺菌効率を得られ、60 秒で 35 % のオーシスト壁の破壊が確認され、さらに、残りの 65 % の核が消失していることがわかった。また、

感染力から評価すると、生残率は残存率（オーシスト壁と核共に確認された率）より低いことがわかった。また、実用化を想定し、河川から採取した原水へオーシストを懸濁して同様に超音波照射を行い、その結果、殺菌効率が純水で得られた結果と一致することを確認した。(2) 円筒型装置 (26.6 kHz, 0.176 W cm<sup>-3</sup>) を用いた流通実験では、流量 33 mL min<sup>-1</sup> の条件で 97.0 %、4000 mL min<sup>-1</sup> では 46.4 % が殺菌された。これらの結果から、殺菌速度定数は 20.0 min<sup>-1</sup> と求められた。さらに、連結系の殺菌システムについて検討した結果、6 連 7 列の連結処理 (流量 1700 mL min<sup>-1</sup>) により、99.97 % のオーシストが 1.3 kW 程度で殺菌可能であると算出され、従来の超音波装置に比べ、非常に低コストで運転できる可能性が示唆された。(3) 洗浄槽型装置 (22.6 kHz, 1.0 W cm<sup>-3</sup>) を用いた実験では、他の装置と同様にクリプトスポリジウムの殺菌が可能であったが、その効率は円筒型超音波装置と比較して低い値となった。しかしながら、1 ppm の次亜塩素酸ナトリウムとの併用によって、殺菌効率がわずかながら上がることがわかった。以上より、スクイーズ膜効果を用いた超音波殺菌は病原性微生物であるクリプトスポリジウムの殺菌に非常に効果的であり、さらに、大型である円筒型超音波装置が最適であることがわかった。

第 4 章では、超音波照射（ホーン型）が微生物の増殖に与える影響についてより詳細に調べるために、酵母の増殖時に生じる代謝熱量の測定を行った。比較のために、放射線照射および塩素処理の影響を調べた。これより、微生物の増殖速度変化と遅滞時間など、より詳細な情報が得られた。微生物は低周波数 (27 kHz) の超音波照射によって、低出力では殺菌作用を受け、高出力では殺菌作用と静菌作用（増殖活性の低下）の両効果を受けることが示唆された。これは放射線照射の効果と類似しており、初期に現れる物理的効果（衝撃波）による殺菌作用に対し、徐々に化学的効果（OH ラジカル）が静菌作用を引き起こすためと考えられた。また、超音波照射、放射線照射および塩素処理後の生残菌数に対する増殖遅滞時間を比較した結果、超音波による効果が最も高いことが明らかとなった。この結果、超音波による殺菌は他の処理に比べて増殖を抑える効果が高いことがわかった。

第 5 章では、フローサイトメトリー法により、超音波（化学作用が支配していると考えられる高周波を使用）と放射線による微生物（酵母）の細胞膜の損傷と増殖における核酸生成量を測定し、生残微生物の活性評価を行った。高周波数 (200 kHz) の超音波では、衝撃波によって細胞死は起こらなかったが、過酸化水素添加のみによる比較実験の結果、衝撃波によって細胞膜の損傷がおり、OH ラジカル（または過酸化水素）の細胞膜透過が加速され、核酸の生成が遅れることがわかった。これに対し、放射線照射によって殺菌された酵母は、5 kGy 以下では主にγ線による直接的な作用によって殺菌され、5 kGy 以上では生成した OH ラジカルまたは過酸化水素による相乗的な殺菌効果が現れることがわかった。以上の結果に基づいて、微生物の活性に及ぼす超音波と放射線の相違・類似および超音波の高周波数と低周波数の相違を物理・化学作用の観点から考察した。

第 6 章では、本論文の結論を述べ、内容と成果を総括した。

## 審査結果の要旨

本論文は、超音波を用いた低エネルギーで高効率除去が可能な殺菌システムの開発を行うとともに、超音波を使用する上で重要な鍵となる超音波最適条件の確立と超音波による殺菌メカニズムの解明を行ったものである。本論文では以下の成果を挙げている。

(1) 処理量のスケールアップを目的とし、スクイーズ膜効果を生ずる3種類の超音波発生装置の殺菌特性を病原性原虫であるクリプトスポリジウムを用いて検討している。(a) ホーン型装置 (27 kHz) では、スクイーズ膜厚 2 mm で、OH ラジカルの生成量および殺菌効果が最適値を取ること、また、河川から採取した原水中での殺菌効率が純水と一致することを確認している。(b) 円筒型装置 (26.6 kHz) を用いた流通実験に基づき、この装置が従来の超音波装置に比べ、非常に低コストで運転できる可能性を指摘している。(c) 洗浄槽型装置 (22.6 kHz) では、塩素処理との併用効果を得ている。以上より、スクイーズ膜効果を用いた超音波装置は殺菌に非常に効果的であり、さらに、大型である円筒型超音波装置が最適であること明らかにしている。

(2) 微生物(酵母)の増殖に及ぼす超音波照射 (27 kHz) の影響を代謝熱量測定により詳細に調べるとともに、放射線照射および塩素処理の影響との比較を検討している。微生物は超音波照射によって、低出力では殺菌作用を、高出力では殺菌作用と静菌作用を受けており、放射線照射の効果と類似点が見られる。また、超音波は他の処理法に比べて増殖抑制効果が高いことを明らかにしている。

(3) フローサイトメトリー法により、超音波照射 (200 kHz) と放射線照射による酵母の活性を検討している。超音波では、衝撃波によって細胞膜の損傷がおり、OH ラジカル (または過酸化水素) の細胞膜透過が加速され、核酸の生成が遅れることを明らかにしている。以上の結果より、微生物の活性に及ぼす超音波と放射線の相違・類似および超音波の周波数依存性を物理・化学作用の観点から考察し、殺菌メカニズムを明らかにしている。

本研究の成果は、低エネルギーで高効率除去が可能な殺菌システムの開発に向けて重要な結果を提供しており、微生物殺菌メカニズムおよびその装置の特性を正確に把握することに貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。