

DNA解析手法を用いた微生物リスク診断と制御技術の評価

四本 瑞世 緒方 浩基
末田 香恵 三井 成俊
(本社エンジニアリング本部)

Risk Assessment of Microbial Contamination using DNA Analysis and Evaluation of Microbiological Management Technology

Mizuyo Yotsumoto Hiroki Ogata
Kae Sueda Narutoshi Mitsui

Abstract

In a manufacturing factory of pharmaceuticals and foods or in medical facilities, it is important to control the microbes focusing high risk of microbial contamination. Now, it is possible to estimate the risk of microbial contamination through the identification of microbes using DNA analysis. From a field survey on manufacturing environments, it was clarified that the main source of airborne bacteria was humans, ;therefore, sanitation management of humans is important in controlling airborne bacteria. The survey results also showed that the material packing room, and the washing chamber in a clean room, are at a high risk of microbial contamination. We evaluated the disinfection effects of UV germicidal irradiation derived from a difference in UV intensity by using 15 key microbes. The results showed that all microbes except for spores and fungi could be sterilized in a place away from the UV germicidal lamp.

概 要

医薬・食品工場、医療施設において、より高い衛生環境の確保や感染症対策を実施するには、微生物汚染リスクの高い場所に微生物対策を施すことが重要である。今回、従来の微生物数の把握に加えて、DNA解析による微生物種の同定技術を活用することで、微生物汚染リスクの診断が可能となった。実態調査では、浮遊細菌の主な発生源は人であり、着衣などの人の衛生管理が重要であること、クリーンルームの洗浄室や原料開梱室では微生物汚染リスクが高く、清掃や積極的な除菌が望ましいことが明らかとなった。製造施設への導入事例が多い紫外線殺菌について、主要微生物15種類の照度の違いによる殺菌効果を評価したところ、芽胞以外の細菌では、殺菌灯から2.5m離れた場所でも殺菌効果があること、芽胞や真菌は紫外線への耐性が細菌よりも強くなるが、照度が30~170 μ W/cm²であれば、短時間で殺菌できることが明らかとなった。

1. はじめに

近年、新型インフルエンザの発生、ノロウイルスやO157による食中毒の問題から、微生物対策の需要は高まっている。特に、医薬品・食品工場などの製造施設では、高い清浄度が要求されるケースがあり、作業空間における衛生環境の維持や改善が求められる。また、病院、高齢者福祉施設等の医療施設においては、抵抗力や免疫力が低下した易感染者が多く居住しているため、健常者には感染症を起こさない弱毒の微生物でも病気になる可能性が高く（日和見感染症）、環境面での感染症対策が重要となる。より高い衛生環境の確保や、効果的な感染症対策、微生物汚染対策を実施するためには、微生物による汚染リスクがどこにあるのかを評価するとともに、重要度の高い要因にターゲットを絞って対策することが重要である。

特に、食中毒菌や日和見感染菌などの病原性菌については、その存在だけでリスクになるため、存在の有無の把握、存在する場合には、その侵入汚染経路や増殖要因を把握し、効果的に除菌もしくは殺菌することが求めら

れる。

更に、殺菌等の対策技術は、微生物の種類によって得られる効果が異なるため、対策したい微生物に効果のある対策を施さなければならない。

そこで、筆者らは、DNA解析技術を活用し、施設環境における病原性菌等の微生物汚染リスクを合理的かつ客観的に評価・診断する技術を開発するとともに、実際に製造現場に適用して実態調査を行い、衛生管理の現状把握、病原性菌等有害微生物の侵入経路や増殖要因に関する情報を収集している。これら情報を解析し、データを蓄積することで、Fig. 1に示すように、従来よりも、効果的な微生物対策を設計・提案することが可能になると考える。微生物制御については、今回、数多く存在する制御技術の中から、施設や設備の表面や空間を除菌でき、導入コストが安く、殺菌原理が明らかになっている紫外線殺菌にターゲットを絞り、施設内で確認されている主要微生物15種類の殺菌効果に関するデータを取得した。

本報では、微生物汚染リスク診断の概要とその適用事例、紫外線殺菌技術の特性について述べる。

2. DNA解析手法を用いた微生物リスク診断

2.1 微生物リスク診断について

前章で、微生物に対して効果的な対策を行うには、実態調査により病原性菌などの有害微生物の汚染リスクを把握することが重要であると述べた。微生物汚染リスクの把握とは、微生物が、施設内にどのように侵入し、増殖・拡散しているかを把握することであり、浮遊微生物数や付着微生物数など、菌数の把握に加えて、微生物の同定により、どのような微生物で構成されているかを把握することが必要となる。

微生物の同定により、病原性の有無が評価できるだけでなく、施設内のエリア間や場所毎で検出された微生物の種類を比較することで、微生物の侵入経路やどこで増殖しているかを把握できる。更に、Table 1¹⁾に示すように、同定された微生物の特性(土壌に生息するタイプか、動物や人間に寄生・常在するタイプか、湿潤もしくは乾燥のどちらを好むかなど)から、微生物の汚染源の推定が可能となる。

2.2 DNA解析手法による微生物同定

微生物種の同定については、従来、顕微鏡による形態観察や、グラム染色といった染色性や生理的・化学的特性の違いに基づいて行われてきたが、専門知識が必要な上、精度の問題や時間がかかるといった問題があった。近年では、分子生物学や遺伝学的分析手法の進展により、リボソームRNA遺伝子 (rDNA) の塩基配列情報に基づく系統解析により微生物が分類されるようになってきた。

第十六改正日本薬局方では、医薬品の製造工程管理試験や出荷判定試験において、検出される微生物(細菌及

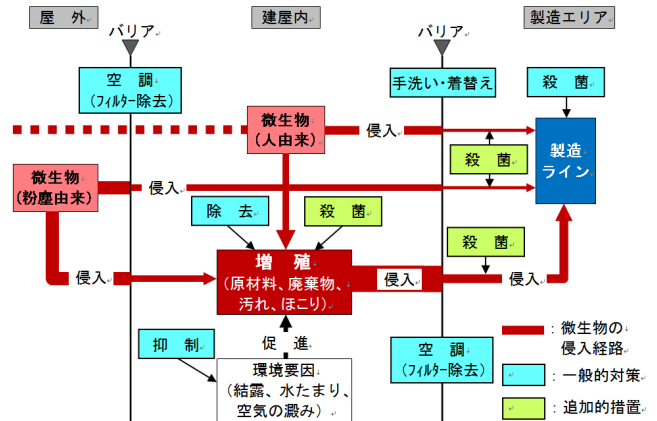


Fig. 1 製造工場での想定されるリスクと対策について
The Countermeasures and the Risks Assumed in Manufacturing Environment

Table 2 DNA解析による微生物同定法
Identification of Microbes Using DNA Analysis

	細菌	真菌・酵母
DNA抽出方法	PrepMan Ultra Reagent(Applied Biosystems)による抽出	ビーズビーターによる物理破碎 (φ 0.5mm ビーズ1g+ TE Buffer 0.7ml+カビ菌体、Bead Beaterで4000rpm・20秒処理) 後、加熱抽出 (100℃・10分)
同定に使用する遺伝子領域	16SrDNAの可変領域の一部 (前方600~700塩基)	18SrDNAと5.8SrDNA間のスペーサー領域 (ITS領域約500塩基)
分析の流れ	培養菌体よりDNA抽出・精製後、解析対象の遺伝子領域をPCR反応により増幅後、DNA解析装置で塩基配列を自動解析し、データベースと照合することで同定する	

Table 1 製造環境、室内環境の主要微生物の発生源と特徴
The Source of the Main Microbes and Characterization in Manufacturing Environment or Indoor Environment

発生源	特徴	増殖最適温度	主な菌の種類		
細菌	水系	低温 (20~30℃)	<i>Pseudomonas</i> (緑膿菌)		
			<i>Acinetobacter</i>		
			<i>Moraxella</i>		
			<i>Flavobacterium</i> (黄色色素)		
			<i>Chromobacterium</i> (赤色色素)		
			<i>Alcaligenes</i> (アルカリ産生)		
	土壌	低温 (20~30℃)	<i>Aeromonas</i>		
			<i>Vibrio</i> (腸炎ビブリオ、コレラ菌)		
			<i>Nocardia</i>		
			<i>Mycobacterium</i> (結核菌)		
			<i>Cytophaga</i> (黄色色素)		
			<i>Streptomyces</i> (放線菌)		
真菌・酵母	乾燥した環境	低温~高温 (20~60℃)	<i>Bacillus</i> (芽胞形成、炭そ菌、セレウス菌)		
			<i>Staphylococcus</i> (体表に常在、黄色ブドウ球菌)		
			<i>Micrococcus</i> (体表に常在)		
			<i>Streptococcus</i> (溶血性連鎖球菌)		
			湿気の高い環境	低温~高温 (20~60℃)	<i>Clostridium</i> (芽胞を形成、破傷風菌、ボツリヌス菌、ウェルシュ菌)
					<i>Bacteroides</i>
	乾燥した環境	中温 (20~35℃)			<i>Cladosporium</i> (クロカビ)
					<i>Aureobasidium</i> (黒色酵母様菌)
					<i>Trichoderma</i> (ツチアオカビ)
					<i>Alternaria</i> (ススカビ)
			<i>Fusarium</i> (アカカビ)		
			<i>Rhodotorula</i> (赤色酵母)		
乾燥した環境	中温~高温 (20~50℃)	<i>Aspergillus</i> (コウジカビ、日和見真菌症)			
		<i>Penicillium</i> (アオカビ)			
		<i>Eurotium</i> (カワキコウジカビ)			
		<i>Wallemia</i> (アズキイロカビ)			
		湿気の高い環境	中温 (20~35℃)	<i>Cryptococcus</i> (酵母、日和見感染症)	

微生物制御実用事典、フジテクノシステム (1994) ¹⁾を一部改変

び真菌)の同定方法として、遺伝子解析法による手法が示されており²⁾、環境微生物の同定にDNA解析が適用されるケースが増えてきている。筆者らのDNA解析による微生物同定手法の概要をTable 2³⁾に示す。本手法を用いることにより、従来法に比べて、迅速で、客観的、詳細かつ正確に評価することが可能である。

2.3 DNA解析による微生物リスク診断の適用事例

2.3.1 概要 稼働開始から数年経過した某化粧品工場において、衛生管理の現状把握及び、衛生状態の改善提案を行うことを目的として、環境微生物調査、DNA解析による微生物リスク評価を実施した。また、製造ラインで微量の菌が発生していたため、その原因調査及び菌を抑制する為の改善案の提案も併せて実施した。

工場内は、製造工程にもとづいて、Table 3に示すように、3つのエリアに区分けされ、管理されている。

調査は、施設内の各場所において、微粒子濃度、浮遊微生物数、付着微生物数、落下微生物数の測定 (Table 4) を実施するとともに、寒天培地上に生育した微生物を遺伝子解析により同定した。

2.3.2 結果 Fig. 2に、浮遊微生物数、微粒子濃度の測定結果を示す。クリーンルームと陽圧エリアにおいて、浮遊微生物数は日本建築学会の管理規準値100cfu/m³ (AIJES-A0002-2013)⁴⁾を下回っており、微粒子濃度も清浄度クラス10万 (0.5μm以上の粒子数が3,530,000個/m³以下) を満足していた。

浮遊真菌・酵母数は、屋外で高く、倉庫、陽圧エリア、クリーンルームと、作業区域の清浄度が上がるにつれて減少していることが確認された。

浮遊細菌数は、屋外では少なく、原料開梱室、通路、二次更衣室などで120~230cfu/m³と他の測定場所に比べて高い傾向を示したが、クリーンルームでは、20cfu/m³未満であった。

Table 3 各エリアにおける衛生管理状態
Sanitary Supervision of the Each Areas

作業区域	場所	管理方法
クリーンルーム (クラス10万)	製造室、充填室、秤量室、清浄廊下など	陽圧管理+夜間紫外線照射
陽圧エリア	包装室	陽圧管理
一般エリア	倉庫(原料、資材、製品)、開梱室(原料、容器)、更衣室など	一部シートシャッターによる防塵・防虫管理

Table 4 調査内容および方法
Survey Contents and Methods

調査内容	サンプリング法	使用培地・培養方法
微粒子濃度	ハンドヘルド型パーティクルカウンターによる	-
浮遊微生物数	1段多孔型方式による衝突法	<細菌> ソイビーンカゼイン 寒天培地を用い、 32℃で2日間培養
付着微生物数	コンタクト平板を用いたスタンプ法	<真菌・酵母> クロラムフェニコール添 加ポテトデキストロース
落下微生物数	寒天培地30分開放による (クリーンルームのみ)	寒天培地を用い、 25℃で5日間培養

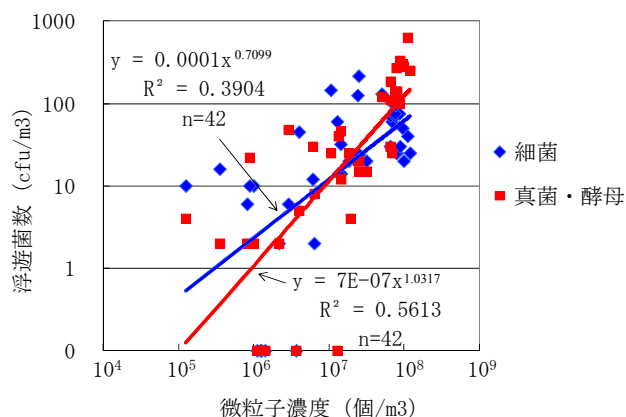


Fig. 3 浮遊微生物数と微粒子濃度の関係
The Number of Airborne Microbes and Particle Concentration

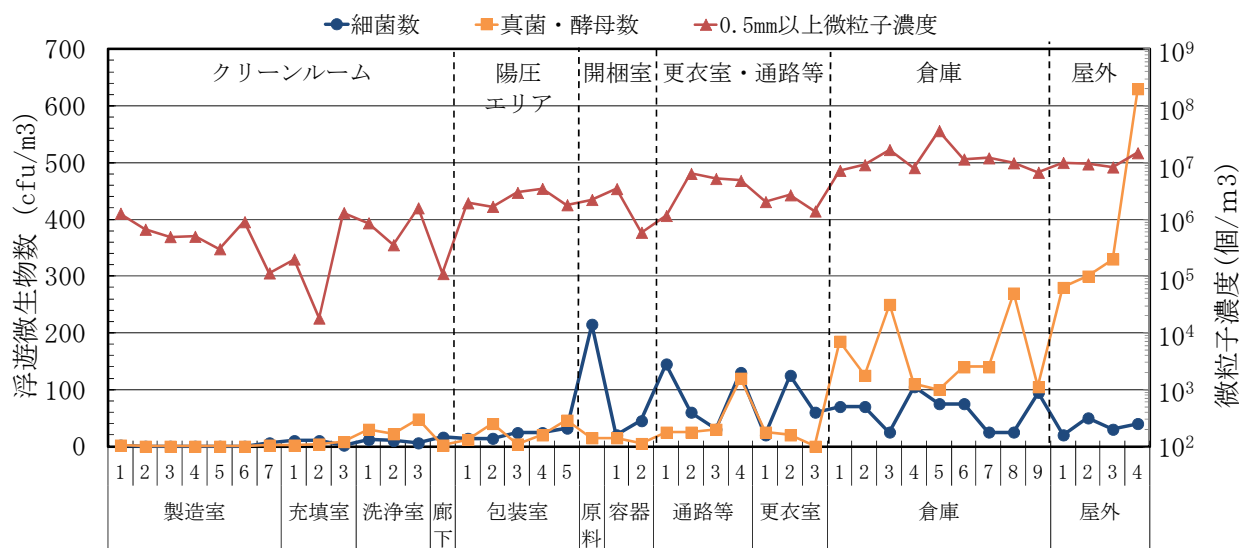


Fig. 2 浮遊微生物数、微粒子濃度の結果
The Number of Airborne Microbes and Particle Concentration

Table 5 浮遊微生物, 付着微生物のサンプリングで検出された細菌の種類と検出率
Detection Ratio and Bacterial Species of the Airborne Microbes

項目	エリア	場所	分類 (推定される発生源)	検出率	検出された菌種名
浮遊菌	クリーンルーム	製造室	人	100%	<i>Micrococcus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp.
		洗浄室	空中	35%	<i>Bacillus</i> sp., <i>Paenibacillus</i> sp.
	人		64%	<i>Micrococcus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp.	
	陽圧エリア	包装室	水系	4%	<i>Moraxella</i> sp.
			空中	22%	<i>Bacillus</i> sp., <i>Paenibacillus</i> sp.
			人	75%	<i>Corynebacterium</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp.
	一般エリア	原料開梱室	人	100%	<i>Micrococcus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp.
		更衣室	水系	31%	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Moraxella</i> sp.
			空中	16%	<i>Aneurinibacillus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Paenibacillus</i> sp.
			人	50%	<i>Micrococcus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp.
	屋外	屋外	不明	4%	<i>Rothia</i> sp.
			水系	10%	<i>Moraxella</i> sp.
空中			40%	<i>Bacillus</i> sp.	
付着菌	クリーンルーム	洗浄室排水溝	人	50%	<i>Micrococcus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp.
			水系	60%	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Stenotrophomonas</i> sp.
			空中	20%	<i>Brevundimonas</i> sp.
	一般エリア	原料開梱室	人	20%	<i>Micrococcus</i> sp.
			空中	88%	<i>Aneurinibacillus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Paenibacillus</i> sp.
			人	12%	<i>Micrococcus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp.

Table 6 浮遊微生物, 付着微生物のサンプリングで検出された真菌・酵母の種類と検出率
Detection Ratio and Fungal Species of the Airborne Microbes

項目	エリア	場所	分類 (推定される発生源)	検出率	検出された菌種名	
浮遊菌	クリーンルーム	製造室	高湿性	100%	<i>Cladosporium</i> sp.	
			洗浄室	高湿性	46%	<i>Alternaria</i> sp., <i>Arthrimum</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Epicoccum</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.
				耐乾性	29%	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.
				キノコ類	17%	<i>Ceriporia</i> sp., <i>Lachnum</i> sp., <i>Basidiomycota</i> sp.
	陽圧エリア	包装室	その他	12%	<i>Leptosphaeria</i> sp., <i>Myrmecridium</i> sp.	
			高湿性	25%	<i>Acremonium</i> sp., <i>Aureobasidium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Epicoccum</i> sp.	
			耐乾性	61%	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	
			キノコ類	6%	<i>Ceriporia</i> sp.	
			酵母	3%	<i>Cryptococcus</i> sp.	
	一般エリア	原料開梱室	その他	3%	<i>Botryotinia</i> sp.	
			高湿性	20%	<i>Arthrimum</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp.	
			耐乾性	40%	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	
			キノコ類	10%	<i>Irpex</i> sp.	
		更衣室	高湿性	13%	<i>Epicoccum</i> sp.	
			耐乾性	50%	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	
			酵母	13%	<i>Cryptococcus</i> sp.	
			その他	26%	<i>Myrmecridium</i> sp.,	
	屋外	屋外	高湿性	79%	<i>Alternaria</i> sp., <i>Arthrimum</i> sp., <i>Aureobasidium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Epicoccum</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	
			耐乾性	3%	<i>Penicillium</i> sp.	
			キノコ類	11%	<i>Ceriporia</i> sp., <i>Irpex</i> sp., <i>Lachnum</i> sp.	
その他			6%	<i>Myrmecridium</i> sp.		
付着菌	クリーンルーム	洗浄室排水溝	高湿性	100%	<i>Fusarium</i> sp.	
	一般エリア	原料開梱室	高湿性	28%	<i>Alternaria</i> sp., <i>Aureobasidium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	
			耐乾性	7%	<i>Aspergillus</i> sp.	
			酵母	64%	<i>Candida</i> sp., <i>Rhodotorula</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp.	

Fig. 3に浮遊菌数と微粒子濃度の関係を示す。

これより、浮遊真菌・酵母数の方が、浮遊細菌数よりも微粒子濃度に対して高い相関性を示した。すなわち、浮遊粉塵の除去は真菌・酵母の低減に効果があることが示された。

次に、同定結果の一部をTable 5, Table 6に示す。

表中の値は、各測定場所で検出された全微生物に対する、ある特定の微生物の割合である。細菌では、全体的に人由来の*Staphylococcus sp.*や、*Micrococcus sp.*の検出される割合が非常に高かった。特にクリーンルームの浮遊菌では、*Staphylococcus sp.*の占める割合が高かったことから、着衣や手洗いなど人の衛生管理が重要であることが明らかとなった。空中（粉塵）由来の*Bacillus sp.*や*PaeniBacillus sp.*はクリーンエリアでの検出割合は35%と低く、空調管理により除去されていると考えられた。これら粉塵由来の細菌は、原料開梱室の付着菌において検出割合が高かった。原料開梱室では、原料に粉塵由来の微生物が付着・混入する可能性があり、原料開梱室で微生物が増殖しないように、清掃などの衛生管理が重要と考えられた。

クリーンルーム洗浄室の排水溝では、付着細菌数が608cfu/25cm²と高く、*Pseudomonas sp.*や*Stenotrophomonas sp.*など湿潤環境で生育する細菌が検出された。細菌の汚染源になりやすい場所と考えられ、定期的な乾燥や殺菌等が有効であると考えられた。

今回、病原性菌は、クリーンルーム廊下において、食中毒菌の1種である黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）がごくわずかに検出された。本菌は、人の皮膚に存在するため、クリーンルームでも頻りに検出される菌である。これより、人由来の微生物対策の重要性が再確認された。

真菌・酵母では、全体的に、真菌*Cladosporium sp.* *Epicoccum sp.* *Aspergillus sp.* *Penicillium sp.*や、酵母*Rhodotorula sp.*など、屋内環境で一般的に確認される真菌の検出割合が高かった。特に、クリーンルームの洗浄室では、浮遊真菌数が製造室や充填室に比べてやや高い値を示し、*Cladosporium sp.*や*Penicillium sp.*以外に、*Alternaria sp.*や*Fusarium sp.*など高湿性の真菌が数種検出された。

クリーンルームの中では洗浄室が微生物の汚染源になるとともに、除菌や殺菌など積極的な対策が望ましいと考えられた。

更に、製造ラインで発生していた菌は、DNA解析の結果、*Burkholderia sp.*であり、今回の環境微生物調査では検出されなかった。おそらく、かつて工場内に侵入した菌が製造ラインに混入し増殖したと考えられる。本菌のような土壌に常在する高度薬剤耐性菌は、熱湯洗浄では殺菌できずに長期間生残する可能性がある。長期間生残した菌が、増殖に適した環境に侵入することで、多量に増殖することがありうるため、紫外線殺菌や、次亜塩素酸等による薬剤殺菌など、確実な殺菌が必要である。

2.3.3 改善提案 以上の結果をもとに、某化粧品工場における衛生管理の改善提案の一部を列挙する。

- 1) 浮遊細菌の発生源は人であるため、クリーンルームの浮遊細菌の低減には、着衣（防護服、手袋、マスク）や手洗いなど人の衛生管理を徹底する。
- 2) クリーンルームの洗浄室および、洗浄室排水溝は、微生物の汚染源になりやすい場所である。微生物が増殖しないよう、清掃・乾燥、積極的な除菌・殺菌が望ましい。
- 3) 原料開梱室は、原料に微生物が付着・混入しやすい場所である。微生物の付着・混入防止、原料開梱室での微生物の増殖防止のために、清掃などの衛生管理に注力する。
- 4) 製造ラインで発生していた菌は、高度薬剤耐性菌であり、熱湯洗浄では殺菌できない。紫外線殺菌や、次亜塩素酸等による薬剤殺菌など確実な殺菌が必要である。

3. 微生物制御技術

3.1 製造環境における微生物制御について

施設環境、特に製造環境における微生物制御は、①施設外部から施設内部への有害微生物の侵入・汚染防止対策（遮断）、②施設内における有害微生物の増殖防止対策（静菌）、③施設内における有害微生物の除去および殺滅（除菌、殺菌）の3つに大別できる。

それぞれの対策について、製造施設で適用される一般的な制御技術をTable 7に示す。

実際の製造施設において、これら①～③の対策をすべて完璧に実施するのは困難であり、各製造施設に求められる衛生管理水準に応じて、更には、微生物リスク評価から得られた情報をもとに、微生物汚染リスクの高い場

Table 7 製造施設における微生物制御技術
Microbiological Management Technologies in the Manufacturing Environments

分類	方法	具体的な制御技術（ハード対策を主として）
①施設外部から施設内部への有害微生物の侵入・汚染防止対策	遮断	<ul style="list-style-type: none"> ・ゾーニング ・汚染防止にもとづく人と物の動線計画 ・クリーンルーム ・エアシャワー、エアカーテン ・空調（フィルター処理、エリア間の差圧管理、一方向気流） ・装置間の交差汚染防止対策 ・十分な作業スペースの確保 ・手洗い、着衣（マスク、防護服、手袋）による
	静菌	<ul style="list-style-type: none"> ・低温・低湿管理 ・内装計画（特に床面の防水・乾燥仕様、撥水仕様、易洗浄仕様、結露防止） ・設備・機器の易洗浄仕様、易清掃仕様、ホコリの集積防止仕様 ・防菌・防カビコーティング ・蒸気発生源の局所換気 ・排水対策（排水系統の区分、易清掃仕様、水溜まり対策）
③施設内における有害微生物の除去および殺滅	除菌	<ul style="list-style-type: none"> ・洗浄 ・粘着マット、消毒マット
	殺菌	<ul style="list-style-type: none"> ・薬剤殺菌（液体、ミスト、ガスによる殺菌） ・紫外線殺菌

所に効果的な対策を実施することが重要である。

3.2 紫外線殺菌技術の評価

3.2.1 目的 前章で述べた製造工場で適用される微生物対策の中から、③施設内における有害微生物の除去および殺滅を行うための技術として、導入コストが安く、殺菌原理が明らかになっている紫外線殺菌について、殺菌効果に関するデータを取得することとした。

3.2.2 紫外線殺菌技術の特徴 紫外線殺菌は、薬品による殺菌とは異なり、薬品が残存せず、耐熱性、耐薬品性の菌やウイルス等種類を問わず殺菌できる。また、薬剤による殺菌方法に比べて、被照射物への影響が小さいため、食品工場や幅広い分野で適用されている。

紫外線の殺菌効果は、微生物に照射される紫外線の強さ（紫外線照度）と照射時間で評価できる。紫外線ランプからの距離が離れるほど、照度は小さくなるため、殺菌時間も長くなる。

紫外線の殺菌原理については、紫外線照射により細胞内のDNA鎖構造が変化（チミン二量体の生成）することで、DNAが複製されず死滅に至るとされている。従って、細胞の構造により、DNAに作用する紫外線量が変化するため、微生物の種類によって殺菌効果が異なることになる。これまでに、代表的な微生物について、培地上で99.9%殺菌するのに必要な紫外線照射量が実験的に求められ、明らかにされている¹⁾が、試験条件によってその値は異なると考えられる。紫外線照度の違いによる殺菌効果、特に、ごく低照度における殺菌効果を評価し、データを取得することは、紫外線殺菌の合理的な設計を行う上で必要である。

3.2.3 実験概要 今回、実験評価した微生物は、屋内環境で頻繁に確認され、衛生管理上問題となる主要な細菌10種類（うち2種類は芽胞）、真菌4種類、酵母1種類であり、その詳細をTable 8に示した。

紫外線照射試験は、紫外線ランプが設置された安全キャビネット内で行った。紫外線ランプからの距離と紫外線放射照度の関係はFig. 4⁵⁾に示す通りで、距離が離れるほど照度は小さくなる。今回、照度として、①140もしくは170 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ （紫外線ランプから約55~60cm）、②30 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ （紫外線ランプから約100cm）③8 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ （紫外線ランプから約250cm）の3水準で試験を行った（一部の微生物は③の試験を実施せず）。③の8 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ は、ポリプロピレン製容器を用い、ポリプロピレンを通して紫外線を照射させることで、照射強度を低下させて実験した。Table 7に示した微生物を一定期間培養後、集菌し生理食塩水に懸濁させ、プレートあたり $10^4\sim 10^6\text{cfu}$ となるようにスプレッダーを用いて均等に塗布し、一定時間紫外線を照射した。紫外線照射後、細菌は32 $^{\circ}\text{C}$ のインキュベーターで2日間、真菌・酵母は25 $^{\circ}\text{C}$ のインキュベーターで5日間培養し、菌数（コロニー数）を測定した。

紫外線を照射しないものをコントロールサンプルとし、コントロールサンプルで計測されたコロニー数と紫外線

Table 8 実験に供した微生物
Microbes for Tests

No	種類	菌種	BSL*	病原性など特徴	主な発生源
1	細菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	ヒトの常在菌で、食中毒の原因菌。MRSAは院内感染の原因菌。	人
2		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	人の常在菌。環境中で高頻度検出。	人
3		<i>Micrococcus luteus</i>	-	人の常在菌で、人の集まる環境で高頻度に検出される。	人
4		<i>Escherichia coli</i>	2	人および動物の腸管内の常在菌。一部は食中毒の原因菌。	動物・人
5		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	水系、土壌など環境中に広く分布する。院内感染の原因菌。	水系・土壌
6		<i>Salmonella enterica</i>	2	腸内細菌科の一つで、動物の腸管に広く分布。食中毒の原因菌。	動物・人
7		<i>Bacillus subtilis</i>	-	環境中に広く分布する。芽胞を形成するため、耐熱性があり、乾燥に強い。	空中・土壌
8		<i>Bacillus subtilis</i> (spores)	-	枯草菌の芽胞。アルコール系消毒薬に耐性を示す。	
9		<i>Bacillus cereus</i>	2	食品の腐敗菌で、食中毒の原因菌である。芽胞を形成するため、耐熱性があり、乾燥に強い。	空中・土壌
10		<i>Bacillus cereus</i> (spores)	2	セレウス菌の芽胞。アルコール系消毒薬に耐性を示す。	
11	真菌	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	高湿性カビで、室内環境や空調内部で高頻度に確認される。	空中・ハウスダスト
12		<i>Aspergillus niger</i>	-	耐乾性カビ。同属には、病原性菌が含まれる。	空中・ハウスダスト
13		<i>Penicillium citrinum</i>	-	耐乾性カビで、室内環境や空調内部で高頻度に確認される。	空中・ハウスダスト
14		<i>Rhizopus oryzae</i>	-	高湿性カビで、多量の胞子を産生する。	空中・ハウスダスト
15	酵母	<i>Candida albicans</i>	2	ヒトの皮膚・粘膜、消化管に分布。院内感染の原因菌。	人

*BSL(バイオセーフティーレベル)とは、細菌・ウイルスなどの病原体を生物学的な危険度で分類した指標であり、BSL1~4の4段階に分類される。値が大きいくほど危険度が高い。

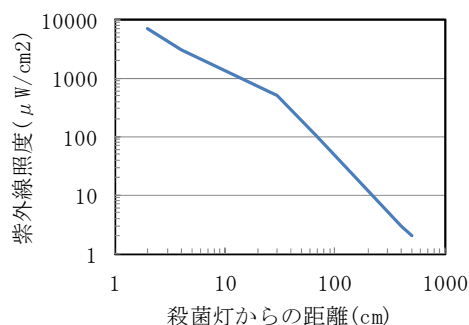


Fig. 4 紫外線ランプからの距離と照度の関係
The Relation between Distance from the Ultraviolet Ray Lamp and UV Intensity

照射後に生育したコロニー数との比率で生存率を求め、微生物毎に殺菌に必要な紫外線照射量を求めた。照射時間は5~7段階、試験は3連で実施した。

3.2.4 結果 照度の違いによる紫外線照射量（紫外線照度×照射時間）と生存菌数の関係について、代表的な

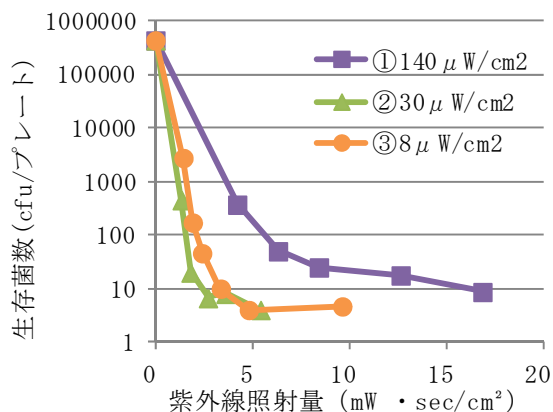


Fig. 5 黄色ブドウ球菌試験結果
The Result of Examination; *Staphylococcus aureus*

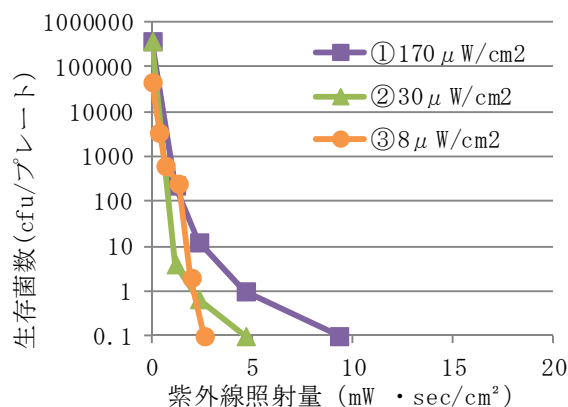


Fig. 6 緑膿菌試験結果
The Result of Examination; *Pseudomonas aeruginosa*

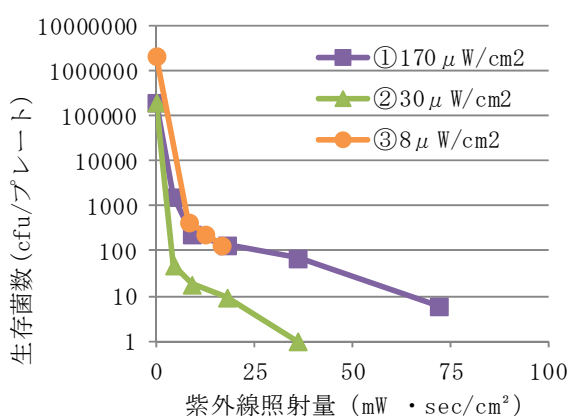


Fig. 7 セレウス菌芽胞試験結果
The Result of Examination; *Bacillus cereus* (spores)

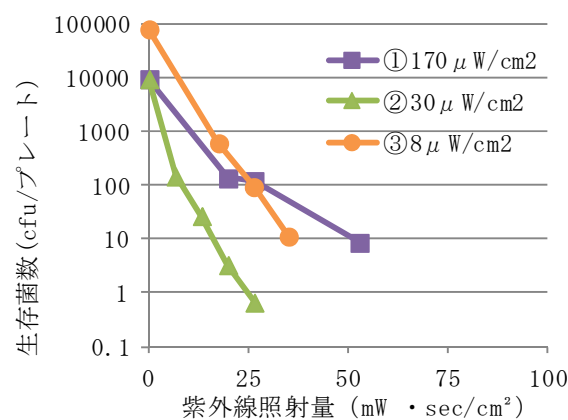


Fig. 8 コウジカビ試験結果
The Result of Examination; *Aspergillus niger*

試験結果をFig. 5～8に示した。Fig. 5は黄色ブドウ球菌、Fig. 6は緑膿菌の試験結果、Fig. 7はセレウス菌の芽胞、Fig. 8はコウジカビの試験結果である。

Fig. 5～8より、試験したすべての紫外線照度において、紫外線照射量が大きくなるにつれて、菌数は対数的に減少した。一部の試験結果は、対数的に減少したのち減少が緩やかな曲線となった。また、照度が8μW/cm²とごく低照度であっても、紫外線照射により、微生物が殺菌されることが明らかとなった。直線部分の勾配は、照度で比較すると、細菌、細菌芽胞、真菌のすべてにおいて、紫外線ランプからの距離が約55～60cmと最も近い場所の照度(140もしくは170μW/cm²)よりも、紫外線ランプからの距離が約100cmと少し離れた場所の照度(30μW/cm²)の方が大きい傾向を示した。また、照度が8μW/cm²とごく低照度の場合、細菌では、30μW/cm²に近い勾配を示し、細菌芽胞、真菌では、30μW/cm²の勾配よりも緩やかになった。

上記結果から、微生物殺菌に必要な紫外線照射量は、紫外線の照度条件によって異なることを示しており、必ずしも、紫外線ランプからの距離が近い方が、殺菌効果

が大きいとは言えない結果となった。

次に、試験結果より得られた直線部分の勾配から、各微生物を99.9%殺菌するのに必要な紫外線照射量をTable 9に示した。なお、文献値¹⁾も参考に併記した。

Table 9の紫外線照射量より、各菌を99.9%殺菌するのに必要な照射時間を算出したところ、芽胞以外の細菌では、照度が8～170μW/cm²において8分以内であることが明らかとなった。また、細菌芽胞は栄養細胞に比べて紫外線への耐性がやや強くなり、照度が8μW/cm²の場合36分かかかるが、30～170μW/cm²であれば、6分以内で殺菌できることがわかった。

真菌は、細菌芽胞よりもさらに紫外線への耐性が強くなるが、照度が30～170μW/cm²であれば、アオカビ、コウジカビ、リゾープスは10分以内に、クロカビは21分で殺菌できることがわかった。今回得られた実験値より算出した殺菌時間は、文献値より算出した時間よりもかなり短縮できることが明らかとなった。

今回得られたデータを活用することで、紫外線殺菌灯の設置場所や本数、照射時間の合理的な設計が可能になると考える。

4. まとめ

医薬・食品工場、病院・高齢者施設における病原性菌等の微生物汚染リスクを、DNA 解析手法を用いて診断する技術を開発するとともに、製造施設への導入事例が多い紫外線殺菌について、主要微生物の照度の違いによる殺菌効果を評価したところ、以下の知見が得られた。

- 1) 従来の微生物数の把握に加えて、DNA 解析による微生物種の同定技術を活用することにより、微生物の汚染侵入経路の把握、微生物の増殖の可能性やその要因を把握することが可能となった。
- 2) 製造施設における実態調査により、浮遊細菌の主な発生源は人であり、クリーンルームの浮遊細菌の低減には、着衣などの人の衛生管理が重要であることが明らかとなった。
- 3) クリーンルームの洗浄室は微生物の汚染源になりやすいため、清掃・乾燥、積極的な除菌・殺菌が望ましい。原料開梱室では、原料に微生物の付着・混入を防ぐために、清掃などの衛生管理が重要である。
- 4) 紫外線殺菌について、芽胞以外の細菌では、殺菌灯から離れたごく低照度の場所においても、殺菌効果が認められた。芽胞や真菌は、細菌よりも紫外線への耐性が強くなるが、照度が 30~170 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ であれば、短時間で殺菌できた。

参考文献

- 1) 石井泰造，他：微生物制御実用事典，フジテクノシステム出版，p33，377，(1994)
- 2) 厚生労働省告示第 65 号：遺伝子解析による微生物の迅速同定法，第十六改正日本薬局方，p2029~2031,(2011)
- 3) 四本瑞世，他：DNA 塩基配列解析法を利用した室内微生物の同定，日本建築学会大会学術講演梗概集，p833~834,(2010)

- 4) 日本建築学会：微生物による室内空気汚染に関する設計・維持管理規準・同解説 AIJES-A0002-2013，p5，(2013)
- 5) 古海浩：光殺菌ランプによる無菌化殺菌方式について，New Food Industry, Vol.25,No.9,p16，(1983)

Table 9 各微生物を殺菌するのに必要な紫外線照射量
Ultraviolet Irradiation Amount and Irradiation Time for Each
Microbes Sterilization Acquired through Experiments

No.	種類	菌種	本実験結果		文献値
			紫外線 照度 ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)	培地上の菌を 99.9%殺菌するの に必要な照射量 ($\text{mW} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$)	培地上の菌を 99.9%殺菌するの に必要な照射量 ($\text{mW} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$)
1	細菌	<i>Staphylococcus aureus</i> 黄色ブドウ球菌	①140	5.2	9.3
			②30	1.5	
			③8	2.3	
2	細菌	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 表皮ブドウ球菌	①140	2.9	9.1
			②30	0.8	
			③8		
3	細菌	<i>Micrococcus luteus</i> マイクロコッカス	①140	10.6	データなし
			②30	4.6	
			③8		
4	細菌	<i>Escherichia coli</i> 大腸菌	①170	6.3	5.4
			②30	1.7	
			③8	1.5	
5	細菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 緑膿菌	①170	2.2	10.5
			②30	1.3	
			③8	1.4	
6	細菌	<i>Salmonella enterica</i> サルモネラ菌	①170	3.5	15.2
			②30	1.3	
			③8	1.5	
7	細菌	<i>Bacillus subtilis</i> 枯草菌	①170	10.7	21.6
			②30	3.0	
			③8	2.9	
8	細菌	<i>Bacillus subtilis</i> (spores) 枯草菌(芽胞)	①170	35.0	33.3
			②30	9.3	
			③8		
9	細菌	<i>Bacillus cereus</i> セレウス菌	①170	9.8	データなし
			②30	2.4	
			③8	3.5	
10	細菌	<i>Bacillus cereus</i> (spores) セレウス菌(芽胞)	①170	15.1	データなし
			②30	8.3	
			③8	16.9	
11	真菌	<i>Cladosporium cladosporioides</i> クロカビ	①170	76.7	データなし
			②30	37.8	
			③8	63.0	
12	真菌	<i>Aspergillus niger</i> コウジカビ	①170	46.9	264.0
			②30	17.5	
			③8	26.7	
13	真菌	<i>Penicillium citrinum</i> アオカビ	①170	43.0	22.2
			②30	14.7	
			③8	21.8	
14	真菌	<i>Rhizopus oryzae</i> リゾープス	①170	44.4	222.0
			②30	14.5	
			③8		
15	酵母	<i>Candida albicans</i> カンジダ	①170	21.6	データなし
			②30	6.1	
			③8	5.8	