

下水処理水中病原微生物による健康影響評価 および微生物学的安全性確保に向けた要求処理能の推定

(研究助成金 50万円)

代表研究者 京都大学大学院 工学研究科

浅田 安廣

I はじめに

近年日本で確認されている水系感染症事例では、病原大腸菌、*Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), ノロウイルスなどがあり、この原因として水源の汚染、塩素消毒の不備が主として挙げられる¹⁾。水源の汚染としては、動物由来の糞便、下水処理施設からの放流水などが考えられる。特に下水処理施設からの放流水は河川に合流した後、下流部で水道原水となる流域が存在する。このような流域では、下水処理施設からの放流水が病原微生物の主たる汚染源となる。

下水処理施設へは高濃度の病原微生物が放流されており、これは多くの人々が病原体を曝露し、感染(発症、不顕性感染を含む)しているためである。様々な病原微生物による感染性胃腸炎が確認されていることから、下水中には多くの病原微生物が存在すると予想できるものの、その実態は明らかとなっていない。そして、温暖化、ゲリラ豪雨等の環境変化、震災の影響で下水処理施設から放流される未処理越流水が生じ、水道水源の病原微生物による水質汚染が懸念される。将来的にこのような状況も想定し、上下水道を含めた統合的流域管理を行っていく上で、その上流部となる下水処理施設での病原微生物濃度把握は、下流部での浄水処理において重要な情報となる。

そこで本研究では、下水処理過程における病原微生物濃度測定を実施し、濃度変動の把握を行うこととする。ここで対象とする処理水は、最初沈殿処理水、標準活性汚泥(Activated Sludge: AS)後の最終沈殿処理水、嫌気-無酸素-好気法(Anaerobic-Anoxic-Oxic: A2O)後の最終沈殿処理水とし、病原微生物は食中毒事例が多い、下水処理水中で検出されている病原微生物として *C. jejuni*, ノロウイルス(G I型, G II型)をとりあげる。そして、各下水処理ステップで得られたデータを用いて、健

康影響に基づいてリスク評価を行い、各処理ステップ後に微生物学的に安全な水を確保するために必要な浄水処理への要求処理能を推定する。

II 方 法

1. 下水処理水中の病原微生物定量

本研究では A 下水処理場における最初沈殿処理水 (FS 水)、AS 後の最終沈殿処理水 (AS 水)、A2O 後の最終沈殿処理水 (A2O 水) を測定対象とした。

1.1. *C. jejuni* 定量方法

C. jejuni 定量方法として、realtimePCR, EMA-PCR による定量を試みた。EMA-PCR とは、膜損傷を強く受けた微生物に対して EMA (ethidium monoazide) が損傷部位から透過し、DNA に修飾することで PCR 増幅できない状態となることを利用して、膜損傷を強く受けていない生存している微生物由来の DNA を選択的に検出する方法である。本研究では、この原理と real-time-PCR を用いて *C. jejuni* の生菌数の定量を試みた。また *C. jejuni* の生菌数が少ない場合を想定し、低い濃度が予想される AS 水、A2O 水については、二段階増菌培養と MPN-PCR 法を組み合わせた定量方法も試みた。MPN-PCR 法は、PCR により *C. jejuni* に特異的な DNA 配列を増幅することで、感度良く試料水中の *C. jejuni* を定性的に検出し、MPN 法を用いた統計的な方法で定量する方法である。二段階増菌培養は、損傷菌の回復ステップとしてボルトン培養、夾雑細菌抑制および *C. jejuni* 増菌ステップとしてプレストン培養を組み合わせた培養方法である。この方法により、対象試料中の夾雑細菌を抑制しつつ、*C. jejuni* を PCR 検出可能レベルまで増菌させることが可能である。実験手順を以下に示す。

EMA-qPCR

試料水を採取後、4℃に保冷した状態で実験室まで運搬し、測定は原則3日以内に行った。次に各試料の濃縮を行った。EMA 処理では夾雑物が試料中に多く存在する場合、EMA の修飾効果が低下する危険性がある。100mL の濃縮を実施した場合に夾雑物の影響を強く受けてしまうことから、濃縮する試料量として10mL と設定した。各試料 10mL を10000g で10分間遠心分離した後、上澄み液を取り除き、1mL の PBS (pH7.2) 再懸濁した。再度 10000g で10分間遠心分離した後、上澄み液を取り除き、0.1mL の PBS (pH7.4) 再懸濁した。濃縮試料 40 μ L を EMA 処理試料、40 μ L を EMA 未処理試料として実験に供した。

続いて、EMA 処理については、Viable Campylobacter Selection Kit for PCR (タカラバイオ) を用いて説明書に従って処理を実施した。その後、EMA 処理試料、EMA 未処理試料ともに DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出を行い、200 μ L の DNA 溶液を得た。

Realtime-PCR に関しては、Ivanova ら (2014) の方法²⁾に従った。以下に簡単な手順を示す。検出対象遺伝子領域は、*hipO* 遺伝子領域の一部 (131bp) とした。SYBR Fast qPCR Mix (タカラバイオ) を用いて、PCR 反応液を作製した。この時、プライマー濃度は200nM となるように調製をした。StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて、*C. jejuni* の定量を行った。PCR サイクル条件としては初期変性が95°Cで90秒とし、95°C・15秒間の熱変性と 58°C・15秒間のアニーリング、72°C・15秒間の伸長反応を1サイクルとして計40サイクルとした。最後のステップで、melting curve analysis を55°C~95°Cの範囲で0.5°Cずつ各20秒の反応条件で実施した。

MPN-PCR

試料水を採取後、4°Cに保冷した状態で実験室まで運搬し、測定は原則3日以内に行った。検水の接種量は下水処理水で100mL、10mL、1mL、0.1mLの4段階の内、適切と判断した3段階を設定した。

次に、*C. jejuni* の増菌培養手順を示す。検水量が10mL以上であれば、サンプルを孔径0.2μmのメンブレンフィルター (ADVANTEC, C020G047A) を用いて、吸引ろ過により試料中の細菌を無菌的にフィルター上に捕集した後、すぐにフィルターを増菌培養液 (ポルトン培地) 10mLに浸し、微好気培養を行った。一方検水量が1mLの場合は直接10mL培養液に、0.1mLの場合はオートクレーブ滅菌したPBS (pH7.2) でサンプルを10倍希釈し、希釈液1mLを直接10mL培養液に添加し、微好気培養を行った。微好気培養では、それぞれ37°Cで24時間培養を行った。その後、培養液を1mL採取し、プレストン培地10mLに播種し、42°Cで24時間微好気培養した。

続いてDNA抽出およびPCRの実験手順を示す。2日間増菌培養した培養液1mLを採取し、洗菌操作を2回行い、回収した菌体からDNeasy Blood & Tissue Kit® (QIAGEN) を用いて、DNAを抽出した。そしてDNA抽出液を鋳型DNAとし、PCR反応液を作製した。PCR反応液は、TAKARA Ex Taq (タカラバイオ) と *C. jejuni* に特異的な2種類プライマー³⁾を160nMになるように調製して作製した。PCRはサーマルサイクラー (TAKARA PCR Thermal Cycler Dice®, タカラバイオ) を用いて、95°Cで5分間の鋳型DNA変性の後、95°Cで40秒の変性、59°Cで1分のアニーリング、72°Cで1分の伸長ステップを35サイクル行い、最後に72°Cで10分間の伸長ステップを追加した。その後、1.5%アガロースゲル電気泳動により増幅断片を分離し、電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドで染色後、Gel Doc™XR+システム (BIO-RAD) によりUV照射を行い、標的とする589bpの増幅断片が確認できたサンプルを *C. jejuni* 陽性と判断した。最後に、各検水量に対する陽性数から、MPN法に従い最確数を決定した。ここで、EMA-qPCRならびにMPN-PCRに用いたプライマー情報を表1にまとめる。

表1 プライマー情報 (*C. jejuni*)

PCR target gene		Sequence(5' to 3')	Amplicon size, bp	Referene
EMA-qPCR				
<i>Campylobacter jejuni</i> <i>hipO</i>	Forward	GTGGTCATGGAAGTGCTCCAGAAA	131	Ivanova <i>et al.</i> (2014) ²⁾
	Reverse	AGCTCCTATGCTTACAACCTGCTGA		
MPN-PCR				
<i>Campylobacter jejuni</i> <i>mapA</i>	Forward	CTATTTTATTTTGGAGTGCTTGTG	589	Khan <i>et al.</i> (2009) ³⁾
	Reverse	GCTTTATTTGCCATTTFTTTTATTA		

1.2. ノロウイルス定量方法

サンプル濃縮及び調製

試料水を採取後、4℃に保冷した状態で実験室まで運搬し、測定は原則3日以内に行った。濃度が低いと予想されるAS水、A2O水については1Lの試料に対してPEG沈殿法による濃縮を行った。まず、試料水を滅菌済2L広口丸型ボトル(Thermo Scientific)に入れ、2.3%(w/v)塩化ナトリウム、8%(w/v)Polyethylene Glycol 6000 molecular biology grade (SERVA Electrophoresis)を加え、完全に溶解するまで攪拌し、4℃で一晩静置した。その後、この溶液をBeckman Avanti HP-26XP(Beckman Coulter)を用いて4℃、10,000rpmで45分間遠心分離し、上澄み水を捨てた。この操作を試料がなくなるまで繰り返した後、ボトル壁面の付着物に対して滅菌済みのリン酸緩衝液(PBS, pH7.2)を2mL加え、ピペッティングで再懸濁した後、4℃で1日静置した。次に、再懸濁後に2分間の超音波洗浄を加え、この懸濁液にクロロホルム2mLを加えて15分間振り混ぜた。そして12,000rpm、10分間の遠心分離、クロロホルム層の吸引除去を行った後、さらにクロロホルム2mLを加え同様の操作を行った。最後に微生物汚染による影響を軽減するため、Antibiotic-Antimycotic 100X(Life technologies)を最終濃度1%(v/v)となるように加えこれを濃縮試料とした。濃縮試料は-80℃で冷凍保存した。FS水については、クロロホルム処理以降について同様の操作を行い、ウイルス試料を得た。この時のノロウイルス回収率は実験で求めた結果は1%であり、試料中の濃度計算に対しては回収率1%を適用した。

PMA-RT-qPCR

ここでは、EMAと同様の選択的膜透過性色素としてPMA(Propidium monoazide)を用いた。ウイルス試料に対するPMAの処理条件はKarimら(2015)⁴⁾を参照した。まず、濃縮試料200μLに対してPMA(1mg/mL)を50μL添加し、最終濃度が348μMとなるようにPCRグレード滅菌水を用いて調製した。攪拌した後、5分間室温で静置した。静置後、LED Crosslinker 12(タカラバイオ)を用いて5分間光照射を行った。

濃縮試料、PMA処理後濃縮試料をそれぞれ200μL採り、High Pure Viral Nucleic Acid kit(Roche)を用いてウイルス核酸を抽出した。なお、溶出液50μLについては、使用直前まで-80℃で保存した。

ノロウイルス G I 型, G II 型の定量は StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて, TaqMan プローブ法により行った。RT-qPCR の反応条件に関しては, Kageyama ら (2003) の方法⁵⁾ に従った。まず, TaqMan® RNA-to-Ct™ 1-Step Kit を用いて, PCR 反応液を調製した。この時, プライマー濃度を 1 μM, プローブ濃度を 125nM となるように調製を行った。PCR サイクル条件は, 逆転写で 48°C・30分, 初期変性で 95°C・10分, そして 95°C・15秒の変性, 56°C・1分のアニーリング・伸長反応を 1 サイクルとし, 計 40 サイクルを行った。プライマーとプローブ情報を表 2 に示す。

表 2 プライマー情報 (ノロウイルス)

PCR target gene		Sequence(5' to 3')	Amplicon size, bp	Referene
NoroG I	Forward	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	85	Kageyama <i>et al.</i> (2003) ⁶⁾
	Reverse	CTTAGACGCCATCATCATTYAC		
	Probe	FAM-AGATYGGGATCYCCTGTCCA-TAMRA		
NoroG II	Forward	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	98	Kageyama <i>et al.</i> (2003) ⁶⁾
	Reverse	TCGACGCCATCTTCATTCACA		
	Probe	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT -TAMRA		

2. 障害調整生存年数を用いた健康影響評価

簡易的なシナリオ設定として, A 下水処理施設ならびに下流部の浄水処理施設で何らかのトラブル (震災による故障など) が生じた場合に水道水を飲用したケースを設定した。そして想定したシナリオに合わせて, *C. jejuni*, ノロウイルスが引き起こす健康影響の評価と微生物学的に安全な水道水確保のための要求処理能について評価した。ここでは, 浄水処理施設は機能しない場合を想定し, 以下の 2 つのシナリオに基づき, 健康影響評価を行った。

- ① A 下水処理施設で最初沈殿池のみ正常に機能した場合
- ② A 下水処理施設で最終沈殿池まで正常に機能した場合 (塩素消毒のみが機能しない場合)

なお, シナリオ②の場合, AS 処理, A2O 処理の処理割合は, 実施設の処理能力を参考にし, 4.4 : 1 の比率と設定した。また放流水が受ける河川水による希釈比率は放流量と河川流量から 0.025 とした。

まず各シナリオに対して水道原水中の *C. jejuni* ならびにノロウイルス濃度を決定する。今回想定したシナリオでは浄水処理施設が機能していないことから水道原水中濃度が水道水中濃度と同じになる。次に大阪市水道局が 2009 年に行った飲水量調査のデータ⁶⁾ を用いて, 水道水中濃度から 1 日当たりの病原微生物摂取量を算出する。そして *C. jejuni*, ノロウイルスの用量-反応モデル^{7, 8)} を適用し, *C. jejuni* の年間感染確率を求める。求めた *C. jejuni* の年間感染確率に対して, *C. jejuni* とノロウイルスの感染-発症割合^{9, 10)} を適用し, 1 人当たりの年間感染症発症率を算出する。次に各病原微生物の感染症が発症した場合の DALYs 推定値¹¹⁾ に基づいて年間 1 人当たりの DALYs を算定する。

年間 1 人当たりの DALYs を推定する際に, 得られたデータ群に対して適した分布形を当てはめ

る必要がある。これは、各データ群の変動性を考慮するために行われる。そしてモンテカルロシミュレーションを行うことで、データ群の変動性を含んだ形で最終目的の推定値を分布で示すことが可能となる。ここでは、各データ群に対して Crystal Ball 7 (Decisinoeering 社製) を用いて、最も適した分布形の選定を行った。判断基準としては、感染確率に大きな影響を及ぼす低頻度ケースへの適合性を重視するために、アンダーソン・ダーリング検定の結果を重視し、必要に応じてカイ 2 乗 (χ^2) 検定や、コルモゴロフ・スミルノフ検定の結果も踏まえて判断した。なお、データ数が15個未満の場合は、カスタム分布を設定した。

III 結果と考察

1. *C. jejuni*, ノロウイルスの定量結果

各下水処理水の *C. jejuni*, ノロウイルス G I 型, G II 型の (RT-)qPCR による定量結果を図 1, 2 に示す。最初沈殿処理水 (FS 水) では, *C. jejuni* は $5.1 \times 10^2 \sim 5.8 \times 10^6$ copies/L (検出率 80%), ノロウイルス G I 型は $1.7 \times 10^7 \sim 1.3 \times 10^8$ copies/L (検出率 93%), G II 型は $9.7 \times 10^6 \sim 6.0 \times 10^8$ copies/L (検出率 100%) の濃度範囲で変動した。一方, AS 水, A2O 水では *C. jejuni* はそれぞれ $1.3 \times 10^3 \sim 1.3 \times 10^6$ copies/L (検出率 61%), $1.4 \times 10^3 \sim 4.0 \times 10^6$ copies/L (検出率 46%), ノロウイルス G I 型は $3.1 \times 10^5 \sim 5.8 \times 10^6$ copies/L (検出率 100%), $1.3 \times 10^5 \sim 7.6 \times 10^5$ copies/L (検出率 79%), G II 型は $6.4 \times 10^5 \sim 5.4 \times 10^7$ copies/L (検出率 85%), $1.3 \times 10^5 \sim 1.9 \times 10^7$ copies/L (検出率 100%) の濃度範囲で変動しており, *C. jejuni* に関しては除去性が安定していない一方で, ノロウイルスについては安定して $1 \sim 2 \log_{10}$ 程度の除去が確認できた。

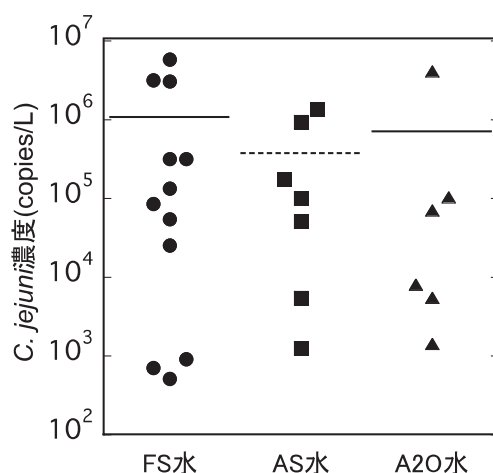


図 1 realtimePCR による各下水処理水の *C. jejuni* 数測定結果

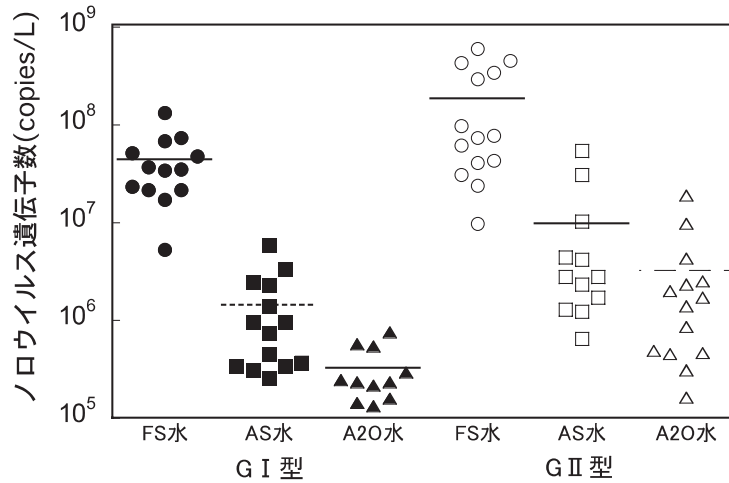


図2 RT-qPCRによる各下水処理水のノロウイルス G I 型, G II 型測定結果

続いて、*C. jejuni*, ノロウイルス G I 型, G II 型に対して EMA-qPCR (PMA-RT-qPCR) の結果を (RT-)qPCR の結果と共に図 3, 4 に示す。ただし、*C. jejuni* については AS 水, A2O 水の EMA-qPCR の結果が全て検出下限以下であったため、ここでは MPN-PCR での定量結果で比較することとした。

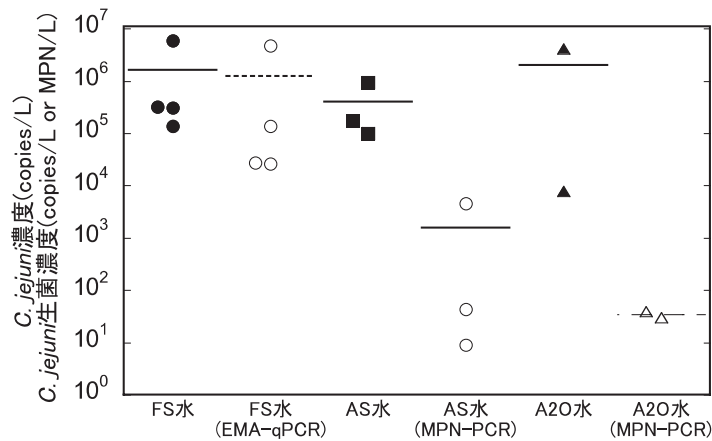


図3 遺伝子数と生菌数による各下水処理水の *C. jejuni* 数測定結果の比較

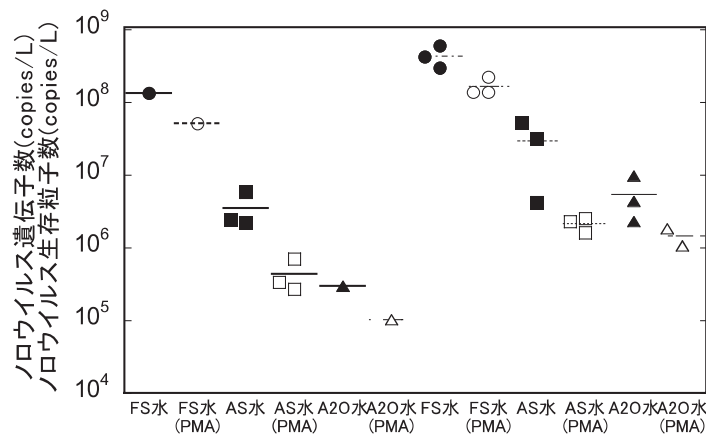


図4 遺伝子数と生菌数による各下水処理水の各下水処理水のノロウイルス G I 型, G II 型測定結果の比較

C. jejuni, ノロウイルス G I 型, G II 型共に EMA-qPCR (PMA-RT-qPCR) あるいは MPN-PCR の定量結果が (RT-)qPCR の結果よりも低い結果となった。今回得られた比較結果では, FS 水, AS 水, A2O 水それぞれにおける遺伝子数に対する生存している微生物数の割合は, *C. jejuni* については 8.3%~81%, 0.5~0.009%, 0.38~0.001%, ノロウイルス G I 型は 39%, 4.6~31%, 36%, G II 型は 23~52%, 4.8~39%, 11~42% となった。この結果より, 遺伝子数を定量する (RT-)qPCR の結果では感染リスクを高く見積もってしまう可能性が指摘できる。以上の結果とデータ数も踏まえ, 本研究のリスク評価においては, 遺伝子数に対して遺伝子数に対する生存している微生物数割合 (平均値) を乗じた値を原水の微生物濃度と設定することとした。また, *C. jejuni* の AS 水, A2O 水については MPN-PCR の結果を用いることとした。

2. 各シナリオに対する障害調整生存年数の推定

解析で得られた, 各要素のシミュレーション結果を以下に示す。

C. jejuni, ノロウイルスの年間感染確率の分布は, 平均値, 中央値, 2.5パーセンタイル値, 97.5パーセンタイル値全てにおいて 100% となった。また年間 1 人当たりの DALYs 推定値は, *C. jejuni*, 平均値, 中央値, 2.5パーセンタイル値, 97.5パーセンタイル値全てにおいて 2.2×10^{-2} DALYs 人⁻¹年⁻¹ となり, ノロウイルスにおいては 1.6×10^{-3} DALYs 人⁻¹年⁻¹ となった。WHO が推奨している DALYs の参照リスクレベルは 10^{-6} DALYs 人⁻¹年⁻¹ であることから, 下水処理施設で病原微生物の管理が出来ず, 浄水処理施設が機能しない場合は病原微生物に対する飲用リスクが高いと言える。

続いて, 下水処理施設が機能しない場合に微生物学的な安全性を確保できる水道水をつくるために必要な要求処理能について評価した。*C. jejuni*, ノロウイルスの要求処理能推定結果を図 5, 6 に示す。

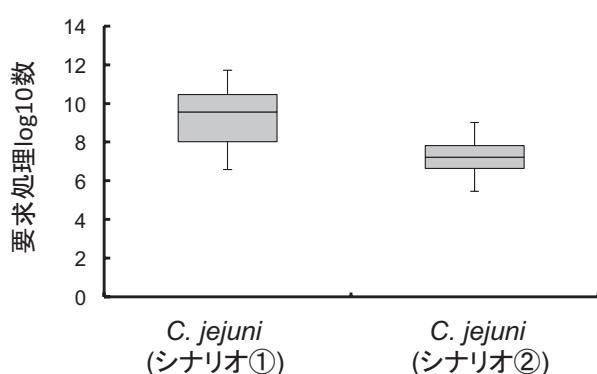


図 5 各シナリオに対する要求処理能結果 (*C. jejuni*)

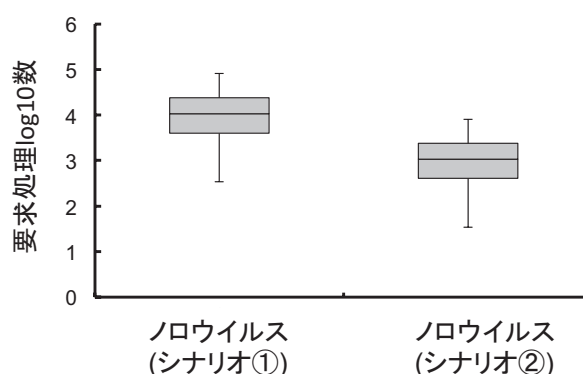


図 6 各シナリオに対する要求処理能結果 (ノロウイルス)

解析の結果、各シナリオにおける要求処理能の平均値は、*C. jejuni* でそれぞれ $10.77 \log_{10}$ 、 $8.06 \log_{10}$ となり、ノロウイルスでは $4.26 \log_{10}$ 、 $3.26 \log_{10}$ となった。その他の全てのパラメーターの推定値からも分かる通り、本研究のリスク評価においては *C. jejuni* のリスクが非常に高いことが指摘できる。通常の浄水処理としては、凝集沈殿処理、砂ろ過処理、塩素処理が組み込まれており、多重バリアを行うことで微生物学的安全性を確保した水道水をつくっている。しかし、本研究の評価において安全性の観点から97.5%タイル値の各シナリオにおける要求処理能を見た場合、シナリオ①で $11.71 \log_{10}$ 、シナリオ②でも $9.02 \log_{10}$ と高い処理能が求められる。浄水処理が機能している場合については塩素添加量等の調整も含め、対応が可能であると考えられるが、震災等の非常時の場合に下水処理排水が流れた水道水源が原因で感染症を制御することが困難である可能性が示唆される。

本研究においてデータ数は限られているものの、震災を含む災害時に下水処理施設の一部が機能しなくなる場合、放流水により高濃度の病原微生物が河川に放流され、水道水源が病原微生物により汚染されることにより、水系感染症のリスクが非常に高いことが示された。今後の展開として、データ数の取得、シナリオの詳細化も含め、リスク評価の精度を向上させ、より正確な対応についてデータに基づき議論していく必要があると言える。

IV 参考文献

- 1) 山田俊郎, 秋葉道宏: 最近10年間の水を介した健康被害事例, 保健医療科学, Vol.56, No.1, pp.16-23, 2007.
- 2) Ivanovam, M., Singh, R., Dharmasena, M., Gong, C., Krastanov, A. and Jiang, X: Rapid identification of *Campylobacter jejuni* from poultry carcasses and slaughtering environment samples by real-time PCR, *Poult. Sci.*, Vol.93, pp.1587-1597, 2014.
- 3) Khan, I. U., Gannon, V., Loughborough, A., Jokinen, C., Kent, R., Koning, W., Lapen, D. R., Medeiros, D., Miller, J., Neumann, N., Phillips, R., Robertson, W., Schreier, H., Topp, E., and van Bochove, E., Edge, T. A.: A methods comparison for the isolation and detection of thermophilic *Campylobacter* in agricultural watersheds, *J. Microbil. Methods*, Vol.79, pp.307-313, 2009.
- 4) Karim, M. R., Fout, G. S., Johnson, C. H., White, K. M. and Parshionikar, S. U.: Propidium monoazide reverse transcriptase PCR and RT-qPCR for detecting infectious enterovirus and norovirus, *J. Virol. Methods*, Vol.219, pp.51-61, 2015.
- 5) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Takeda, N. and Katayama, K.: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR, *J. Clin. Microbiol.*, Vol.41, pp.1548-1557, 2003.
- 6) 小松良光, 近藤才寛, 田川克弘: インターネットアンケートに基づく蛇口からの非加熱飲水量の調

- 査およびデータ解析, 水道協会雑誌, Vol.82, No.3, pp.16-23, 2013.
- 7) Teunis, P., van den Brandhof, W., Nauta, M., Wagenaar, J., van den Kerkhof, H. and van Pelt, W.: A reconsideration of *Campylobacter* dose-response relation, *Epidemiol. Infect.* Vol.133, pp.583- 592, 2005.
- 8) Masago, Y., Katayama, H., Watanabe, T., Haramoto, E., Hashimoto, A., Omura, T., Hirata, T. and Ohgaki, S.: Quantitative risk assessment of noroviruses in drinking water based on qualitative data in Japan, *Environ. Sci. Technol.*, Vol.40, pp.7428-7433, 2006.
- 9) 浅田安廣, 大河内由美子, 伊藤禎彦: 疫学調査に基づいた *Campylobacter jejuni* 感染における感染-発症割合に推定, 水環境学会誌, Vol.35, No.9, pp.135-142, 2012.
- 10) Teunis, P. F., Moe, C. L., Liu, P., Miller, S. E., Lindesmith, L., Baric, R. S., Le, Pendu . J and Calderon, R. L.: Norwalk virus: how infectious is it?, *J. Med. Virol.*, Vol.80, pp.1468-1476, 2008.
- 11) Havelaar, A. H., Haagsma, J. A., Mangen, M. J., Kemmeren, J. M., Verhoef, L. P., Vijgen, S. M., Wilson, M., Friesema, I. H., Kortbeek, L. M., van Duynhoven, Y. T. and van Pelt, W.: Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009, *Int. J. Food Microbiol.*, Vol.156, pp.231-238, 2012.