

VII-10

原虫のモデル微粒子を用いた凝集およびろ過の基礎的検討
—モデル粒子としての蛍光ビーズの凝集特性—

北見工業大学 フェロー 海老江 邦 雄
 " 正 員 土 井 克 哉
 " 学 生 員 玉 川 幸 慎
 " 学 生 員 李 宰 昊
 " 学 生 員 林 田 武 志

1. ま え が き

水道水に含まれるクリプトスポリジウムに起因する集団感染症は、米国のテキサス州（1984年）、ジョージア州（1987年）で発生したのを皮切りに、最近では、米国のミルウォォキー市（1993年）や日本の埼玉県越生町（1996年）で大規模な発生が起こったと報告されている。これらの発生原因としては、家庭排水、下水処理場からの放流水、または畜産廃水による水源汚染が考えられる。こうした状況から、汚染を心配する水道事業体では、水源変更の模索や暫定措置として提示された浄水濁度 0.1 度以下に対応すべく努力する一方で、国や水処理メーカーなどはクリプトスポリジウムの不活性化や、砂ろ過などによる分離効率の向上に関する各種の研究に着手している。

本論では、クリプトスポリジウムの急速砂ろ過による分離挙動を基礎的に、かつ詳細に把握することを目的としているが、その前段において、クリプトスポリジウムのモデル粒子として蛍光ビーズを単独で存在する試料、およびカオリンやフミン酸と共存する試料を対象に、PAC による凝集特性をゼータ電位を指標として基礎的に検討している。

2. クリプトスポリジウムの特徴とそれに由来する感染症¹⁾

クリプトスポリジウムは孢子虫類に属する原虫であり、ヒトのほかイヌ、ネコ、ニワトリ、ヒツジ、アヒルその他の動物に感染する人畜共通の病原体である。哺乳類には、図1に示す *C. parvum* と *C. muris* の2種類が寄生することが知られており、前者は小腸に、後者は胃に寄生する。



図1 クリプトスポリジウムオーシストの形態

クリプトスポリジウムの感染型であるオーシストは、図1で見られる楕円形であり、内部には C 字状に湾曲した4個の細長いスポロゾイトが中央の残体を取り囲む状態で包蔵されている。また、オーシストには無色で平滑な厚い外壁があり、これによってスポロゾイトを保護している。そのため、消毒剤、特に塩素には非常に強い耐性（大腸菌に対して約 24 万倍強い）を持っている。

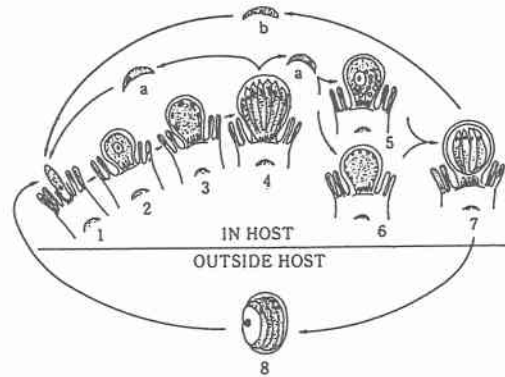
図2はクリプトスポリジウムの発育環を示す。オーシストがヒトを含む哺乳類によって経口摂取されると、内部に包蔵されているスポロゾイトは小腸や胃で遊離して、粘膜上皮細胞の微繊毛に侵入する。これによって微繊毛は大きく膨化・拡張し、袋状になって虫体を取り囲む。このようになった虫体は、その中に形成された寄生胞内で種々の形態をとりながら増殖するが、虫体は上皮細胞の細胞質まで侵入することはない。

スポロゾイトは寄生胞内で球状の栄養体となり、核分裂して8個のバナナ状のメロゾイトを形成する。メ

Behavior of Latex Microspheres as Surrogator to *C. parvum* in Coagulation and Filtration
 by Kunio EBIE, Katsuya DOI, Yukinori TAMAGAWA, Jae-Ho LEE and Takeshi HAYASHIDA

ロソイトは寄生胞から遊離して新たな微絨毛に侵入し、無性生殖で増殖を繰り返す。一方で、幾つかのメロソイトは有性生殖過程に移行して雌性生殖細胞と雄性生殖細胞になり、受精することによってオーシストが形成される。成熟したオーシストは糞便とともに排出され、これが再び哺乳類等の宿主動物により摂取されると図2の発育環を繰り返すことになる。

クリプトスポリジウムによる感染症（クリプトスポリジウム症）は、上述のように動物の糞便とともに排出されたオーシストを経口摂取することにより生じ、その主たる症状は激しい水様性の下痢と腹痛である。また、ヒトがクリプトスポリジウムオーシストを数十個摂取すると発病し、1個摂取した場合の感染率は50人に1人という実験データが報告されている。発病した場合、健康な成人であれば14～30日で自然に治癒するが、免疫力の低下した患者などでは重症になることが多く、場合によっては死に至ることも珍しくない。また、現在のところ、クリプトスポリジウム症に対する治療法は確立されていない。



1～4. 無性生殖の過程. 1. スポロゾイトまたはメロソイトが粘膜上皮細胞の微絨毛へ侵入.
2. 微絨毛内の寄生胞内で発育した栄養型.
3. 核分裂しつつあるシズント. 4. 成熟シズント. 8個のメロソイトを形成. 5と6. 有性生殖の過程. 5. 雌性生殖母細胞. 6. 雄性生殖母細胞. 16個のミクロガメートを形成.
7. 成熟オーシスト. 4個のスポロゾイトを形成.
8. 体外に排出された成熟オーシスト. a: 成熟シズントから遊離したメロソイト. b: 成熟オーシストから遊離したスポロゾイト.

図2 クリプトスポリジウムの発育環

3. 実験の方法および条件

今回の実験では、クリプトスポリジウムを含む汚染された原水を想定して、本学水道水にモデル粒子としての蛍光ビーズを単独で存在、もしくはこの他にカオリン、フミン酸が共存する模擬原水を用いている。

最初に、本学水道水を一昼夜室内に放置して、水温を20℃前後にした実験用水に、0.1N-HCl または 0.1N-NaOH を加えて pH を調整した。また、カオリンおよびフミン酸の原液はそれぞれ 1,000mg/l、500mg/l の濃度に予め調整しておく。次いで、所定の濃度になるようカオリン原液、フミン酸原液を、また、微量の蛍光ビーズを添加し、その都度、1,000ml の試料水を調整した。

今回の実験に使用した蛍光ビーズは、直径 3μm と 6μm、比重 1.05 の蛍光ラテックスマイクロビーズ (No.17156, Polysciences) である。蛍光色素 (FITC) はビーズの内部に取り込まれているため衰退することなく、通常の蛍光顕微鏡を用いることによって他の物質と容易に識別することができる²⁾。

今回の実験で用いた模擬原水は3種類であり、上記の水温と pH を調整した水道水に微量の蛍光ビーズだけを添加したものを原水 A、カオリン 20mg/l と微量の蛍光ビーズを添加したものを原水 B、カオリン 20mg/l、フミン酸 5mg/l および微量の蛍光ビーズを添加したものを原水 C とした。

次に、上記の手順で作成した原水に PAC を 5～30mg/l になるように注入した後、100rpm で急速攪拌を 5分間、40rpm で緩速攪拌を 10分間行ってから、測定用のため、一部の試料を採取した。その試料に約 5秒間超音波をかけてフロックを粉碎した後、ブリックスガラスセルを用いた蛍光顕微鏡電気泳動装置によって、各粒子のゼータ電位を測定した。なお、ゼータ電位は、正(+)と負(-)の極性変換でそれぞれ 12 個ずつの粒子の誘導速度を測定し、その最大値および最小値を除いた計 20 個の平均値をもとにして算出された。

4. 実験の結果および考察

4-1 蛍光ビーズ単独で存在する原水の場合

(1) pHの変動に伴う蛍光ビーズおよびクリプトスポリジウムオーシストのゼータ電位……図3は、PACを注入していないときにおける蛍光ビーズのゼータ電位の測定結果、および Drozd らが測定した脱イオン化した水におけるクリプトスポリジウムオーシストのゼータ電位⁹⁾を示している。また、表1は、図3のデータに基づく近似式から各物質のゼータ電位を算出した結果である。同図表によると、蛍光ビーズとオーシストとはともに負の電荷を持っており、pHが高くなるほどゼータ電位は低下している。一般に、蛍光ビーズのゼータ電位は、クリプトスポリジウムオーシストにしる、カオリンにしる、同程度の径(数 μm 程度)を持つ粒子であれば基本的な電位の推移は類似している⁹⁾ことが指摘されている。また、蛍光ビーズとオーシストとのゼータ電位の差を比較すると、pH3ではほぼ同程度であるが、pHが大きくなるに従ってその差は大きくなり、蛍光ビーズの方がオーシストよりもpH5で5~8mV、pH9で10~11mV低くなっている。

一方、Ongerth らが測定したフルボ酸 2.4mg/l 含む水におけるオーシストのゼータ電位は、pH6.3で-34.87mVである⁵⁾と報告している。これは、Drozd らが測定した脱イオン化した水におけるオーシストのゼータ電位-22.61mV (pH6.3) よりも12mV程度低くなっている。それゆえ、フルボ酸などの色度成分を含む含む水における蛍光ビーズのゼータ電位は、水道水におけるそれよりも低くなることが予想される。

(2) 凝集による蛍光ビーズのゼータ電位の上昇……図4は、原水AをPAC10mg/lで凝集させた後に蛍光ビーズ(6 μm)のゼータ電位を測定した結果を示している。また、表2は、図4のデータに基づく近似式から蛍光ビーズのゼータ電位を算出した結果である。同図表によると、蛍光ビーズのゼータ電位はpH3~10の間において凝集前よりも上昇しているのが分かる。その上昇量はpH3~9の範囲で11~25mVとなり、pH5付近で上昇量は最大となっている。pH5付近における蛍光ビーズのゼータ電位の上昇は、粒子の荷電中和に最も有効に働く正電荷のポリマーイオン($\text{Al}_6(\text{OH})_{20}^{4+}$ など)が多く存

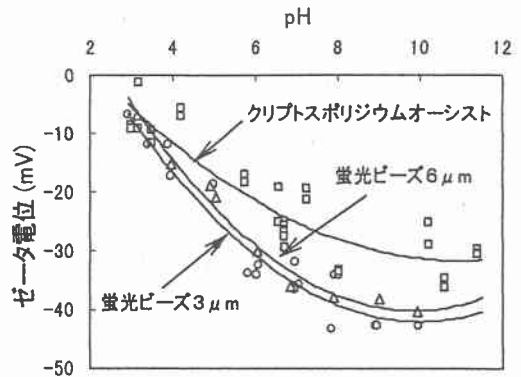


図3 pHの変動に伴う蛍光ビーズおよびクリプトスポリジウムオーシストのゼータ電位

表1 図3のデータに基づく近似式から算出した蛍光ビーズおよびクリプトスポリジウムのゼータ電位

測定対象物質	pH			
	3	5	7	9
蛍光ビーズ 3 μm	-7.25	-24.32	-35.69	-41.34
6 μm	-4.74	-22.46	-34.08	-39.62
クリプトスポリジウムオーシスト	-5.32	-16.88	-25.11	-30.00

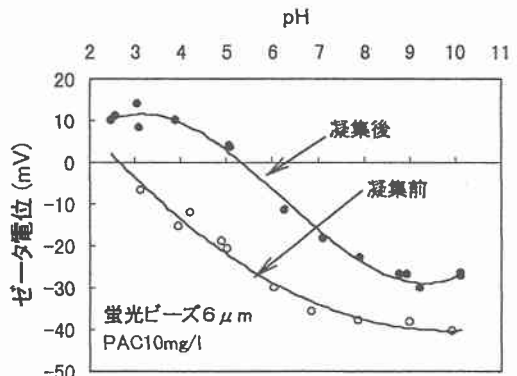


図4 凝集による蛍光ビーズのゼータ電位の上昇

表2 図4のデータに基づく近似式から算出した蛍光ビーズのゼータ電位

測定対象物質	項目	pH			
		3	5	7	9
蛍光ビーズ 3 μm	凝集前	-7.25	-24.32	-35.69	-41.34
	凝集後	12.21	5.41	-12.31	-28.02
	上昇量	19.46	29.42	23.38	13.32
蛍光ビーズ 6 μm	凝集前	-4.74	-22.46	-34.08	-39.62
	凝集後	11.55	2.82	-16.06	-28.54
	上昇量	16.29	25.28	18.02	11.08

在したことが大きく起因している。

凝集によって電荷が中和された粒子同士が相互に接近する際、その粒子間にファン・デア・ヴァールスカと呼ばれる分子間力が働き、粒子同士で引き合うことが可能となる。丹保による凝集至適のゼータ電位は±10mVの範囲内であり⁹⁾、凝集後の蛍光ビーズのゼータ電位がその範囲に入る pH の領域は 4~6.5 の間であった。

Ives らは、実際のクリプトスポリジウムオーシストを含む水に、アルミニウム濃度 6.8mg/l に相当する硫酸アルミニウムの量を注入して凝集させたところ、オーシストのゼータ電位が-15.5mV から 0mV に上昇した⁴⁾と報告している。

4-2 蛍光ビーズの他にカオリンまたはフミン酸を共存する原水の場合

(1) カオリンと蛍光ビーズが共存する原水の凝集効果……図5は、原水 B を PAC10mg/l で凝集させた後に蛍光ビーズ (6 μ m) およびカオリンのゼータ電位を測定した結果を示している。また、表3は、図5のデータに基づく近似式から各物質のゼータ電位を算出した結果である。同図表によると、蛍光ビーズおよびカオリンは、いずれも PAC で凝集させることによってゼータ電位が上昇し、その上昇量は pH3~9 の範囲では前者が 11~24mV、後者は 6~36mV となり、pH5 付近で両者とも上昇量は最大となった。この場合については、pH5 付近における各物質のゼータ電位の上昇は、粒子の荷電中和に最も有効に働く正電荷のポリマーイオンが多く存在していたことが大きく起因している。また、丹保による凝集至適のゼータ電位±10mV の範囲内に入る pH の領域は、凝集後の蛍光ビーズおよびカオリンでそれぞれ 2~7、2.8~6.7 であった。

図6は、原水 B を PAC 注入率 5~20mg/l の間

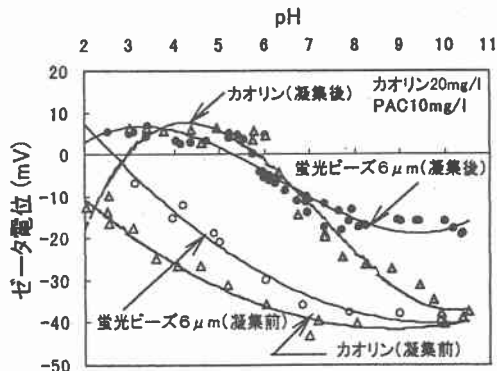


図5 凝集による蛍光ビーズおよびカオリンのゼータ電位の上昇効果 (原水 B)

表3 図5のデータに基づく近似式から算出した蛍光ビーズおよびカオリンのゼータ電位

測定対象物質	項目	pH			
		3	5	7	9
蛍光ビーズ 6 μ m	凝集前	-4.74	-22.46	-34.08	-39.62
	凝集後	6.58	1.86	-10.06	-18.51
	上昇量	11.32	24.32	24.02	21.11
カオリン	凝集前	-19.04	-30.71	-37.70	-40.28
	凝集後	0.45	5.61	-13.00	-34.57
	上昇量	19.49	36.32	24.70	5.71

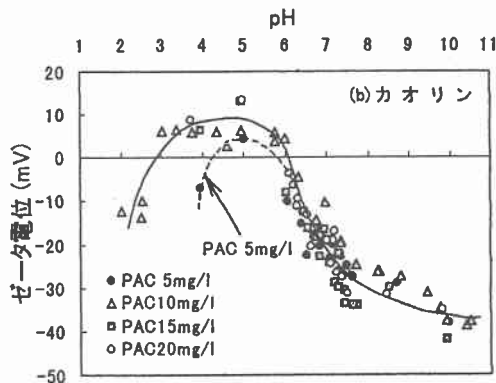
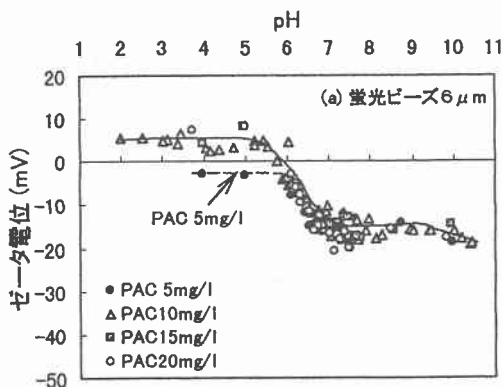


図6 PAC 注入率の変化に伴う蛍光ビーズおよびカオリンのゼータ電位 (原水 B)

で変化した場合における蛍光ビーズおよびカオリンのゼータ電位の動きを示している。同図によると、PAC 注入率が 10~20mg/l では蛍光ビーズおよびカオリンのゼータ電位に殆ど差は認められない。しかしながら、PAC 注入率 5mg/l のとき、pH6 以下の酸性領域では蛍光ビーズ、カオリンのゼータ電位はいずれも PAC 注入率 10~20mg/l のときよりも低くなっており、pH が 4 のときでは両者とも負の電位となった。これは、5mg/l 程度の PAC 注入率では、pH4~5 の範囲において粒子の荷電中和に最も有効に働くポリマーイオンが不足したためと考えられる。

(2) 蛍光ビーズ、カオリンおよびフミン酸が存在する原水の凝集効果……図7は、原水CをPAC10mg/lで凝集させた後における蛍光ビーズ(6 μ m)、カオリンおよびフミン酸のゼータ電位を測定した結果を示している。また、表4は、図7のデータに基づいた近似式から各物質のゼータ電位を算出したである。なお、凝集後におけるカオリンおよびフミン酸については、両者の複合粒子として形成されている。同図表から凝集後の蛍光ビーズのゼータ電位の動きを見ると、pH4.2 以上では、凝集前よりもゼータ電位は上昇しており、pH5 では-17mV、pH9 では-21mV まで上昇したものの、先に述べた凝集至適のゼータ電位 ± 10 mV の範囲内には達していない。一方、凝集後のカオリンおよびフミン酸を見ると、ゼータ電位が非常に低く、pH3~9 の範囲で-32~-55mV であったが、この状態では電気的発着が大きくなり、粒子間同士での結合が行われにくいと推測される。

図8は、PAC 注入率を 30mg/l まで増やして原水Cを凝集させた後、各物質のゼータ電位を測定した結果を示している。同図によると、蛍光ビーズの場合、PAC 注入率を 30mg/l まで増やしても変化は殆ど認められなかった。しかしながら、カオリンとフ

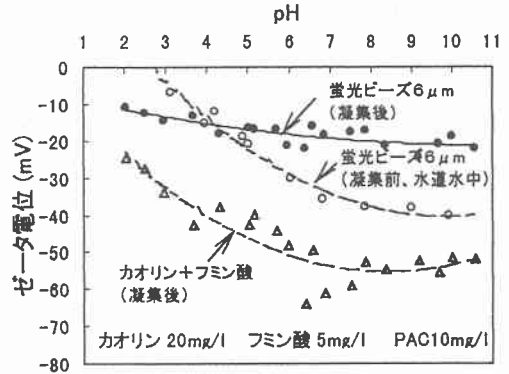


図7 凝集による蛍光ビーズ、カオリンおよびフミン酸のゼータ電位の上昇(原水C)

表4 図7のデータに基づく近似式から算出した
蛍光ビーズ、カオリンおよびフミン酸のゼータ電位

測定対象物質	項目	pH			
		3	5	7	9
蛍光ビーズ 6 μ m	凝集前	-4.74	-22.46	-34.08	-39.62
	凝集後	-13.95	-17.38	-19.81	-21.25
	上昇量	-9.21	5.08	14.27	18.37
カオリン+ フミン酸	凝集後	-32.62	-46.65	-53.61	-54.98

注) 凝集前の蛍光ビーズ6 μ mのゼータ電位は、水道水中の場合を示す。

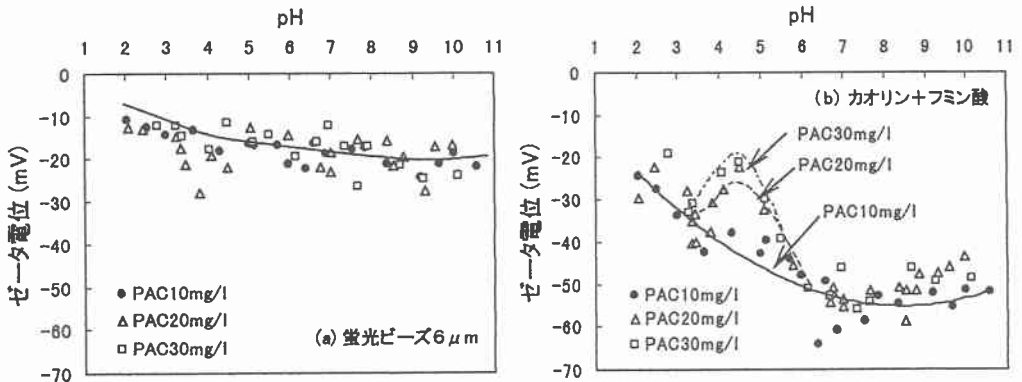


図8 PAC 注入率の変化に伴う凝集後の蛍光ビーズ、カオリン、フミン酸の蛍光ビーズのゼータ電位(原水C)

ミン酸の場合には pH3~6 の間でゼータ電位の上昇が認められ、PAC を 30mg/l 注入したときには -21mV (pH4.3) まで上昇した。このことから、カオリンおよびフミン酸のゼータ電位を更に上昇させて凝集至適領域に持っていくためには、PAC 注入率を 30mg/l 以上にすることが必要である。したがって、蛍光ビーズ、カオリンおよびフミン酸のゼータ電位を凝集至適領域にまで上昇させるには、あまりにも多量の PAC が必要になるので、それに代わって、カチオン系の有機性高分子凝集剤の効果を別個に検討することが必要と考えられる。

5. まとめ

今回行った、モデル粒子としての蛍光ビーズの凝集実験の結果から、次の知見が得られた。

- (1) 水中における蛍光ビーズのゼータ電位は一般に負の値を示し、pH が大きくなって低下する。この傾向は、実際のクリプトスポリジウムオーシストやカオリンなど、同程度の径 (数 μm) を持つ粒子であれば基本的に相違はない。
- (2) 蛍光ビーズ単独の場合には、クリプトスポリジウムオーシストの場合と同様に、いずれも凝集剤の注入によってゼータ電位を上昇させることができる。
- (3) カオリンおよび蛍光ビーズが共存する原水を PAC で凝集させた場合、これらのいずれの粒子のゼータ電位を上昇させることができる。しかしながら、PAC 注入率を 10mg/l 以上注入しても、両者のゼータ電位を更に上昇させることはできなかった。
- (4) 蛍光ビーズ、カオリンの他にフミン酸 5mg/l を含む原水に PAC を 10~30mg/l 注入して凝集させた場合の各物質のゼータ電位を見ると、蛍光ビーズでは、PAC 注入率 10mg/l 以上ではゼータ電位の上昇は認められなかったが、カオリンおよびフミン酸では、pH3~6 の間で PAC 注入率の増加に伴ってゼータ電位は上昇した。蛍光ビーズ、カオリンおよびフミン酸などの全ての物質のゼータ電位を凝集至適領域に保つには PAC 注入率が極めて高くなるので、今後は、カチオン系の有機性高分子凝集剤の注入について検討する必要があると考えられる。
- (5) 今後の研究課題としては、凝集・沈殿および砂ろ過による蛍光ビーズの他、実際のクリプトスポリジウムオーシストを用いた除去に関する実験を考えている。

6. 謝 辞

実験に協力いただいた北見工業大学土木開発工学科上・下水道工学研究室の卒論生、小関佳代子および松井輝明両君に感謝の意を表す。

【参考文献】

- 1) 平田 強・橋本 温 他：クリプトスポリジウム汚染と水道，水道協会雑誌，第 735 号，pp.2-10 (1995)
- 2) 岡部 聡・安田岳雄 他：混合培養系生物膜内の懸濁粒子の挙動に関する基礎的研究，環境工学研究論文集，第 33 巻，pp.103-114 (1996)
- 3) C. Drozd & J. Schwartzbrod：Hydrophobic and Electrostatic Cell Surface Properties of *Cryptosporidium parvum*，Applied and Env. Microbiologie，Vol.62，No.4，pp.1227-1232 (1996)
- 4) K. J. Ives & J. Gregory, et al.：A Microsphere in Water：Cryptosporidium parvum，6th world Filtration congress，224-231 (1993.)
- 5) J. E. Ongerth & J. P. Pecoraro：Electrophoretic Mobility of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts，Jour. of Env. Eng., ASCE, Vol.122, No.2, pp.228-231 (1996)
- 6) 丹保憲仁・小笠原鉦一：浄水の技術—安全な水をつくるために—，技報堂出版 (1985)