

B-61 鉄凝集と泡沫分離を組み合わせた クリプトスポリジウムの濃縮法の開発

○瀧田 敏之¹・鈴木 祥広^{2*}

¹宮崎大学大学院工学研究科 (〒889-2192宮崎市学園木花台西 1 丁目 1 番地)

²宮崎大学工学部 (〒889-2192宮崎市学園木花台西 1 丁目 1 番地)

* E-mail: Suzuki@civil.miyazaki-u.ac.jp

1. はじめに

近年の上下水道の発達や塩素消毒による飲料水の供給により、コレラやチフスなどの古典的な水系感染症の発症は制圧された。しかしながら、水系を介して伝搬し感染する病原微生物の問題はすべて克服されたわけではない。クリプトスポリジウムは、ヒトや動物の腸管上皮細胞に寄生、増殖することによって、下痢症を引き起こす原虫である。丈夫な「殻」に包まれたオーシストを形成し、塩素抵抗性が高く、現在水道やプールに用いられている塩素等の化学薬品による消毒効果が及ばない。我が国でも1996年に埼玉県越生町において、水道を介し約8800人の集団感染が発生¹⁾し、現在最も注目されている病原性原虫である。さらに、人獣共通感染能をもつ種が存在し、家畜が多く存在する農場からの放流水が、河川へと流出され、ヒトへと伝播する感染経路が確認されている。環境水中のクリプトスポリジウムのオーシストは、極低濃度で存在しているにもかかわらず、感染力は高く、最小10オーシスト程度で発症させる²⁾。以上のことから、水質の安全性を評価するにあたって、多量の水試料からクリプトスポリジウムを濃縮し、検出することは極めて重要である。

現在のクリプトスポリジウム検出における濃縮法は、メンブランフィルターによる濾過を用いた方法が一般的である³⁾。しかしながら、試料中に含まれるオーシストとそれ以外の懸濁物をメンブランフィルターによって補足してから、再度、剥離・回収するため、試料を通水するまでに長時間を要する。また、濁質を多く含む河川水や排水においては、濾過閉塞によって多量の水を対象にすることは困難である。さらに、大量の水を濾過する場合には、複数枚のフィルターを交換しつつ濾過しなければならず、枚数の増加によって剥離作業には熟練を要し、

回収率も分析者によって大幅に変動する。したがって、多量の水試料から迅速、簡便かつ高効率にクリプトスポリジウムを濃縮できる新規の濃縮法の開発が望まれる。

著者らが開発した泡沫分離法は、粘土粒子⁴⁾、微細油滴⁵⁾、植物プランクトン⁶⁾などの懸濁粒子を対象として、これらの懸濁粒子を鉄塩で凝集した後、界面活性物質のタンパク質(カゼイン)を添加してこの凝集懸濁試料に分散気泡を送気すると、水面上に泡沫を生じ、その泡沫に対象の懸濁粒子が極めて短時間に高効率に濃縮・回収され、液相から除去できる。そこで本研究では、クリプトスポリジウムのオーシストを泡沫に濃縮・回収する対象とし、鉄塩凝集剤とカゼインを用いた凝集・泡沫分離法におけるクリプトスポリジウムの濃縮効果と回収率について検討した。

2. 材料および方法

(1) 材料

標準試料として、不活化されたクリプトスポリジウムのオーシスト(Esay seed, 和光純薬工業)を用いた。また、凝集剤として塩化第二鉄(FeCl_2) (和光純薬社製、特級)を用いた。鉄標準溶液は塩化第二鉄を0.01N塩酸水溶液に溶解させて、10,000mg-Fe/Lに調整した。泡沫分離法の際に必要な起泡剤兼捕集剤として、界面活性タンパク質であるカゼイン⁷⁾(乳製、化学用和光純薬製)を用いた。カゼイン標準溶液(10,000mg/L)については、試薬を0.01Nの水酸化ナトリウム水溶液に溶解して作成した。鉄イオンの錯化剤としてEDTA・2Na(同仁化学社製)を用いた。標準溶液は蒸留水で希釈し作成した。

(2) 泡沫分離処理

人工河川水 500ml を 500ml ビーカーに入れ、100 オーシストを添加したものをクリプトスポリジウムの模擬汚染水すなわち原水とした。原水をジャーテスター (MJS-8, 型宮本製作所) で急速攪拌を行いながら、鉄添加濃度が 0, 1, 2.5, 5, 10mg-Fe/L となるように鉄標準溶液を加えて 3 分間急速攪拌させた。その後、カゼイン標準溶液をカゼイン添加濃度が 20mg/L となるように添加し、1 分間混合させた。混合後は、泡沫実験装置に移し、泡沫分離処理を行った。泡沫実験装置は、気液接触塔 (内径 3.5cm, 長さ 65cm, 透明アクリル製) の底部に微細気泡を供給するためのガラスボールフィルター (502G-4, 公称ボアサイズ 5~10 μ m, 木下理化工業) を取り付けられている。通気ガスには空気を用い、送気ポンプ (レイシー) および流量計 (KOFLOK) によって所定の流量に調整して塔内に通気した。水面上に形成される泡沫はアスピレーターによって吸引・回収した。回収された泡沫の消泡した液体を泡沫液と称する。泡沫分離処理の操作条件は、送気流量を 0.5L/min, 泡沫分離処理時間は 3 分間とした。泡沫処理終了後、ドレンより気液接触塔内の処理水を採水した。

(3) 鉄フロックの溶解処理

回収される少量の泡沫液には、添加した鉄塩に相当する鉄水酸化物フロックとオーシストが濃縮されると想定し、オーシストの精製、染色、そして検鏡を阻害するフロックを溶解して除去することにした。回収した泡沫液は 90ml まで蒸留水でメスアップし、1N-HCl を 10ml 加え、混合攪拌して鉄コロイドのフロックを溶解させた。つづいて、EDTA を鉄塩凝集剤の鉄絶対量の 2 倍相当になるよう添加し、さらに 10×TE Buffer を加えて混合した。そして、添加した HCl と等モル量の 1N-NaOH を加えて中和させた。以降のオーシスト検出操作は、処理水と同一である。

(4) 検出方法

回収した処理水および鉄溶解後の泡沫液からのクリプトスポリジウムの検出には、日本水道協会「クリプトスポリジウム - 解説と試験法 -」³⁾に記載されている試験方法 (提案) を用いた。回収した処理水および鉄溶解後の泡沫液は、吸引型フィルターファンネルを用いて、親水性 PTFE フィルター (孔径 5 μ m, 径 142mm, ミリポア社製) で濾過を行った。濾過後のフィルターは、遠沈管 (50ml SuperClear® Centrifuge Tubes with Plug Style Caps, labcon社製) に移し、誘出液 (ピロリン酸ナトリウム・10水塩 (和光純薬工業社製) 20g, エチレンジアミン四酢酸 3 ナトリウム (和光純薬工業社製) 30g, および

Tween80 (和光純薬工業社製) 10g を精製水に溶解し 1L とした PET 原液を 100 倍希釈し作成) とフットボール攪拌子 (長さ 35mm, 幅 16mm, フットボール型) を入れ、ボールティックスを用いてクリプトスポリジウムを剥離させた。得られた溶液 50ml は、1,050×G で 10 分間遠心分離させ、上澄みを除去し約 5ml 残した。その後、磁気ビーズ (Dynabeads anti Cryptosporidium kit,) を用いた処理を行い 150 μ m に精製した。その後、直接抗体染色 (Easy-Stain™, 和光純薬工業社製) と DAPI 染色液 (メタノール 1ml に DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) 2mg を溶解したものをリン酸緩衝生理食塩水で希釈したもの) を用いて染色を行った。検鏡試料として、リン酸緩衝生理食塩水に湿らせた親水性 PTFE フィルター (径 25mm, 孔径 1 μ m, ミリポア社製) 上に、染色後の溶液を添加させ、スライドガラス上に載せ、封入剤を滴下しカバーガラスをかけた。顕微鏡 (OLYMPUS DP70) の 20 倍の対物レンズを用いて、B 励起で観察を行い、緑色に発色したクリプトスポリジウムの計測を行った。

また本検出方法の検出効率を算出するため、オーシスト無添加の原水を対象として、同一の泡沫分離処理を行い、泡沫分離後の処理水および泡沫液に、それぞれ 100 オーシスト添加して本検出方法で検出・計数した。処理水および泡沫液の検出効率はそれぞれ、53.7±3.2% (n=3), 51.7±2.1% (n=3) となった。

3. 結果と考察

(1) 鉄フロックの溶解処理の検出への影響

鉄フロック溶解処理後の泡沫液は、無色透明となり、鉄フロックが良好に溶解されたことが目視できた。鉄フロック溶解後の泡沫液は、試験方法に従って、濾過濃縮、精製、染色、および検鏡を行ったところ、顕微鏡によって、クリプトスポリジウムのオーシスト特有の緑色の発色が確認できた。本研究で開発した鉄フロックの溶解処理は、オーシストの検出・計数に影響を生じさせることなく、鉄フロックを溶解してオーシストを回収できる有効な方法であることがわかった。

(2) 泡沫液への濃縮効果

図-1 に、各鉄添加濃度における添加したオーシストの処理水への残留率および泡沫液への回収率を示す。鉄凝集プロセス無し (鉄添加濃度 0mg-Fe/L) のカゼインのみの泡沫分離処理では、処理水中に添加したオーシストの約 80% が残留し、オーシストは泡沫液にはほとんど分離・回収されなかった。カゼインのみの泡沫分離処理では、クリプトスポリジウムは発生した泡沫には回収さ

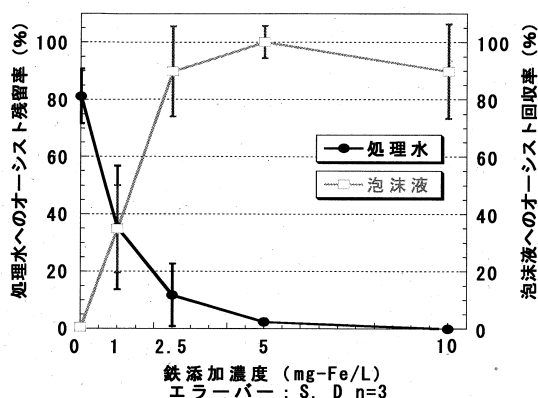


図-1 各鉄添加濃度における処理水へのオーシスト残留率と泡沫液へのオーシスト回収率
エラーバー：S. D n=3

れず、処理水にそのまま残留した。これに対して、泡沫分離プロセスの前段に鉄凝集を導入した場合には、鉄濃度に依存して、オーシストの泡沫液への回収率が著しく向上した。鉄添加濃度 1mg-Fe/L では、泡沫液への回収率は、約 35%となり、2.5mg-Fe/L 以上の鉄添加濃度では、回収率は、約 90%達した。鉄添加濃度 5mg-Fe/L において、回収率は、ほぼ 100%に達し、泡沫液へクリプトスポリジウムが高効率に回収されることが明らかであった。

一方、処理水への残留率は、回収率向上に伴って大幅に低下した。5mg-Fe/L において、処理水中の残留率は約 0%であり、 0.3 ± 0.6 (n=3) 個のオーシストが検出されたのみであった。凝集・泡沫分離法は、オーシストの除去技術への応用も期待できる。

原水すなわちオーシスト懸濁液に鉄塩の凝集剤を添加して凝集プロセスを導入することによって、オーシストは効率よく水酸化鉄フロックに凝集され、このオーシストを含むフロックがカゼインの持つ高い捕集性⁶⁾によって気泡に吸着し、泡沫へと濃縮できることが明らかとなった。以上の結果から、鉄塩による凝集プロセスは、クリプトスポリジウムのオーシストを凝集させ、かつ泡沫分離プロセスを効率的に達成させるためには必須である。

(3) 今後の検討課題

鉄フロック溶解後に、メンブランフィルターを用いた濾過・剥離の工程は、回収率の低下が懸念されている。そこで、泡沫液の鉄フロックを溶解処理した後、メンブランフィルターを用いない精製・回収法を検討し、さらに簡便かつ高効率なオーシストの濃縮・回収法の開発を進めている。

4. まとめ

(1) オーシストを凝集した鉄フロックを濃縮した泡沫液は、塩酸溶解、キレートマスキング、および中和のプロセスを組み合わせた鉄フロック溶解処理を開発した。この溶解処理は、オーシストの精製・検出に影響を及ぼすことなく、鉄凝集フロックを溶解させることができる。

(2) 鉄凝集プロセスなし（鉄添加濃度 0mg-Fe/L）のカゼインのみの泡沫分離処理では、約 80%のクリプトスポリジウムが処理水に残留し、泡沫水への分離・回収は期待できない。

(3) 鉄凝集プロセスを組み合わせた泡沫分離処理では、鉄添加濃度を増加させるにともなって、泡沫液への回収率が著しく向上する。鉄添加濃度 5mg-Fe/L において、ほぼ 100%の回収率が得られた。鉄凝集プロセスはクリプトスポリジウムを泡沫液へ分離・回収するために必須である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、クリプトスポリジウムのオーシスト検出法をご指導いただいたり顕微鏡の使用に関しご協力をいただいた東洋環境分析センター株式会社 片平千登世氏、および顕微鏡計数にご協力いただいた宮崎大学医学部教授 澤口朗博士、並びに関係者各位に厚く謝意を表します。

参考文献

- 1) 黒木俊郎ら, 感染症学雑誌, Vol. 70, No. 2, pp. 132-140, 1996.
- 2) Fayer, R. et al., *Int. J. Parasitol.*, Vol. 30, pp. 1305-1322, 2000.
- 3) 日本水道協会: クリプトスポリジウム - 解説と試験方法 -, pp. 51-91, 2003.
- 4) Suzuki, Y. et al., *Water Research* Vol. 36, No. 9, pp. 2195-2204, 2002.
- 5) Suzuki, Y. et al., *Separation Science and Technology* Vol. 40, No. 16, pp. 3407-3418, 2005.
- 6) 丸山俊朗ら, 水環境学会誌, Vol. 21, No. 5, pp. 310-317, 1998.
- 7) 鈴木祥広, 丸山俊朗, 水環境学会誌, Vol. 25, No. 8, pp. 477-483, 2002.