

# 〈研究発表〉

## 原水用クリプトスポリジウム自動測定装置の開発

田中 良春<sup>1)</sup>, 田口 和之<sup>2)</sup>, 小泉 和裕<sup>2)</sup>, 大賀 俊介<sup>2)</sup>, 細川 浩一郎<sup>1)</sup>

メタウォーター株式会社 (〒191-8502 東京都日野市富士町1番地, E-mail: tanaka-yoshiharu@metawater.co.jp)<sup>1)</sup>

富士電機アドバンステクノロジー(株) (〒191-8502 東京都日野市富士町1番地)<sup>2)</sup>

### 概要

耐塩素性病原菌クリプトスポリジウムの検査は大量の試料を用い、煩雑な操作で時間と熟練を要し、迅速に浄水プロセスへ反映することは難しい。最近の研究で集団感染を引き起こすクリプトスポリジウムの飲料水中の個数濃度は 0.02 個/L に相当することが明らかにされた。そこで我々は浄水プロセスの除去率3Log を超えるような個数濃度レベルのクリプトスポリジウムの流入を早期に検知可能な原水用自動監視システムの開発を進めており、比較的良好な結果が得られたのでその概要について報告する。

キーワード: クリプトスポリジウム, 原水水質管理, 蛍光標識抗体, フローサイトメリー

### 1. はじめに

水道事業体ではクリプトスポリジウム等の耐塩素性病原菌の汚染検査が行われているが、その検査は大量の試料水を用い、煩雑な操作で熟練を要する方法であり、迅速に浄水プロセスへ反映することは難しい。

国立感染症研究所の報告<sup>1)</sup>によれば、集団感染の前兆現象に焦点を当て、その間の飲料水中のオーシスト量を推計すると、過去の主要な集団感染においてはほぼ類似した値(平均飲水量を1L/日と仮定した場合、およそ 0.02 個/L相当)に収斂している。

取水時点で、浄水プロセスの除去率3Log を超える個数濃度の流入を早期に検知できれば、浄水プロセスの凝集沈殿ろ過の工程管理に反映させ、水系感染リスクを低減化できると考えた。(Fig.1)

そこで Table 1 に示す少ない量の水道原水を、短時間で、高頻度な測定が可能な原水用クリプトスポリジウム自動監視装置の開発を進めている。以下にその概要を報告する。

Table 1 Development goal specification

項目	目標仕様	
分離濃縮回収装置	方法	クリプトスポリジウムオーシストを膜にて分離濃縮し、回収する
	処理量	1 L/回
	回収率	80%以上
測定装置	測定方法	クリプトスポリジウムオーシストに選択的な蛍光抗体標識・フローサイトメリー法
	検出下限	2 個/L
	測定時間	3 時間以内(分離濃縮から計測結果が得られるまで)

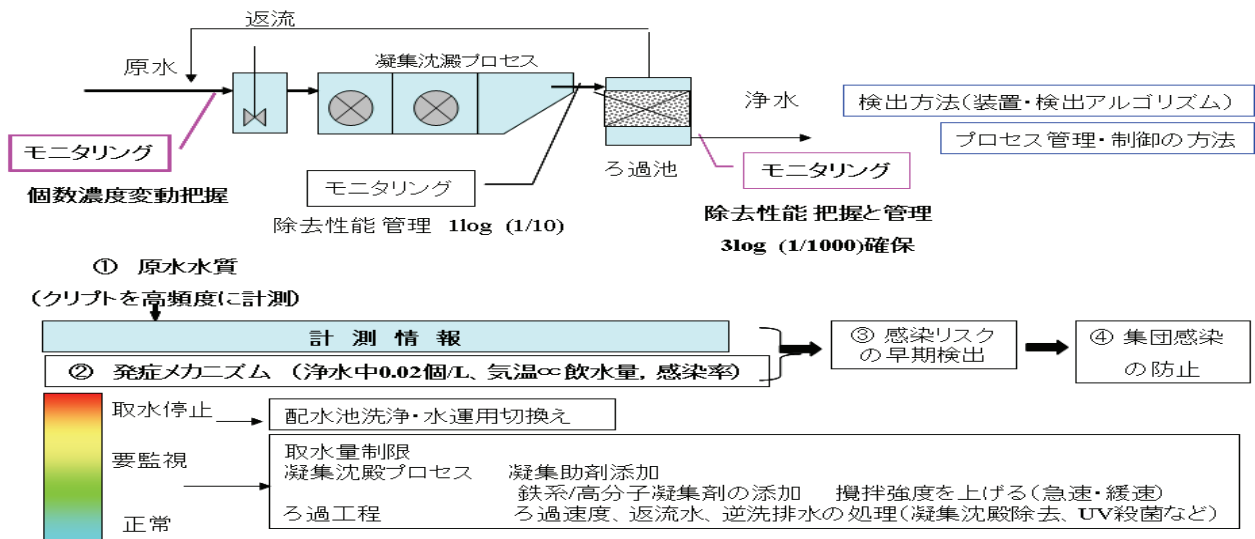


Fig.1: Construction of raw-water quality supervising system for pathogen.

## 2. 方法

### 2.1 実験装置

試作した装置の構成を Fig. 2 に示す。測定システムは分離濃縮部と蛍光抗体による標識部および精製部より構成される分離濃縮精製装置とフローサイトメリーによる専用の検出装置より構成される。

#### (1) 分離濃縮精製装置

分離濃縮部および精製部に用いる平膜としては、孔径  $3\mu\text{m}$  のトラックエッチメンブレンを用い、予めクエン酸を 0.1M、Tween80 を 0.01% となるように添加した原水 1L をろ過し、膜表面上に残った粒子を、洗浄水として PET (0.02% ピロリン酸ナトリウム、0.03% EDTA-3Na、0.01% Tween80) を用い、繰り返し洗浄することにより、精製し、20mL 溶液として回収する。これをさらに標識部にてクリプトスポリジウム・オーシストに特異的に結合する蛍光抗体を用い、標識部にて  $37^\circ\text{C}$ 、30 分の条件で抗原抗体反応を行った後、精製部に回収した粒子を再度、洗浄を行った。

#### (2) 検出装置

測定はフローサイトメリー法にて行った。

本フローサイトメーターではクリプト相当径の粒子による前方散乱光の強度に相当する粒子を検出、これらの粒子のうち蛍光標識抗体により標識され予め定められた強度の緑色蛍光を発光し、かつ赤色の散乱光を同時に発光しない粒子をクリプトとして計数する。<sup>2)</sup>

### 2.2 試料

実験に用いたクリプトスポリジウム (以下、クリプトと略記) は、*Cryptosporidium parvum* oocyst アイオワ株 (WATERBORNE 社製)、標識用モノクローナル抗体は Easy Stain G&C FITC (Biotechnology Frontier 社製) を用いた。

実試料として、河川表流水、主に多摩川 (東京都日野市) より適宜採水し、実験に用いた。また、原水濁度と微粒子数の関係の把握には濁度 (PSL) 標準溶液を用い検討を行った。

## 3. 結果および考察

### 3.1 分離濃縮・精製条件の検討

測定プロセス後段の検出装置での計数精度を向上させるためには、

- ① 分離濃縮装置において濃縮試料水中にクリプト粒子と共存する微粒子の数をなるべく少なくすること
- ② クリプトの回収率をできるだけ高く保つことが必要である。

そこで原水に添加する試薬、および洗浄液による洗

浄回数 of 検討を行った。

この結果、まず、原水にクエン酸を 0.1M、Tween80 を 0.01% となるように添加すると原水中の微粒子の分散性が良くなることが解った。

次に、PET による洗浄効果の検討結果を Fig. 3 に示す。洗浄回数とともに全微粒子数は減少し、洗浄回数 15 回以上で濃縮試料 20mL 中の夾雑微粒子個数濃度が  $7 \times 10^5$  個/mL 以下となることが解った。

このときの膜上に残存する粒子の粒径区分を Fig. 4 に示す。膜の孔径は  $3\mu\text{m}$  であるが  $3\mu\text{m}$  以下の粒子数が減少する傾向は認められず全体の粒子数が洗浄回数とともに減少していた。これは、膜表面に捕捉された粒子が逆洗を繰り返すことにより、徐々に分散し、微細化すること、膜の微細孔が大きな粒径の粒子により塞がれることにより  $3\mu\text{m}$  以下の小さな粒子も膜表面上に残存することによると考える。

15 回洗浄に要する時間は 30 分、洗浄液量は 1,200 mL であり、このときのクリプトの回収率 (添加個数 100 個) は 80 から 83% (平均 81%)、精製部での回収率もほぼ同様の結果が得られ、測定装置全体での回収率は現状、約 64% であることが解った。

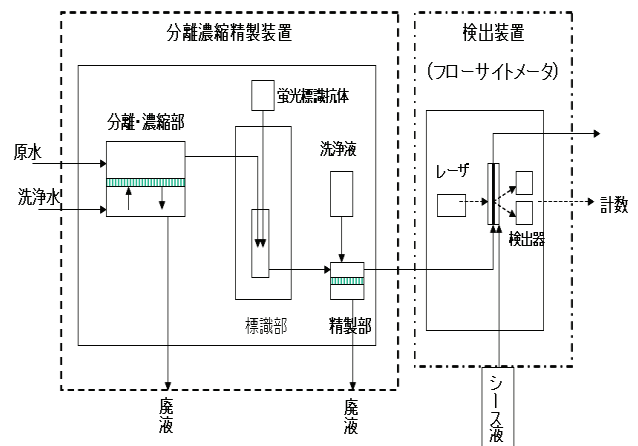


Fig. 2 Schematic diagram of measurement system

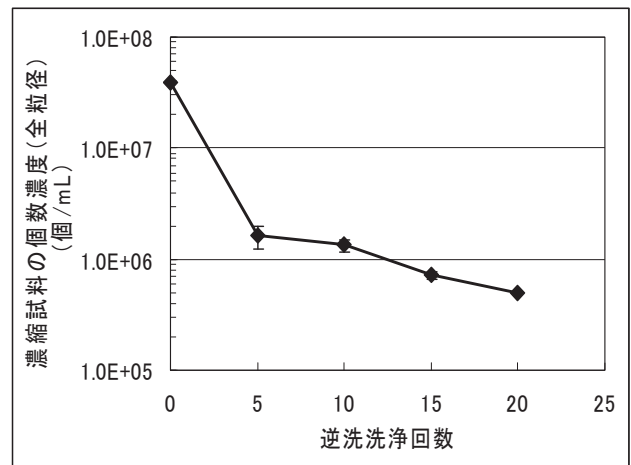
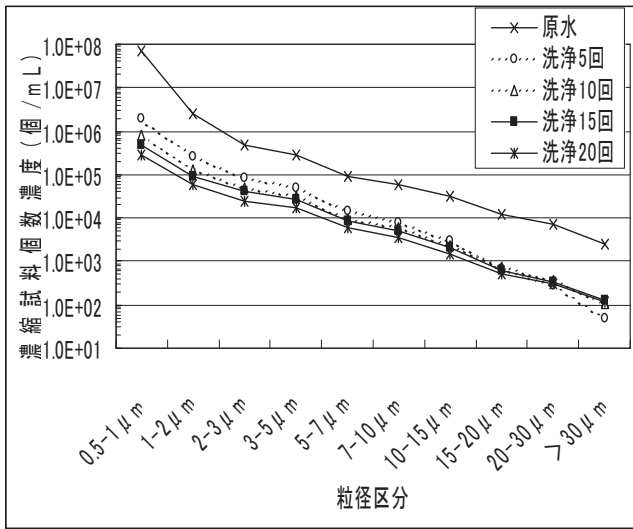


Fig. 3 The number of times of backwashing and relation of residual number concentration to separation enriching section



**Fig. 4** Relation of particle diameter classification of the number of times of backwashing in separation enriching section, and residual particulates

### 3. 2 測定装置の評価

#### (1) 直線性

不活化したクリプトスポリジウム・オーシストに蛍光標識抗体を結合させ、個数濃度を変えて測定装置単体での評価を行った。結果は、Fig. 5に示すように良好な直線関係が得られた。

#### (2) 原水濁度の影響

測定部において、蛍光標識されたクリプト粒子の蛍光散乱光強度を測定するため、測定試料中に共存する夾雑微粒子が多い場合、測定妨害を受けることが考えられる。そこで、測定試料水中の夾雑微粒子個数濃度の影響を検討した。

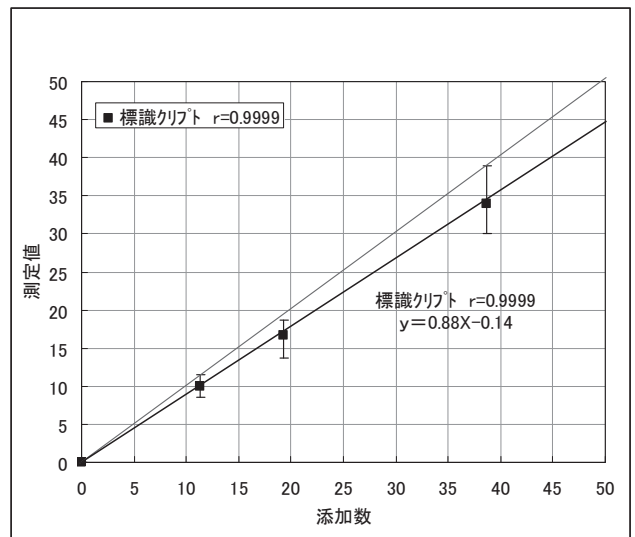
結果を Fig. 6に示す。濃縮試料中の夾雑微粒子の個数濃度が $2 \times 10^6$  個/mL以上になるとクリプトの測定値が低めとなる誤差を与えることが解った。

この濃度レベルは、濃縮試料の微粒子個数濃度と原水濁度との関係の検討結果から、原水濁度で約 10 度程度に相当すると考えられた。

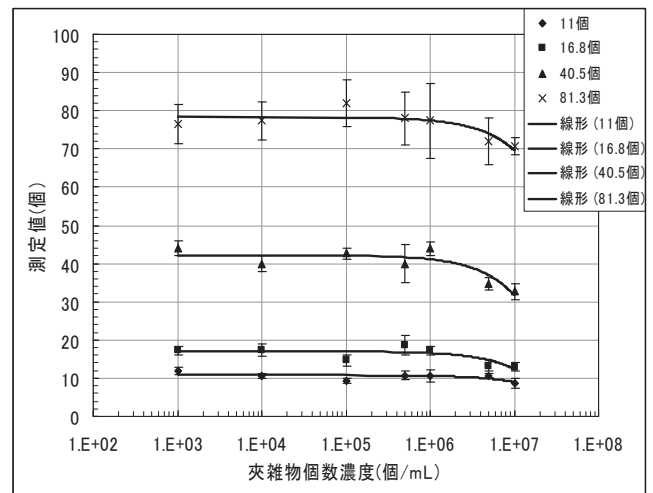
また、(社)日本水道協会のホームページで公開されている水道水質データベース<sup>3)</sup>の2005年度の原水濁度のデータを整理する Fig. 7のようになり、この装置の現段階での性能は、平均濁度では全国の浄水場の約 90%、最大濁度では、約 60%に適用可能なレベルにあると推察された。

### 3. 3 測定システムの全体評価

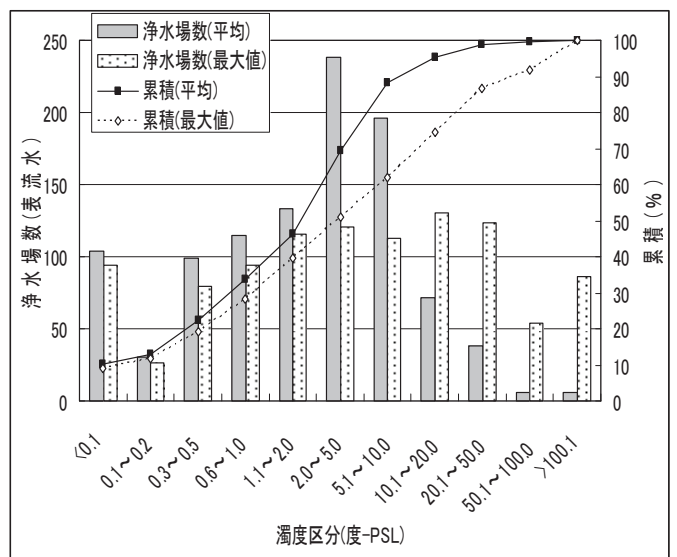
4 箇所の河川表流水に蛍光標識抗体にて標識したクリプトを一定個数濃度添加して、測定システム(分離濃縮精製部び測定部)での測定結果を Table 2に示す。添加個数濃度に対して、比較的再現性の良い結果が得られた。



**Fig. 5** Linearity of measured value in measuring device



**Fig. 6** Sample underwater particulate number concentration and relation of measured value.



**Fig. 7** Raw water turbidity level and number of water purification plants using surface water.

**Table 2** Measurement result of river water sample by measurement system which carried out standard addition

河川	添加個数 (個/L)	測定値(個/L)	換算値(個/L)
		(平均)	<回収率64%> (平均)
A	18	12~15 (13)	19~23 (20)
B	19	12~14 (13)	19~22 (20)
C	21	14~15 (14)	22~23 (22)
D	27	15~18 (17)	23~28 (27)

#### [参考文献]

- 1) 遠藤卓郎:国立感染症研究所年報平成 17 年度版 , 6. 寄生動物部, p. 3
- 2) 田中良春, 他:クリプトスポリジウムの自動計測に関する基礎研究, 第 57 回 全国水道研究発表会 講演集 pp.658-659 (2006)
- 3) (社)日本水道協会, ホームページ:  
<http://www.jwwa.or.jp/mizu/index.html>
- 4) 金子光美:水道におけるウイルス汚染の発生事例とウイルス処理技術, 水環境学会誌, Vol.29, No. 3, pp. 17-20(2006)

#### 4. まとめと今後の展開

原水中の耐塩素性病原虫クリプトスポリジウムの個数濃度を迅速に把握する装置の試作を行い、その基本特性と原水への適用課題を把握した。

病原微生物の検査は時間が掛かり、技術的にも普及に時間を要する。水の常時の安全性を確保するためには水質基準に加え、処理基準で対応することも必要と考える。一定の処理能力を有する工程を経て得られた水は許容リスクをクリアしていると判断する方法で、米国など諸外国ではクリプトスポリジウムやジアルジアなど原虫に対して処理基準で対処している<sup>4)</sup>。

処理基準で対応する場合には、原水中の原虫をどの程度除去すれば良いかを判断して処理能力を設定するため、原虫の濃度、許容リスクの設定、原虫の摂取量と感染に関する用量-反応関係を把握する必要がある<sup>4)</sup>。また、浄水施設にはその浄水能力を超えるような個数濃度の原虫の流入に対するリスク対策も必要と考える。

本測定システムの開発が水系感染リスク低減化システムの構築に役立つことを期待し、今後、さらに、多くの種類の水道原水を用い、再現性、測定値の精度や信頼性など自動監視装置としての課題を把握、検討し、改良を進め、浄水プロセス管理に適用すべく鋭意開発を進めていきたいと考えている。