資料 3-1
（泉山委員提出資料）

粉体ろ過濃縮法検討の必要性について

１． クリプトスポリジウム検査法の濃縮方法における課題について

クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物対策にあたって、「地表水を水道の原水としており、当該原水から指標菌が検出されたことがある施設（Level 4）や地表水以外の水を水道の原水としており、当該原水から指標菌が検出されたことがある施設（Level 3）では、浄水を毎日１回 20L 採取し、水または採水した水から得られるサンプルを 14 日間保存する」ことが推奨されている（水道水中のクリプトスポリジウム等対策の実施について【健水発第 0330005 号通知】)。クリプトスポリジウム症の潜伏期間は約 4～8 日（中央値 6 日）とされ、地域における集団感染が疑われた場合、遡って原因調査ができるようにするために、食品の検食制度に倣い上水あるいは上水濃縮試料を保存する措置である。

クリプトスポリジウム等は感染率が高く、少ない数でも感染の恐れがあること、水質は一定ではなく刻々と変化することから、検査には 20L に限らず、連続的に多量の水試料を濃縮することが望ましいものの、20L の水道水 2 週間分である 280L を常時保存するのは容易でなく、また、試料水を濃縮にも一定の時間がかかり緊急対応時の対応が困難な課題が存在する。

２． 粉体ろ過濃縮法検討の必要性について

この問題への対応として、少しでも時間短縮が可能となるように事前の濃縮等の措置を講じるため酸溶解性の粉体を用いたケーキろ過による濃縮法の開発を行ってきた。粉体ろ過法は、ハイドロキシアパタイトを用いたケーキろ過を行い、ハイドロキシアパタイトを塩酸で溶解除去することにより、簡便に濃縮物を得ることが可能である（厚生労働科学研究「飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究」: 松井班)。また、有機溶媒の使用や剥離操作を必要とせず、比較的安価に濃縮ユニットを作ることが可能で、使い捨て使用を可能とした。捕捉率は 99%以上が得られ、37㎜程度の小さなユニットで一晩に上水 200～400L ろ過可能であることが確認され、濃縮物の迅速回収が可能となった。コンパクトな濃縮ユニットで冷蔵保存が容易となること、緊急時には濃縮済み試料を使うことで再検査の時間短縮が可能となる等の利点がある。

このように上水濃縮試料の保存の課題に必要な方法が整備され、試料保存方法として当該方法が妥当であるかの検討を提案する。

(参考) 従来の濃縮法と粉体ろ過濃縮法の特徴の比較について

クリプトスポリジウム等の濃縮法には通常用いられるメンブランフィルター法に加え、遠心沈殿法（連続遠心法）などが良く用いられている。粉体ろ過に類似の濃縮方法として

は炭酸カルシウム沈殿法が報告（Vesey ら、1993）されているが、この方法では濃縮水量が沈殿容器の大きさに制限されることから採用されて来なかった。また、中空糸フィルターを用いた濃縮法も報告されているが、剥離に手間がかかることに加え、高価であることから使い捨てには向かないという難点がある。アセトン溶解法は揮発し、引火爆発の恐れもある有機溶媒を用いる。欧米で用いられているカートリッジ濃縮法は安価ではなく、日本国内では使用されていない。これら濃縮法の特徴とその比較について詳細を別添のとおり列挙した。

（資料3-1別添１）

ろ過濃縮法の比較表

比較項目	アセトン溶解法	PTFE法	中空糸（ナノフィルター例）	粉体ろ過法
ろ過水量目安	（比較基準）	少ない	もっとも多い	多い
有機溶媒	アセトン	–	–	–
塩酸	–	–	–	使用
剥離操作	–	要	要	–
回収操作	溶解	剥離	剥離	溶解
遠心洗浄	必要、アセトンの除去	不要	不要	必要、酸の除去
保存性	試料保存が良いとは聞かない	なし、剥離困難の恐れ	なし、剥離困難の恐れ	あり
ろ材価格	500円程度、原水に1～３枚、市販品	1000円程度を複数枚（原水に2枚以上）使用、市販品	数十万円	上水用が市販品500円程度、原水用も同程度
使い捨て	容易（再生不可）	容易（再利用しない）	困難（要再生）	容易（再生不可）
ろ過面直径	142mmが多い	90mmが多い	–	上水用37mm、原水用90mm
ろ過方向	加圧ろ過	加圧あるいは吸引ろ過	加圧ろ過	加圧ろ過
圧力装置	チュービングポンプ	チュービングポンプあるいは吸引ポンプ	チュービングポンプ	給水圧あるいは加圧ポンプ使用
フィルターホルダー	金属製	金属製あるいはガラス製	プラスチック製	37mmに使い捨てプラスチック製、90mmに金属製
ホルダー価格	20万、市販品	6～10万円程度、市販品	–	市販自動装置が50万弱、手作りなら20万弱（水量計、圧力計、調圧
濃縮操作の付き添い	要、つまり監視、フィルター交換	要、つまり監視、フィルター交換あるいは1Lのファネルに水試料を追加	不要	不要
フィルター径	1um	1ないし5um	0.1um未満	3um程度
捕捉効率	99%以上	99%以上	99%以上	99%以上
特徴	火気厳禁	ラグビーボール型スターラーバーによる剥離操作	再利用、破断注意	酸処理

厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）
分担研究報告書

飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究

粉体ろ過によるクリプトスポリジウム濃縮保存装置の開発

分担研究者：　遠藤　卓郎　　国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者：　泉山　信司　　国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者：　大内　一敏　　東洋濾紙（株）技術センター

研究要旨
　クリプトスポリジウムは強い塩素耐性を有することから水系感染が問題となるが、潜伏期間が 6 日程度と長く、万一集団感染が疑われても検査する水が残っていない問題があった。最新の指針では「浄水を毎日 1 回 20L 採取し、水または採水した水から得られるサンプルを 14 日間保存する」ことが望まれているが、濃縮していない水 280L を冷暗所に貯め置くのは容易ではなく、これを簡便に行う方法が必要であった。当該研究ではケーキろ過に着目してろ過性能や回収効率を検討してきたが、これを簡便に行うために小型の使い捨てプラスチック容器との組み合わせ使用を行い、性能の確認と使用方法について検討した。蛍光ビーズならびにオーシストを用いた検討で 90%以上の回収率を得られたことから、実用可能と考えた。本方法の試料保存と迅速検査への利用が期待される。

A. 研究目的

　クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物対策の一環として、「地表水を水道の原水としており、当該原水から指標菌が検出されたことがある施設（Level 4）や地表水以外の水を水道の原水としており、当該原水から指標菌が検出されたことがある施設（Level 3）では、浄水を毎日 1 回 20L 採取し、水または採水した水から得られるサンプルを 14 日間保存する」ことが望まれている（水道水中のクリプトスポリジウム等対策の実施について【健水発第 0330005 号通知】）．クリプトスポリジウム症の潜伏期間は約 4～8 日（中央値 6 日）とされ、地域における集団感染が疑われた場合、遡って原因調査ができるようにするための措置である．しかしながら、20L の水道水 2 週間分を常時保存するのは容易でなく、また、緊急対応時は試料水を濃縮から始めるよりも、少しでも時間短縮が可能となるように事前の濃縮等の措置を講じておきたい。当該研究はこれらの問題への対応を目的として、酸溶解性の粉体を用いたケーキろ過濃縮法の開発を行ったきたが、これを簡易な使い捨ての装置としたので報告する。該方法は、ケーキろ過の特性として、コンパクトな濃縮装置で多量の水道水の濃縮が期待できること、したがって保存が容易となること、緊急時には濃縮済み試料を使うことで時間短縮が可能となる等の利点がある。

B.　研究方法

使い捨て可能なろ過装置の容器として微生物モニター（Advantec）を用いた。可溶性粉体として粒状ハイドロキシアパタイト平均粒径 20～40μm を用いた（BioRad 又はサンギ）。支持体に 3μm の粒子を補足可能なろ紙を用いた（Advantec）。水道給水圧を利用して加圧ろ過を行い、圧力と流量はそれぞれ圧力計と積算流量計を用いて確認した。ろ圧は 20～80kPa、ろ速は 20～40m/h の範囲とし、いずれもプリコート操作を行なってろ過装置内にケーキ層を作成し、その後ビーズ（あるいはオーシスト）を懸濁した精製水、続いて水道水（感染研、東京都新宿区）を 100L 以上通水ろ過した（図 1）。

回収率評価にはオーシストに模した 3μm 蛍光ビーズ（2.76±0.06um、Fluoresbrite calibration grade YG、Polyscience）あるいはホルマリン固定のクリプトスポリジウムオーシストを用いた。粉体の溶解は 0.01%界面活性剤（Triton-X 100）並びに 1mM 塩化ナトリウムを添加した 1M 塩酸を使用した。溶解には粉体 1g に対して 20ml 程度の 1M 塩酸を用いた。回収率の評価では、10^5 程度のビーズあるいは 10^3 個のオーシストを添加し、通水ろ過を行った。ケーキ層は全量を回収し、40 ないし 45ml 程度の液量となるように溶解した。ここから直ちにショ糖浮遊を行う場合は液量を 40ml に抑え、下層にショ糖（比重 1.1～1.2）を重層した。ショ糖の比重は濃度（25～50%W/V）で調整し、比重計を用いて確認した。ケーキ層に捕捉されたビーズはフローサイトメーター（PAS 型、Partec）を用いて 200μL 分の測定を行い、回収率を算出した。オーシストの計数では粉体全量を溶解後に溶解液の 1 割を計数に用いた。すなわち、PTFE フィルターでろ過し、精製水で洗浄、PBS で中和、次いでブロッキング処理を行い、蛍光抗体（Merifluor、Meridian Diag.）染色後に微分干渉蛍光顕微鏡（Axiophoto、Zeiss）で計数した。浮遊法等のオーシストの回収率の評価には 300 個程度のオーシストを用い、全ての回収液を PTFE フィルター上で染色、計数した。

粉体中での雑菌の繁殖は以下の方法で確認した。1.5g 粉体を用いて水道水 100L ろ過を行い、粉体ケーキ層を支持体のろ紙ごと取り出して火炎滅菌したはさみとピンセットで 4 分割し、50ml チューブに入れ 4℃で保存した。経時的に粉体中の従属栄養細菌を計数した。4 分割した粉体の 1 つに 10ml となるように滅菌水を加え混合し、5 桁の 10 倍希釈系列を作成し、計 6 希釈段階を培養に供した。培地は R2A 寒天培地（DIFCO）を用いた。試料の各希釈段階それぞれ 100μl をコンラージ棒で塗布し、25℃、7 日間培養した。培養は各希釈段階につき 2 枚行い、30～300cfu の希釈段階を選択してコロニーを計数し、平均を算出、係数を乗じて元の水道水あたりの濃度を算出した。

C.　研究結果ならびに考察

ろ過装置の小型化を目指し、内径 35mm 程度の使い捨て容器を用い、ケーキ層の厚さ（粉体量）とビーズあるいはオーシストの回収率を検討した。この程度の大きさの装置であっても、200L 以上の水道水を通水することが可能であった．ろ過の初期に添加したビーズある

いはオーシストは 100L 以上をろ過した後にも 90%以上が回収され、流出等の問題は無かった（表 1）。粒子の回収率はケーキ層の厚さによって多少の変動が認められたが、測定の限界としてフローサイトメータの機械的な測定で数%程度、顕微鏡では10%以上の測定誤差が生じると考えられることから、いずれの条件でもほぼ95%程度の回収を達成しているとみなした。

表 1. ろ過助材量とオーシスト等の回収率（35mmΦの小型容器使用）

		評価に用いた粒子			
試料 No.	アパタイト量	粒子の種類	添加量	回収率	計算方法
1	1.5g	3μm ビーズ	2.7×10^5	97%	FCM
2	1.5g	3μm ビーズ	2.7×10^5	107%	FCM
3	1.5g	オーシスト	1.3×10^3	101%	顕微鏡
4	1.5g	オーシスト	1.3×10^3	102%	顕微鏡
5	1.0g	3μm ビーズ	2.7×10^5	104%	FCM
6	1.0g	3μm ビーズ	2.7×10^5	98%	FCM
7	1.0g	オーシスト	1.3×10^3	93%	顕微鏡
8	1.0g	オーシスト	1.3×10^3	92%	顕微鏡

ケーキ層からのオーシスト回収

酸溶解後の検査方法を検討した。すでに溶解直後のフィルター上での計数は上述の評価で繰り返し行っている。フィルター上での染色と観察の操作以外は、全く損失の無い最大効率の試験が可能となると期待された。ただし、欠点としては上水中と粉体中に元々含まれる夾雑物がフィルター上に再び濃縮され、観察を阻害することにあった。この問題の解消には染色するフィルターの枚数を増やして夾雑物を複数のフィルターに分散させるか、ショ糖浮遊法による精製が適当と考えられた。また、本装置が流通するに伴ってより夾雑物の少ない粉体に改良を進められることを期待する。

アパタイトを酸で溶解して得られた溶液の比重は 1.027～1.037 の範囲にあり（表 2)、クリプトスポリジウムの比重（1.05～1.07）に比べて低く、したがって、通常の遠心濃縮（1500g、5 分間程度）によってオーシストの回収が可能であった。しかしながら、沈渣にはオーシスト以外の捕捉夾雑物が多く含まれ、検鏡用の標本作製にはさらにオーシストの精製工程が必要と判断された。そこで、得られた沈渣を界面活性剤を含む精製水に再懸濁し、次いで下層にショ糖液（比重 1.2）を加えてショ糖勾配遠心浮遊法による精製行程を追加した。しかしながら、ショ糖勾配遠心沈殿による回収率は 40～60%程度に留まった。そこで、当初の遠心沈殿を省略し、酸溶解後の溶液を用いてショ糖勾配遠心浮遊を行ったところ、概ね 80～90%と高い回収率が得られた（表 3）。使用したショ糖液の比重は夾雑物の量、扱いやすさから考えて、1.14 程度が適当と考えられた。

表 2. アパタイト量と酸溶解後の溶液の液の比重

	アパタイト	1M HCl	DW	容量	比重
1	1.5g	25ml	20ml	45ml	1.036
2	1.5g	25ml	20ml	45ml	1.032
3	1g	25ml	20ml	45ml	1.027
4	1g	25ml	20ml	45ml	1.027
5	BioRad1.26g	20ml	20ml	40ml	1.037

表３．ショ糖勾配遠心沈殿法によるオーシスト回収率

粉体	ショ糖	オーシスト回収結果	
0g	5ml、比重1.2	317	100%
1.5g	5ml、比重1.2	303	96%
1.5g	5ml、比重1.14	256	81%
1.5g	5ml、比重1.08	274	87%

ろ過濃縮後のフィルターは冷蔵庫に 14 日間程度保存されるが、保存期間中に雑菌等の繁殖の程度を検討した（図 2）。その結果、水道水には基本的に従属栄養細菌等の数が少ないこと、遊離残留塩素管理がなされていることから、保存開始から数日間はむしろ菌数は 2 桁程度低下することが確認された。

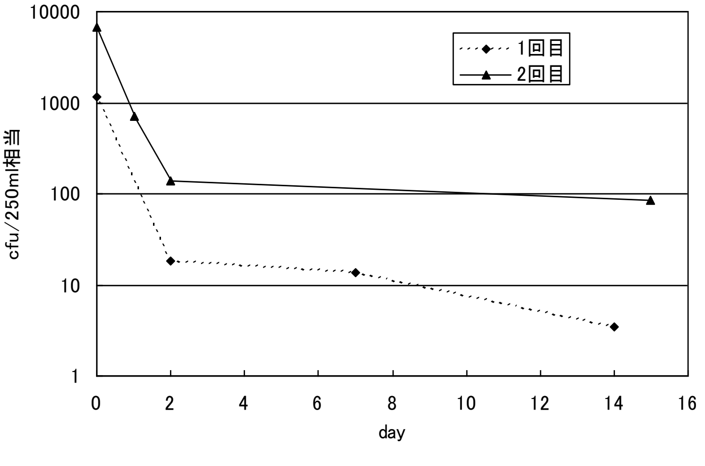

図 2. 保存期間中の従属栄養細菌数の推移

結論

　当該研究では使い捨て容器を用いたろ過濃縮装置を開発し、内径35mm程度と小型でかつ簡便な装置へとまとめることができた。粉体ケーキろ過法により十分なろ過量の確保、易収納・保存性、高回収率等が保証されており実用性に富んだ濃縮方法として迅速検査への利用が期待される。

参考文献

厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）「最近の科学的知見に基づく水質基準の見直し等に関する研究（主任：眞柄泰基）」より、平成 18 年度分担研究報告書（遠藤卓郎）

D. 研究発表

　泉山信司、大内一敏、遠藤卓郎、粉体ろ過によるクリプトスポリジウム濃縮保存法の開発、第59回全国水道研究発表会発表予定、平成20年仙台市

E. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得　　　　　出願中（特許出願２００６－２１１３４０）
2. 実用新案登録　なし
3. その他　なし