

粉体ろ過法の概要及び手順

検食制度に倣った上水の保存が提案され保存が開始されたが、上水中のクリプトスポリジウムの濃度は低く、濃縮して多量の水から検査することが好ましいと考えられる。これらを考慮した新規濃縮方法として、粉体ろ過法を開発した。粉体ろ過法は試料を濃縮する方法の1つで、面ではなくケーキ層を用いて大量の水試料を濃縮し、メンブレンフィルターからの剥離やアセトンなど有機溶媒による溶解を行うことはなく、粉体を溶解除去することで濃縮物を取り出すことが可能である。本方法は、水質によるが、24時間連続的な濃縮により数百Lの濃縮が可能であり、ケーキ層の面積を増やすことで原水数十Lの濃縮も可能の予定である。捕捉効率は99%以上で、メンブレンフィルターによる濃縮と遜色ないと考えられる。粉体にはハイドロキシアパタイトを用い、塩酸により溶解除去する。濃縮物を洗浄し、クリプト精製と検出を行う。2週間の保存期間の後に問題がなければ濃縮試料は廃棄処分する。毎日の試料濃縮、保存、廃棄を想定していることから安価な方法であることが望ましく、本方法ではハイドロキシアパタイトと既成のプラスチック容器との組み合わせにより、1回のろ過を数百円単位で実施することを可能とした。これは現行法のメンブレンフィルター1枚よりも安価である。

濃縮された試料であることから、後段のクリプト試験は迅速に行うことができる。例えば、一部試料を観察用フィルターにろ過し、蛍光抗体染色、顕微鏡観察を行う。あるいは一部あるいは全量を溶解し、磁気ビーズ法による精製に蛍光抗体染色と顕微鏡観察、あるいは遺伝子増幅試験などの組み合わせも考えられる。

従来の濃縮法に比べて注意すべき点は、中和とカルシウムの析出を防ぐための十分な遠心洗浄操作を実施することである。

粉体ろ過法は、応用例を積み重ねて実用性を検証することが必要である。

試料濃縮からクリプトスポリジウムの検出までの手順を以下に示す。

濃縮操作

1. ろ過ユニットを上水に接続し、ろ過圧を調整する（給水圧 200kPa に対して、50kPa 程度で上水より直接的にろ過が可能）
2. 粉体をろ過ユニットに追加することで、ろ過層を安定させる（捕捉効率を向上させるための操作）

3. 24 時間ろ過し、積算流量計により流量を求める（濃縮操作）
4. ろ過ユニットより水を抜き、密栓して冷蔵保存、必要なければ廃棄する（2 週間の保管）

クリプト試験操作（最短試験操作）

5. 粉体の一部をシャーレの上で切り取る、あるいは全量を 50ml の遠心管に移し、塩酸を加えて粉体を溶解する（ろ過層の溶解）
6. 20L 分の試料を何枚かの観察用フィルターにろ過する（顕微鏡観察の用意）
7. 純水でカルシウムを除き、次いで PBS 等の緩衝液で中和する（洗浄操作）
8. 蛍光抗体染色試薬を添加する（蛍光抗体染色）
9. 顕微鏡観察する（アップルグリーンに光るクリプト等の存在の有無を確認）

クリプト試験操作（疑い粒子の確認、多量試料の試験、あるいは遺伝子迅速検査）

10. 酸溶解試料を遠心濃縮、EDTA を添加、遠心洗浄する（カルシウムの除去）
11. 磁気ビーズ法でクリプト等を精製する（クリプト精製）
12. 精製サンプルより、顕微鏡観察あるいは遺伝子検査を実施（検出）

以上

a) 濃縮装置



b) 通水装置



c) 模式図

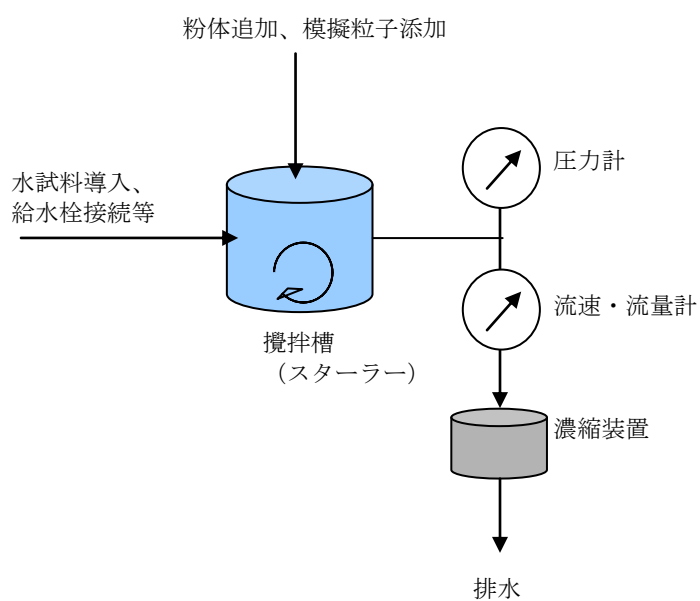


図1 濃縮装置

a) 微生物モニターを容器として使用し、ハイドロキシアパタイト粉体を用いてケーキ層を形成することで濃縮装置とした。

b) 簡易の通水装置を用いて圧力、流量をモニターした。安全対策として濃縮装置を別のプラスチック容器で上下から押さえた。

c) 水試料等の流れを模式図に示した。蛇口を直接接続し、給水圧を利用してろ過を行った。ろ加圧は圧力計を確認しながら蛇口の開度で調整し、流量計を用いて濃縮した水量を求めた。