

テロ等による水道水汚染は突発的であると想定されるので、濃縮装置は24時間連続運転可能なものとし、装填モジュール数は最大15本でモジュール室は5℃以下の低温室、モジュール切り替えは自動（緊急時2時間間隔、通常時12時間間隔）とした。ただし、モジュールの交換はマニュアル対応とした。交換頻度は緊急時1日1回、通常時1週間に1回とした。

#### (7) 剥離回収方法

なるべく簡便な方法とするために、特殊な遊出液を用いず、単に、滅菌水道水（場合によっては水道水そのものでも可）を用いた剥離回収方法に限定した。なお、回収率の目標は80%程度以上とし、最低でも50%を下回らないことと

した。

### C 通水性能の評価

#### (1) 通水試験方法

通水性能を調べるために、ロータリーポンプを用いて各中空糸膜に水道水を圧送し36時間連続通水した。初期ろ過速度は240 mL/min(14.4 L/h)とし、1~12時間毎にろ過速度および積算流量を測定した。試験に供する中空糸膜はいずれも、製造過程で生成される微細粒子を除去するために、加圧した水道水で約30分間逆洗した後、実験に使用した。

#### (2) 試験成績

通水試験の結果を表2に示す。

表2 通水試験結果

膜No.	上段：平均ろ過速度 (L/h) / 下段：積算流量 (L)										
	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	12h	24h	36h
UF-1	14.52	14.52	14.52	14.53	14.52	14.49	14.52	14.50	14.50	14.40	14.40
	14.5	29.0	43.6	58.1	72.6	87.1	101.6	116.1	174.1	346.9	519.7
UF-2	14.57	14.58	14.60	14.58	14.60	14.62	14.55	14.57	14.51	14.44	14.40
	14.6	29.2	43.8	58.3	72.9	87.6	102.1	116.7	174.7	348.0	520.8
UF-3	14.66	14.62	14.67	14.66	14.66	14.70	14.68	14.70	14.66	14.60	14.55
	14.7	29.3	44.0	58.6	73.3	88.0	102.7	117.4	176.0	351.2	525.8
MF-1	14.70	14.72	14.72	14.72	14.70	14.68	14.70	14.72	14.70	14.68	14.60
	14.7	29.4	44.1	58.9	73.6	88.2	102.9	117.7	176.5	352.6	527.8
MF-2	14.72	14.72	14.72	14.70	14.68	14.71	14.72	14.68	14.68	14.51	14.44
	14.7	29.4	44.2	58.9	73.5	88.3	103.0	117.7	176.4	350.5	523.8
MF-3	14.52	14.52	14.52	14.53	14.52	14.49	14.52	14.50	14.50	14.46	14.38
	14.5	29.0	43.6	58.1	72.6	87.1	101.6	116.1	174.1	347.6	520.2
UF-1	60.36	59.88	56.64	54.60							
	60.4	120.3	176.9	231.5							

全ての中空糸膜において、ろ過速度 240 mL/min (14.4 L/h) で 500 L 以上ろ過してもろ過速度はほとんど減少せず、8 時間で約 120 L、36 時間で約 500 L の水道水をろ過することができた。これらの結果から、候補として選定したどの膜も、通常時の濃縮 (120L/12 時間) に十分使用可能であることが分かった。

なお、UF-1 膜については、ろ過速度 1,000 mL/min (60 L/h) で 4 時間のろ過を試みたが、ろ過速度はほとんど減少しなかった (表 2, 最下段)。したがって、UF 1 膜モジュールは緊急時にも十分対応可能であると判断された。

#### D 細菌回収方法と回収能力の評価

##### (1) 水道水中の *B. subtilis* 芽胞のバックグラウンド濃度

添加回収試験の供試菌に用いた *B. subtilis* 芽胞は自然界に広く分布するので、水道水中にも存在する可能性がある。そこであらかじめ無添加水道水中の濃度 (バックグラウンド濃度) を定量することとした。供試膜として UF-1 と

MF-2 を用い、100 L の水道水をろ過した。ろ過後、約 30 mL の滅菌水道水を中空糸膜ハウジングに添加し、手動で 10 分間振とうして膜面に捕集した懸濁物質を剥離回収した。回収した剥離液について、下記の方法で *B. subtilis* 芽胞を定量した。

*B. subtilis* 芽胞は、剥離液を 80°C の水浴中で加熱処理した後、普通寒天培地 (ニッスイ製) で混釈し、37°C のインキュベータ内で 48 時間培養したときに形成されたコロニー数 (集落数) とした。操作手順を以下に示す。

- ①【添加液】および【剥離液 1】～【剥離液 3】を試験管に移す。
- ②希釈列を調製する。
- ③80°C の水浴中で 20 分間加熱処理する。
- ④各希釈列から 1 mL をとり 90 mm シャーレに分注する。
- ⑤普通寒天培地を 20 mL 添加し混釈する。
- ⑥37°C で 48 時間培養し、コロニーを計数する。

試験結果を表 3 に示す。

表 3 水道水中 *B. subtilis* 濃度

膜No.	剥離液量 (mL)	剥離液中 <i>B. subtilis</i> 濃度 (個/mL)	<i>B. subtilis</i> 回収量 (個)	水道水中 <i>B. subtilis</i> 濃度 (個/L)
UF-1	33.2	1.00	33.2	0.33
MF-2	40.1	0.33	13.2	0.13

*B. subtilis* 芽胞は UF-1 膜モジュール、MF-2 膜モジュールの濃縮物からいずれも 1 個しか検出されなかった。剥離率を 100% と仮定した場合の水道水中の *B. subtilis* 芽胞濃度は計算上 0.13~0.33 個/L となる。したがって、50~60 L の水道水を用いる今回の実験系では、

水道水に含まれる *B. subtilis* 芽胞は約 20 個であり、添加実験での評価にバックグラウンド濃度が影響を及ぼす可能性はほとんどないと考えられた。

##### (2) *B. subtilis* 芽胞添加回収試験 I (通常時モニタリング用)

チオ硫酸ナトリウムで脱塩素した水道水約

50L に、約 5,000 個または 50,000 個の *B. subtilis* 芽胞を添加し、6 種類の中空糸膜（表 1）でろ過した。流速は、実験を通して 240 mL/min（14.4L/h）に維持した。

*B. subtilis* 芽胞としては、ATCC 6633 株をトリプトソイ液体培地（Difco 製）で増菌培養（37℃, 48 h）したのち、リン酸塩緩衝溶液で 4 回遠心洗浄し、これを冷蔵庫に数日間以上放置したものを用いた。

膜面に捕集した *B. subtilis* 芽胞は、ハウジングに滅菌水道水をハウジング容量の約 1/3 量（10~75 mL）添加してから手動で 3 分間振とうすることにより剥離したのち、回収した。なお、UF-2 および UF-3 の限外ろ過膜は中空糸充填密度が高いためハウジング内の余裕空間が極めて少なく、手動浸透による剥離回収率が著しく低かったので、加圧水道水 120~190 mL を用いて 3 回逆洗して剥離させたのち回収する方法を採用した。この操作をそれぞれ 3 回繰り返す、剥離液中の *B. subtilis* 芽胞数を定量した。

添加回収試験の操作手順を以下に示す。

①水道水 50~60 L にチオ硫酸ナトリウム溶液を添加し、塩素を除去する。

② *B. subtilis* 芽胞 5,000 個/mL または 50,000 個/mL の懸濁液を 1 mL 添加する。

【添加液】

③スクローラーで攪拌しながら各中空糸膜で全量をろ過する（ろ過速度：240 mL/min）。

④加圧空気を圧送してハウジング内の水を約 1/3 に減らしてから、3 分間手動振とうする。

⑤少量の滅菌水道水をハウジング内に加え洗浄した後、④と合わせる。→【剥離液 1】

⑥滅菌水道水をハウジング容量の約 1/3 ま

で加え、手動で 3 分間振とうする。

⑦少量の滅菌水道水をハウジング内に加え洗浄した後、⑥と合わせる。→【剥離液 2】

⑧滅菌水道水をハウジング容量の約 1/3 まで加え、手動で 3 分間振とうする。

⑨少量の滅菌水道水をハウジング内に加え洗浄した後、⑧と合わせる。→【剥離液 3】

*B. subtilis* 芽胞を 50,000 個添加した系における回収率を表 4 に示す。

UF-1 膜及び MF-2 膜では 1 回目の剥離回収操作で添加した *B. subtilis* 芽胞の約 85~90% を回収することができ、3 回剥離回収操作を行った後の総回収率は両者とも約 91% で、目標を達成できることが分かった。これに対し、UF-2 膜および UF-3 膜による回収率は、水道水で逆洗（フラッシング）したにもかかわらず 30~45% と低く、最低目標すら達成できなかった。また、MF-1 膜および MF-3 膜による回収率もそれぞれ 22% および 29% と低く、最低目標を達成できなかった。

これらの結果から、濃縮用媒体として信頼できる膜モジュールは UF-1 膜及び MF-2 膜の 2 種類であった。このように、*B. subtilis* 芽胞 50,000 個添加系では、UF-1 膜と MF-2 膜が十分実用できる高い回収率を示した。そこで、*B. subtilis* 芽胞添加量を約 1/10 の 4,500 個とした系でも剥離回収試験を行なった。結果を表 5 に示す。回収率は UF-1 が 100%、MF-2 が 94% と両者ともに高い値であり、添加量に関係なく、UF-1 膜と MF-2 膜の膜面に濃縮した細菌芽胞は簡単な剥離操作で高率に回収できると判断された。

表4 添加回収試験結果（通常時モニタリング，50,000 個添加系）

膜No.	添加 <i>B. subtilis</i> 量 (個)	剥離操作回数 (回目)	剥離液量 (mL)	<i>B. subtilis</i> 回収量 (個)	回収率 (%)
UF-1	51,000	1	64.2	43,740	85.1
		2	44.6	2,007	3.9
		3	49.6	694	1.4
		計	161.4	46,441	91.1
UF-2	45,000	1	142.1	11,652	25.9
		2	122.9	983	2.2
		3	124.6	748	1.7
		計	389.6	13,383	29.8
UF-3	46,000	1	167.6	17,430	37.9
		2	143.9	2,159	4.7
		3	193.6	1,161	2.5
		計	505.1	20,750	45.1
MF-1	56,000	1	65.0	5,785	10.3
		2	47.7	2,862	5.1
		3	61.7	3,702	6.6
		計	174.4	12,349	22.0
MF-2	49,000	1	74.9	43,442	88.6
		2	65.3	1,175	2.4
		3	59.4	238	0.5
		計	199.6	44,855	91.5
MF-3	49,000	1	10.4	4,576	9.3
		2	18.7	5,479	11.1
		3	20.6	4,058	8.3
		計	49.7	14,113	28.7

表5 添加回収試験結果（通常時モニタリング，5,000 個添加系）

膜No.	添加 <i>B. subtilis</i> 量 (個)	剥離操作回数 (回目)	剥離液量 (mL)	<i>B. subtilis</i> 回収量 (個)	回収率 (%)
UF-1	4,500	1	51.5	4,172	92.7
		2	42.0	307	6.8
		3	39.6	51	1.1
		計	133.1	4,530	100.6
MF-2	4,500	1	50.1	3,909	86.9
		2	54.0	254	5.6
		3	44.8	45	1.0
		計	148.9	4,207	93.5

(3) *B. subtilis* 芽胞添加回収試験 II (緊急時モニタリング用)

テロ行為が高い確率で想定されるような緊急時には、高頻度のモニタリングが必要となる。そこで、検査に要する時間等を考慮して緊急時モニタリングにおける検査頻度として毎2時間を想定し、チオ硫酸ナトリウム溶液で脱塩素した水道水約60Lに、4,500個または50,000個の*B. subtilis* 芽胞を添加した後、流速1,000 mL/minでろ過した。ろ過膜にはUF-1膜を用い

外圧式でろ過した。膜面に捕集した*B. subtilis* 芽胞の剥離回収方法並びに芽胞検査方法は(4)と同じである。

回収率を表6に示す。1回目の剥離操作で70%以上の*B. subtilis* 芽胞を回収することができ、3回の剥離操作による総回収率は両者とも約80%であった。したがって、剥離回収操作は3回で充分であり、1回でも実際上は問題がないと判断された。

表6 添加回収試験結果 (緊急時モニタリング)

膜No.	添加 <i>B. subtilis</i> 量 (個)	剥離操作回数 (回目)	剥離液量 (mL)	<i>B. subtilis</i> 回収量 (個)	回収率 (%)
UF-1	50,000	1	44.2	38,145	76.3
		2	40.1	762	1.5
		3	47.7	415	0.8
		計	132.0	39,322	78.6
UF-1	4,500	1	49.1	3,273	72.7
		2	46.1	323	7.2
		3	40.7	41	0.9
		計	135.9	4,207	80.8

#### E 濃縮装置の試作

これまでに示した検討結果に基づき、濃縮媒体としてUF中空糸膜モジュールを用いた外圧式膜ろ過濃縮装置を設計し、試作した。図面を別紙に示す。

#### F 考察

水道水中に作為的に投入された微生物を連続して定常的に監視するためには、12時間で200L程度のろ過水をろ過する必要がある。本研究では、12時間で約175Lの水道水をろ過したが、試験に供した6種類全ての中空糸膜(膜面積0.1~1.0 m<sup>2</sup>)で、ろ過速度の減少は観察されなかった。また、36時間で500L超の水道水をろ過

しても、ろ過速度の減少は10%程度にとどまり、顕著な減少はみられなかった。この結果から、膜面積は本分担研究で使用した最小膜面積である0.1 m<sup>2</sup>程度でも500L程度の水道水を十分ろ過できるものと考えられた。

約50,000個の*B. subtilis* 芽胞を50Lの水道水に添加した剥離回収試験の結果、滅菌水道水による回収率は22~92%と膜モジュールによって大きく異なり、膜面積が1.0 m<sup>2</sup>のUF膜(UF-2およびUF-3)の回収率は逆洗したにもかかわらず30~45%で、目標とした「回収率80%程度、最低でも50%」を達成できなかった。これらのUF膜モジュールの膜面積はUF-1膜に比べて10倍もあって充填密度も高いため、400~

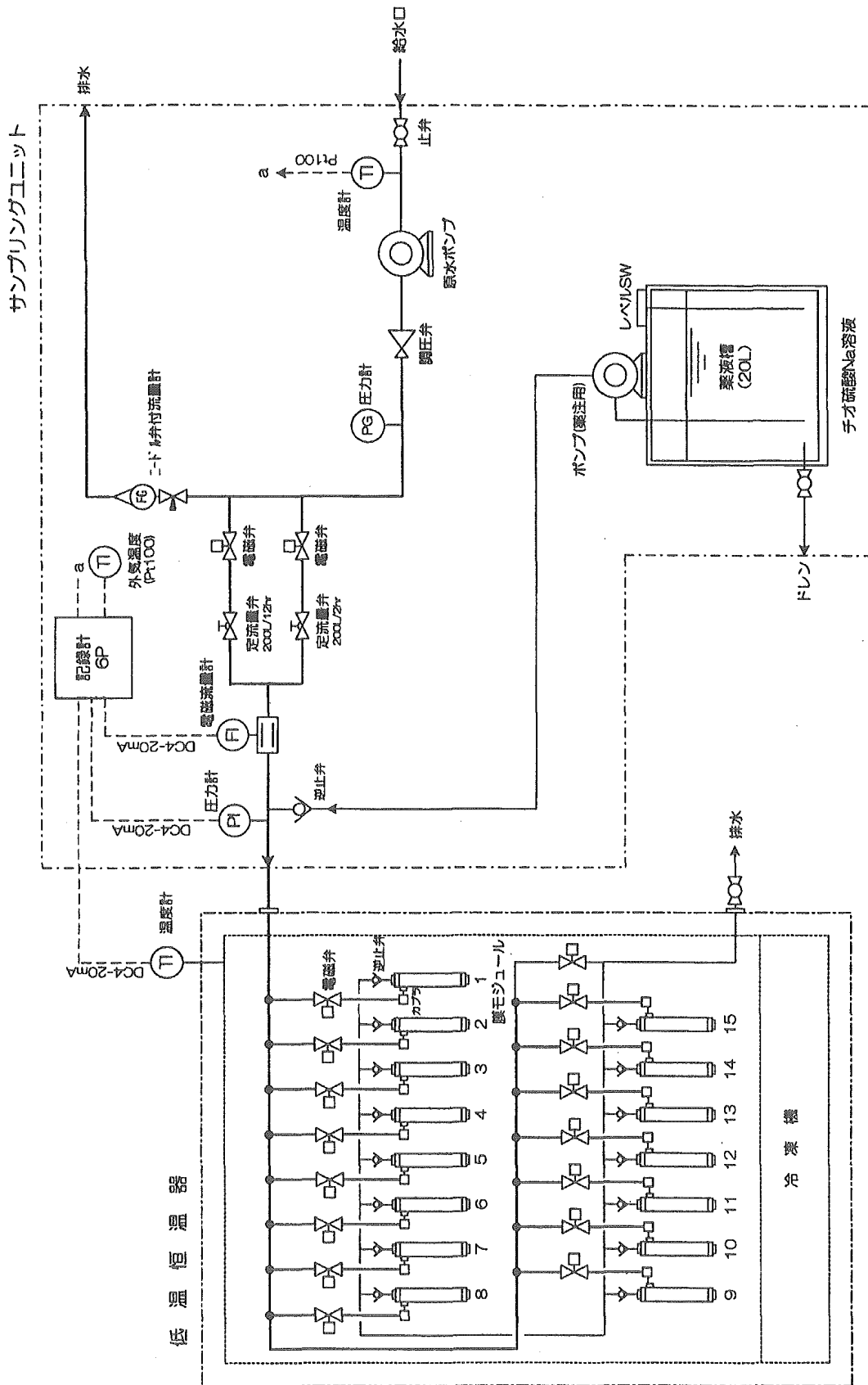
500 mL の水道水による逆洗程度では膜面に捕捉された *B. subtilis* 芽胞を十分に剥離させることができなかつたものと考えられた。同様に、UF 膜でも膜面積が広い MF-1 (0.6 m<sup>3</sup>) および MF-3 (0.2 m<sup>3</sup>) の回収率はそれぞれ 22% および 29% にすぎなかつたのに対し、膜面積が 0.1 m<sup>3</sup> の UF-1 および MF-2 の回収率はそれぞれ 91% および 92% であり、1 オーダー少ない 4,500 個の *B. subtilis* 芽胞を 50 L の水道水に添加した剥離回収試験の結果も、それぞれ 101% および 87% と高い回収率が得られた。

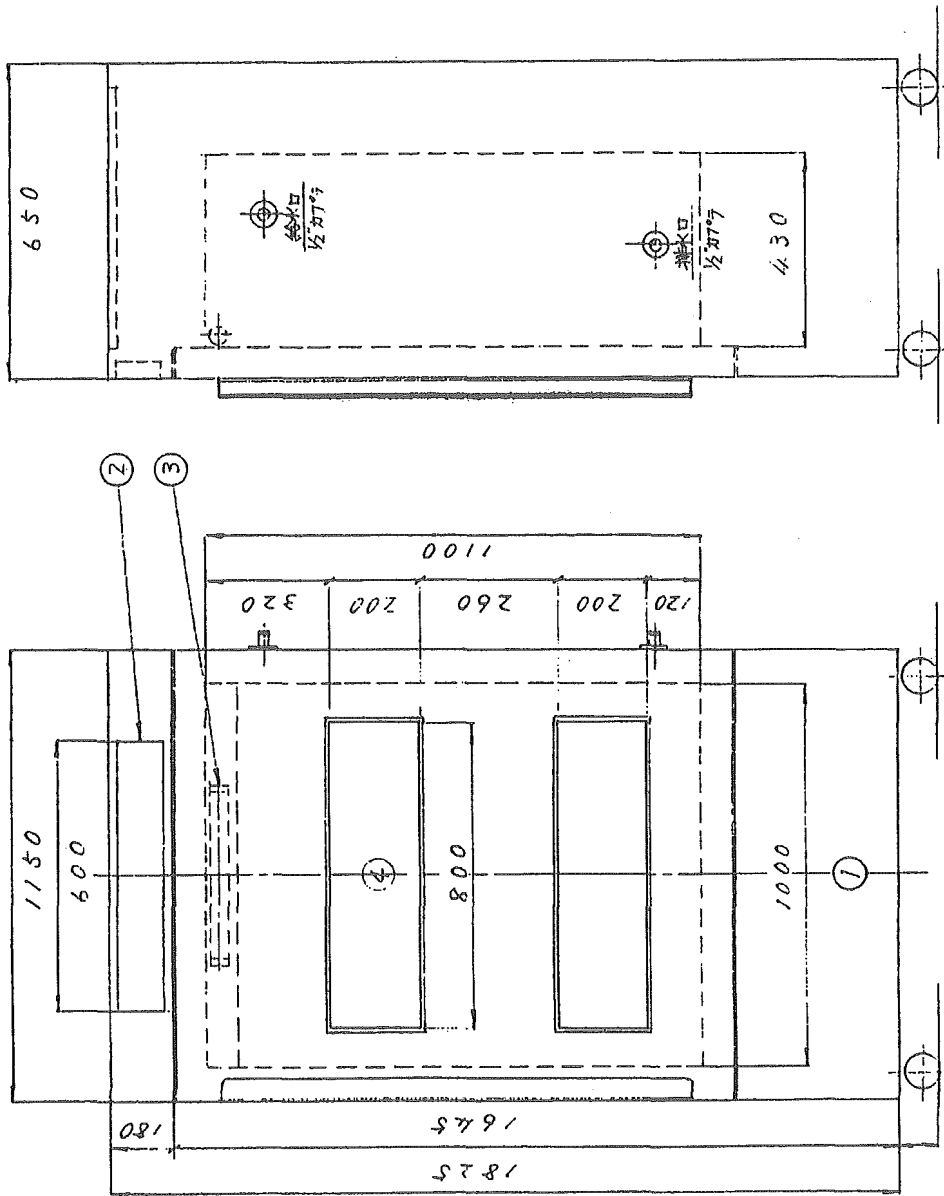
水道に対する微生物テロのおそれが高い確率で想定されるような緊急時には短時間でのチェックが必要となる。そこで、最も回収率が高く剥離操作が容易であつた UF-1 膜を用いて、4 時間で約 230 L の水道水のろ過を試みた。その結果、ろ過速度は 10% 程度しか減少せず、緊急時にも十分対応可能と判断された。この膜を用い、60 L の水道水に *B. subtilis* 芽胞を添加して調製した試料水をろ過速度 1,000 mL/min (60L/h) でろ過し、剥離回収した結果、240 mL/min (14.4L/h) でろ過した場合に比べて 10% 程度回収率が低下するものの、約 80% の *B. subtilis* 芽胞を回収することができた。

これらの結果は、膜の材質だけでなく、膜モジュールの膜面積やハウジング内中空糸充填密度などが剥離回収に大きく影響しうることを示している。

以上の結果に基づき、対象とした 6 種類の膜モジュールのうち、UF-1 と MF-2 が平常時に使用可能と判断された。そこで濃縮装置を試作するに当たっては、この 2 つの候補のうち、UF は MF に比べてウイルスも濃縮できる可能性が高いという利点があることを考慮し、最終的に UF-1 膜モジュールを選定し、濃縮装置を試作した。今後、この濃縮装置を現場に設置し、運転

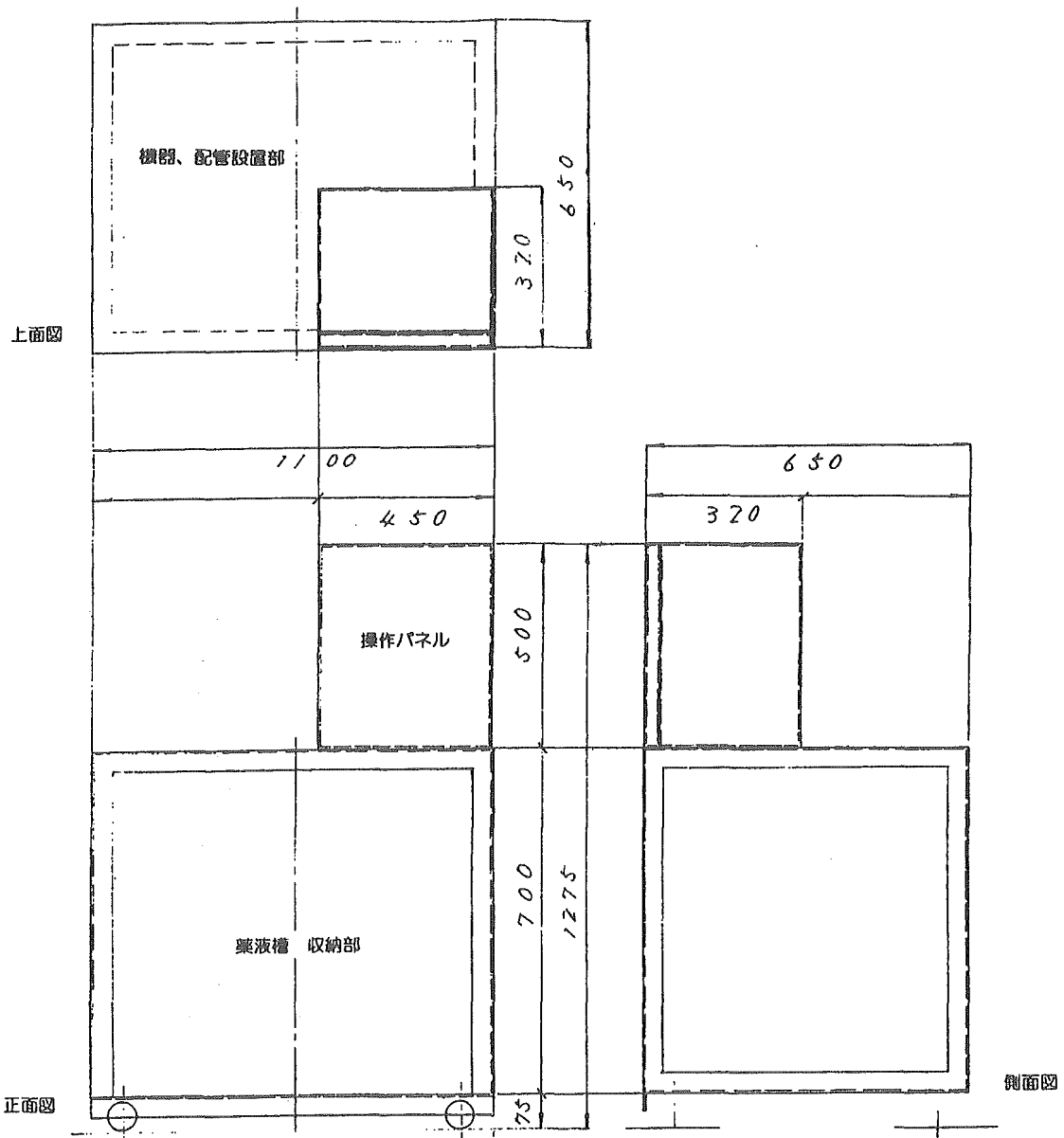
性能、操作性、利便性等について検討を加え、微生物テロの早期発見と被害防止のための水質管理の一助としたい。

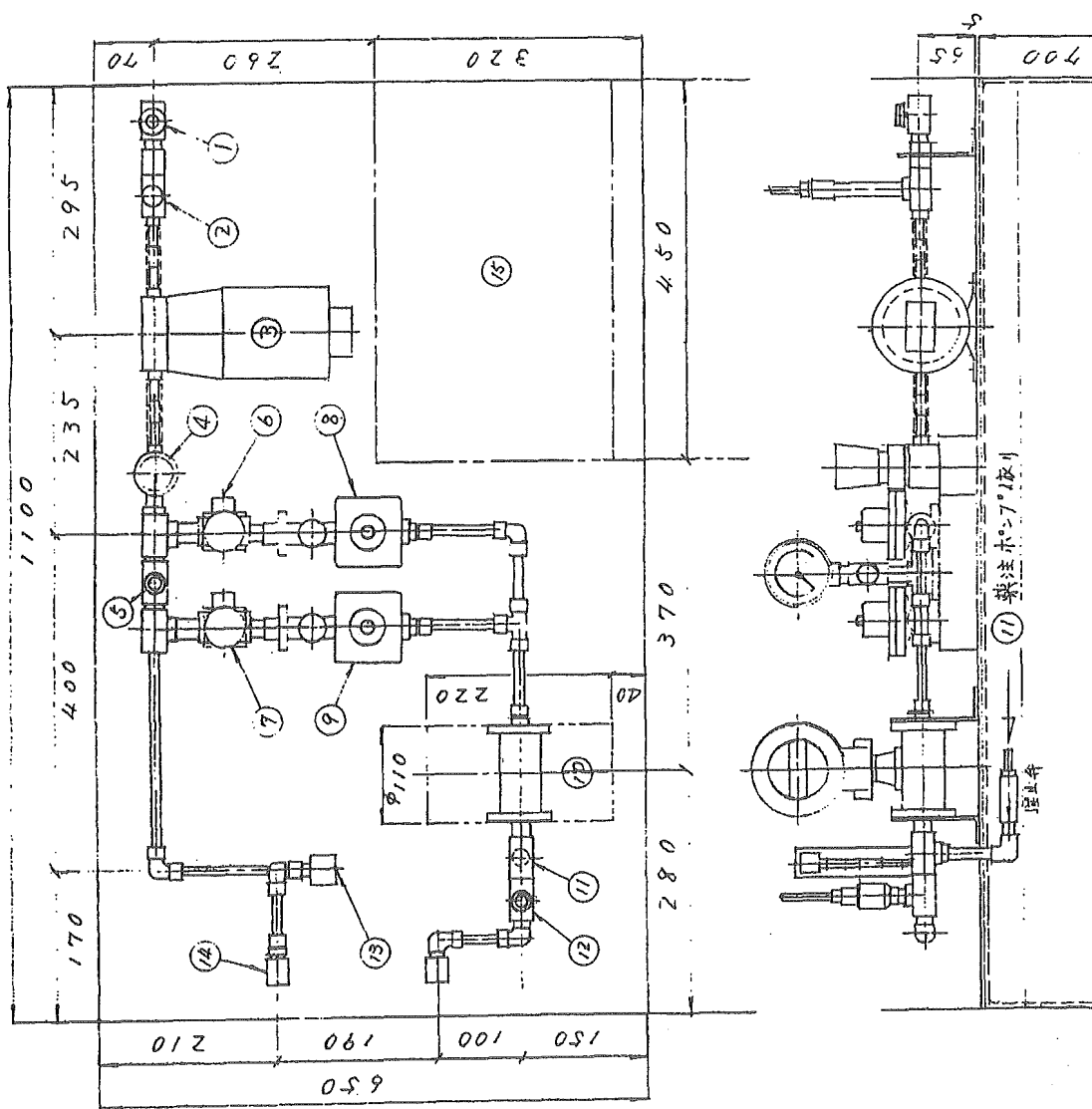




番号	品名及仕様	数
①	<p><b>低温恒温槽</b></p> <p>中空赤膜毛江-ル上下工校 子本 収鋼 温度 5°C ± 1°C 湿度 湿度 4 内積積 4 容積積 4 冷集積 4 (400% × 64% × 22% = 928%<sup>kg</sup>) デジタル表示 デジタル表示 過昇過冷防止回路付</p>	1
②	操作盤	1
③	室内灯	2
④	観察窓	2
	電源	A.C.100V20A
	設置上部設置 (伊州補)	
	20W蛍光灯(防水)	
	正面扉部 上下2ヶ所 ペア-硝子 (800×200%)	







15	排水口 (W450X D320X H500座)	1式
14	排水口	1ヶ
13	流量計=ト排水用 排水用 (RK400-V-5-号-W-2700座) KH-75	1ヶ
12	圧力計 A5-104 (鉛筆対指示 或DC分~20mA)	1ヶ
11	禁止弁 (排水用)	1ヶ
10	逆止弁 (針線計指爪 或DC分~20mA)	1ヶ
9	流量計 200L/2H	1ヶ
8	流量計 200L/2H	1ヶ
7	逆磁弁 2ポートババル型 (VPW2/35-03C-S.S05仕様)	1ヶ
6	逆磁弁 2ポートババル型 (VPW2/35-03C-S.S05仕様)	1ヶ
5	圧力計 0~0.5MPa (75号)	1ヶ
4	流量計 水用 口径=1.7 (44-2261-242-020)	1ヶ
3	排水口 (HDG-H456A100)	1ヶ
2	給水用 逆止弁 (鉛筆対指示 或DC分~20mA)	1ヶ
1	給水口 及 逆止弁	1ヶ
番号	品名 及 仕様	個数

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

分担研究報告書

ポリ塩化アルミニウム（Polyaluminium Chloride）凝集剤および  
炭酸カルシウムを用いた病原微生物濃縮装置

分担研究者	松野 重夫	国立感染症研究所感染情報センター
	遠藤 卓郎	国立感染症研究所寄生動物部
協力研究者	泉山 信司	国立感染症研究所寄生動物部
	高木 弘隆	国立感染症研究所バイオセーフティー管理室

水道水中に混入する病原微生物、特に細菌芽胞やクリプトスポリジウムオーシスト等の濃縮回収を目的とした装置の開発を行った。基本原理はポリ塩化アルミニウム（PAC：Polyaluminium Chloride）凝集剤を用いて水中の濁質を凝集沈殿させ、連続的に遠心回収した沈殿物（フロック）を用いて病原微生物を検出するものである。水道上水中でフロック形成を促すために炭酸カルシウムを濁質として強制添加する反応系を設定した。回収されたフロックを酸処理により溶解することで、水道水中の濁質を単離・回収することができる。得られた試料をPCR、顕微鏡観察、培養等に供し、病原体検出を行う。

## 1 濃縮装置

処理工程のフローチャートを図1に示した。第1槽を急速攪拌槽、第2槽を緩速攪拌槽とし、第1槽に水道水を連続的に注入し、これに一定比率で凝集剤、炭酸カルシウム（濁質）を同調注入して急速攪拌し、一定時間後に第2槽へ送液して緩速攪拌を行いフロックの成長を促す。緩速攪拌槽の底部よりフロックを効率的に連続遠心分離機に輸

送し、回収する。回収されたフロックを試料として病原微生物の検出試験を行う。

図2に急速攪拌槽および緩速攪拌槽の設計例を示した。急速攪拌槽の内容積を800ml、緩速攪拌槽の容積を1,600mlとし、10L/時間（=2.78ml/s）の流速で水道水を連続的に注入した場合、各槽における水道水の滞留時間は計算上では急速攪拌に5分間、および緩速攪拌に10分間を要する。後述のポンプのほかに攪拌槽間の送液ポンプを用意すれば、2系統の攪拌槽はビーカー等で代用することができる。炭酸カルシウム（CaCO<sub>3</sub>）は最終濃度40mg/Lとなるよに水道水に連続投入した。PACは最終濃度150mg/Lとなるよに注入する。具体的な手技では、後述の炭酸カルシウム懸濁液、およびPAC使用液を送液ポンプで水道水：炭酸カルシウム液：PAC使用液 = 63.3：1：1の比率で混合する。なお、炭酸カルシウム槽に内部指標として蛍光ビーズを添加し、蛍光ビーズの回収結果から回収操作の精度管理を行うことを推奨する。

送液ポンプの構成は以下の4系統からなる（図3）：急速攪拌層へ水道水の送液（ライン1）、緩速攪拌層から連続遠心機への送

液（ライン2）、急速攪拌層への炭酸カルシウム注入（ライン3）、急速攪拌層へのPAC注入（ライン4）。送液を同調させるには、1台のチュービングポンプに4台のポンプヘッドを接続して使用するのが簡便である。本冊子では、一例として7553-80型可変ポンプ（Cole-Parmer Instrument Co., Ltd.、アメリカ）と4つのポンプヘッド（7013-20型×2、7018-20型×2）、内径0.8および7.9mmのタイゴンチューブ（6409-13型、6409-18型）、連装用取り付け金具（7013-09型）の組み合わせを紹介した。これに類するポンプ、または複数台のポンプの組み合わせが考えられる。

送液量はチューブの径により規定されるが、ライン1および2は流量を扱えるように同じチューブとポンプヘッドを使用した。また、水道水と薬剤の送液量も一定の比率を保つように内径の異なったチューブを組

み合わせた。上記の組み合わせによる送液量の比は〔ライン1（水道水）：ライン3（薬液）＝63.3：1〕である。この系では、液量の「入り」と「出」の量比が（63.3+1）：63.3となり、僅かながら薬液の注入量だけ「入り」が多く、場合によって攪拌層にオーバーフローラインを用意する必要がある。

フロックの回収には卓上遠心分離機（H-112型、（株）コクサン、東京都）を使用した。なお、H-112型遠心機の標準使用では穴開きのローターが設置されているが、フロック回収用に穴のないローターに交換した。ローターの有効内容積は170mlであることから、試料水の滞留時間は約1分と計算される。ローターの半径は50mmで、1,700rpm 150×gで運転した。ローター内には厚めのビニール袋をセットし、フロック回収を行った。

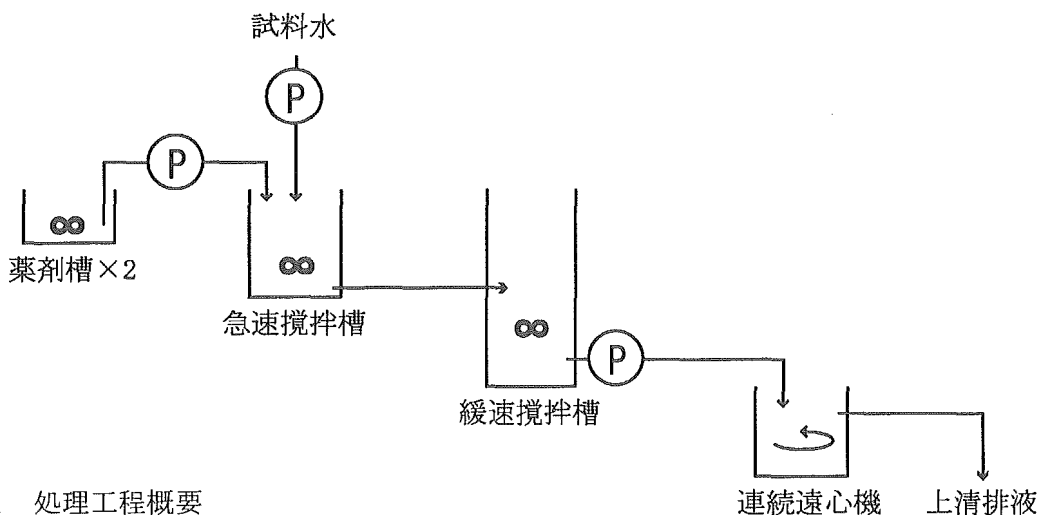


図1 処理工程概要

水道水を連続的に急速攪拌槽に送水し、PACおよび炭酸カルシウム（濁質）を同調して連続注入する。急速攪拌槽で水道水と2薬を急速攪拌する。その後、緩速攪拌槽へ送液して緩速攪拌を行いフロックの成長を促す。緩速攪拌槽の底部よりフロックを連続遠心機に輸送し、回収する。回収されたフロックを試料として病原微生物の検出試験を行う。

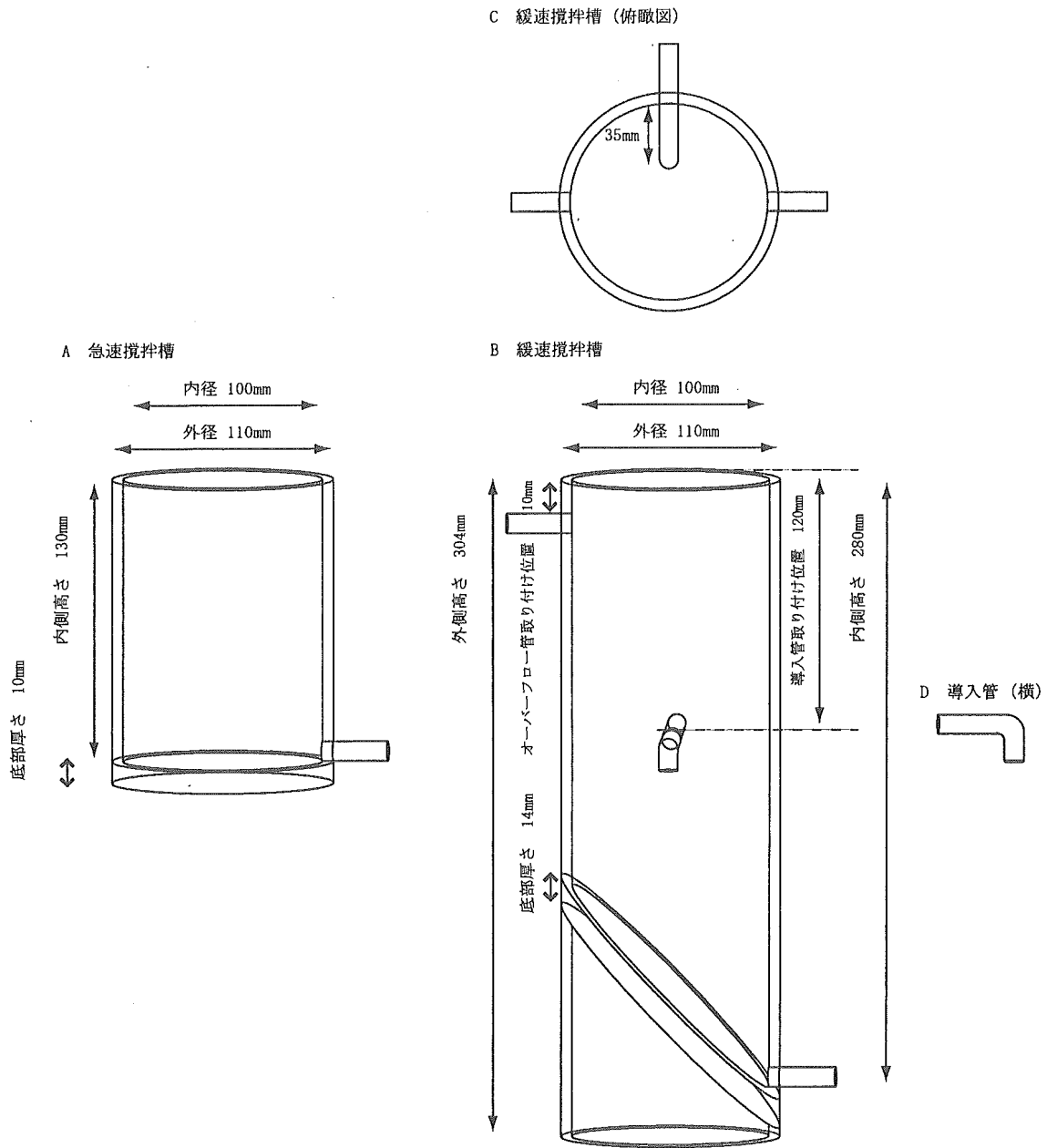


図 2 攪拌槽設計

- A : 急速攪拌槽は、内径 100mm のアクリルパイプの一端を塞いだもので、底部側面に排水管が取り付けられている。
- B : 緩速攪拌槽の底板は 45 度以上の傾斜で取り付けられており、内容積は急速攪拌槽の 2 倍となっている。槽の middle に急速攪拌槽からの試料水の送水管 (D)、底部に排水管が設置されている。
- C : 緩速攪拌槽に取り付けられた送水管と、配水管は直行するよう配置されている。

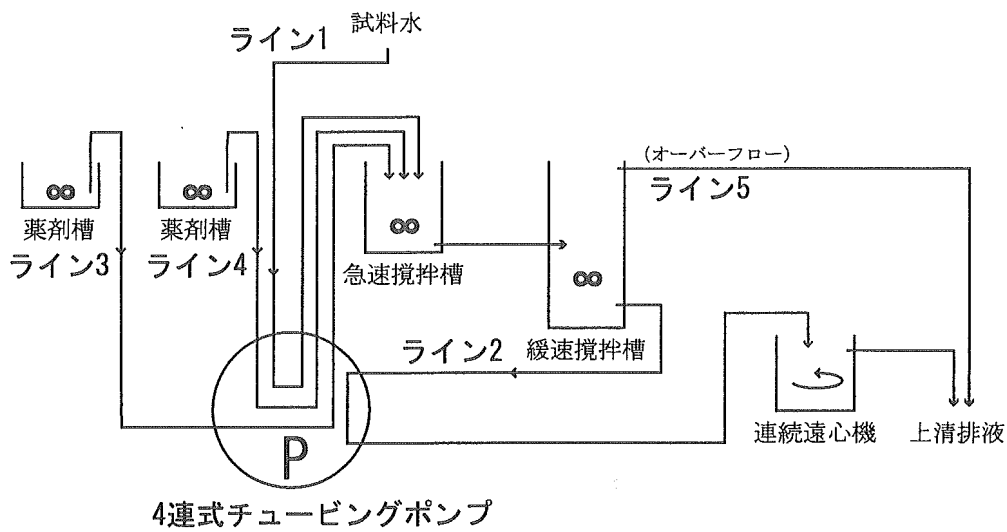


図3 ポンプによる送液

試料水を急速攪拌槽に  $2.78\text{mL/s}$  ( $=10\text{L/h}$ ) の流速で連続的に送液する。同時に PAC および炭酸カルシウムをそれぞれ  $43.9\ \mu\text{L/s}$  (各々、試料水の  $1/63.3$  に相当) の流速で連続注入する。急速攪拌槽の容積は  $800\text{mL}$  で、上記の送液条件では試料水の滞留時間は 5 分となる。急速攪拌槽と緩速攪拌槽はパイプで直結されていることから、急速攪拌槽から緩速攪拌槽への試料水の移送は緩速攪拌槽からライン2で連続遠心機に送液される量となる。緩速攪拌槽の容積は  $1,600\text{mL}$  で、試料水の滞留時間は 10 分となる。連続ローターの有効内容積は  $170\text{mL}$  で、試料水が遠心力を受ける時間の理論値は  $61.2$  秒となる。ライン5はオーバーフロー用で、急速攪拌槽への送液量と緩速攪拌槽からの流出量の差を調整する。

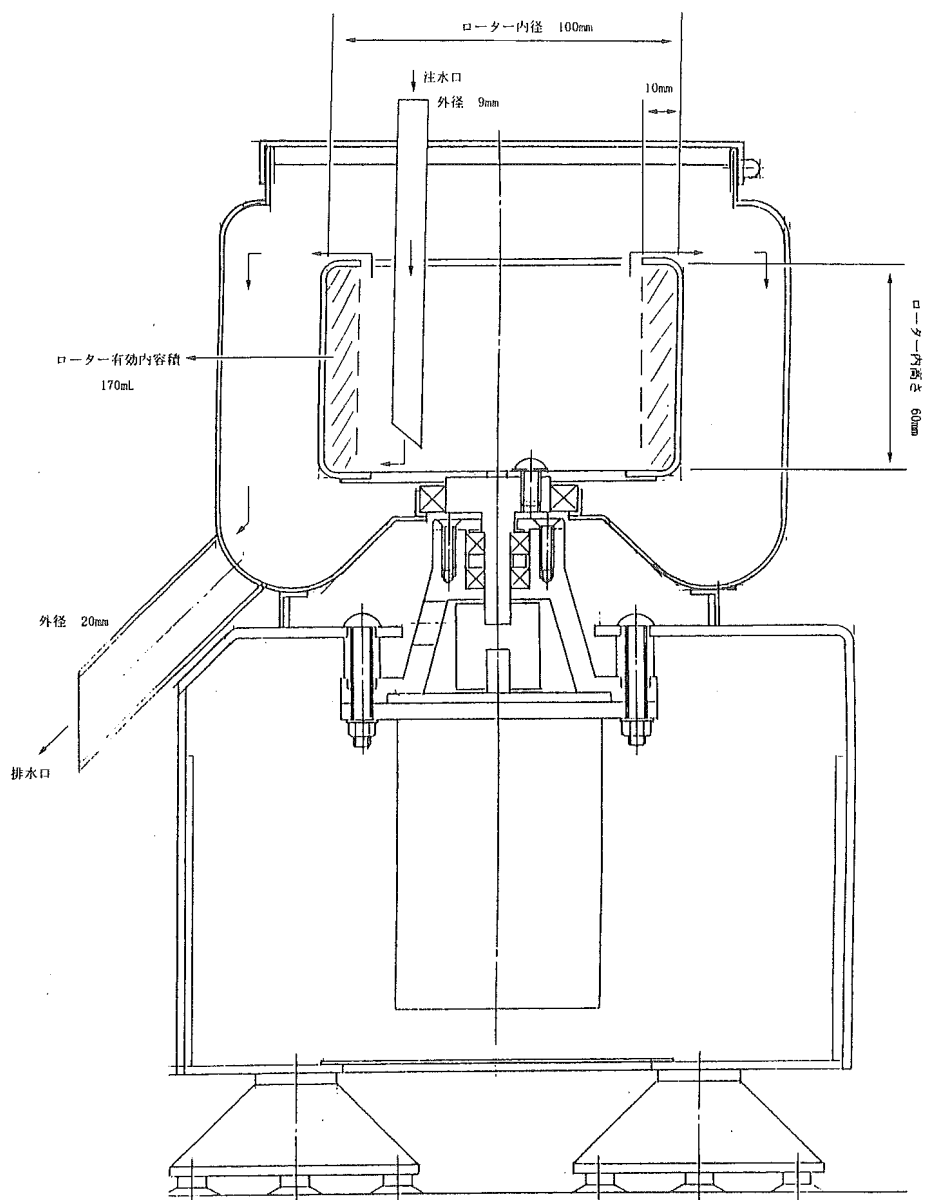


図4 連続遠心機

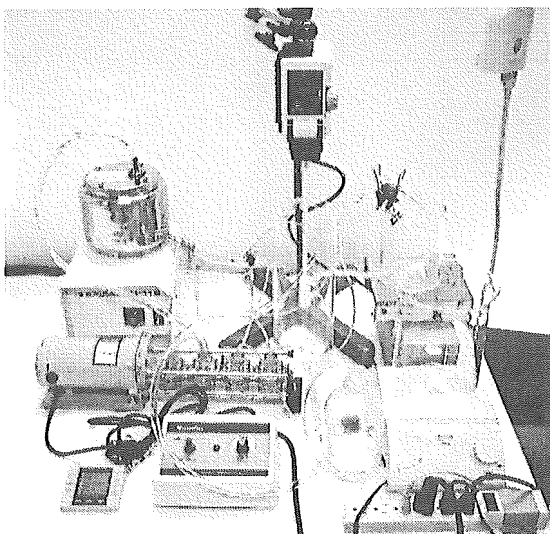
ローターは SUS304 ステンレスを組み合わせ加工したもので、内径は 100mm、高さは 60mm である。試料は、ふたに取り付けられた管を介してローターの底部に連続注入される。試料水の流れは図中に矢印で示した。ローター上部には 10mm の縁があり、ローター回転中は図中の斜線で示した範囲に凝集沈殿物が蓄積する。この容積は 170mL である。ローターの縁からあふれた液が上清として排出される。

## 2 器具の設定

### 2.1 試薬

- 1) 精製水 (脱イオン水等)。
- 2) 蛍光ビーズ：例えばクリプトスポリジウムトレーサービーズ ((財) 水道技術研究センター)。約  $10^6$  個/mL となるように 0.01% Triton X-100 溶液に分散・懸濁したもの。
- 3) 炭酸カルシウム懸濁液：5.06g の炭酸カルシウム ( $\text{CaCO}_3$ ) を 2L の精製水に懸濁し、これに既知濃度の蛍光ビーズ (ex.  $1.27 \times 10^6$  個) を加える。
- 4) PAC 使用液：ポリ塩化アルミニウム (Polyaluminium Chloride) 12.7ml を 2L の精製水に添加する。
- 5) 1% および 0.001% Triton X-100 溶液
- 6) 1M 塩酸
- 7) Tris 添加塩化ナトリウム溶液：10mmol Tris、1mmol EDTA 添加 0.15M 塩化ナトリウム (NaCl) 溶液。滅菌後、室温保存する。

### 2.2 器具



- 1) 800 および 1600ml の入るアクリル樹脂の槽 (ビーカー等で代用可)
- 2) 20×17cm 程度に切った厚手のビニール袋 (例：ユニパック H-4 型、(株) 生産日本社)
- 3) 100mL、1000mL のメスシリンダー
- 4) スターラー 2 台、および攪拌子
- 5) 高さ調整台
- 6) 投げ込み式攪拌機 (例：SM-104 型アズワン (株))、攪拌棒とハネ、スタンド
- 7) 25mL ピペットおよびピペッター
- 8) 可変ポンプ (例：7553-80 型、Cole-Parmer Instrument Co., Ltd.、アメリカ)、4 つのポンプヘッド (7013-20 型×2、7018-20 型×2)、内径 0.8 および 7.9mm のタイゴンチューブ (6409-13 型、6409-18 型)、連装用取り付け金具 (7013-09 型)
- 9) 内径 19mm 程度のビニールホース
- 10) H-112 型連続遠心機 ((株) コクサン)
- 11) 直径 10cm、厚さ 1mm のシリコンゴム製の円
- 12) 高速冷却遠心機

### 2.3 装置のセットアップ

図 3 および 5 を参照のこと。

#### 図 5 設置例

急速攪拌層と緩速攪拌層は同じ水準を保った状態で接続する。チューブを適宜槽に固定する。緩速攪拌層にある投げ込み式の攪拌機の手は比較的下部で固定する。試料水の導入は蛇口に直結せず、水をビーカーに受けた。

エアロゾルの発生に注意する。

(配管系の詳細は前述の図 3 を参照のこと。)



### 3 操作手順

#### 3.1 運転開始

- 1) 急速攪拌槽に 800ml、緩速攪拌槽に 1.6L の試験水を入れる。
- 2) 連続遠心機のローターの底に、シリコンゴムシートを敷く（ビニール溶解防止）。
- 3) ローターに、20×17cm のビニール袋をセットする。170mL の試料水を入れ、短時間運転し、ビニールをローターに馴染ませる（要確認）。
- 4) 1,700rpm (150×g) で運転を開始する。
- 5) 上水のライン 1 への供給を開始し、送液ポンプを高速運転し、ライン 1 および 2 の気泡を除去する。
- 6) 数分間ポンプを低速運転し、遠心機からの液の排出量をメスシリンダー測定し、167mL/min となるようにポンプ速度を調整する。
- 7) ポンプを停止する。
- 8) 連続遠心機を停止する。ローター内に液が残ることを確認する。
- 9) 薬剤層 1 に 12 時間分の炭酸ナトリウム懸濁液を充填し、炭酸ナトリウムが沈殿しないように強く攪拌する。
- 10) 薬剤層 2 に 12 時間分の PAC 使用液を充填する。
- 11) 急速攪拌槽の攪拌を開始する。
- 12) 緩速攪拌槽の攪拌を開始する。（当初 200～300rpm 程度）
- 13) 上述の炭酸ナトリウム液および PAC 使用液を、急速攪拌槽には 13mL ずつ、緩速攪拌槽には 25mL ずつ添加する。（最終濃度は炭酸ナトリウムが 40mg/L、PAC が 150mg/L）
- 14) 2 分間、攪拌する。
- 15) 緩速攪拌槽の攪拌を 30～40rpm 程度に

減速する。

- 16) さらに 5 分間、攪拌する。
- 17) 連続遠心機の運転を開始する。
- 18) 送液ポンプの運転を開始する。運転開始時間を記録に取る。（運転開始後しばらく経過したら、連続遠心機からの排出液を 5 分間計量し、この液量が 800±40mL であることを確認する。液量が許容範囲外の場合はポンプの目盛を調整し、液量の確認を繰り返す。）
- 19) 定期点検項目として、連続遠心機からの排液中にブロックが漏れていないこと、薬剤の注入ラインに目詰まりがないこと、ビーカーへの水道水の供給量が充分であること、各ラインで液漏れがないことなどに注意する。

#### 3.2 運転一時停止

- 1) ポンプを停止する。
- 2) 連続遠心機を停止する。（攪拌装置は運転を継続する。）

#### 3.3 運転再開

- 1) 連続遠心機の運転を開始する。このとき、ローターのバランスに注意する。
- 2) ポンプの運転を開始する。

#### 3.4 フロックの回収

- 1) 緩速沈殿槽の底部等にフロックが蓄積されている場合は、攪拌方向を逆転させる。
- 2) 3.2 に従って、運転を一時停止する。
- 3) 運転時間を記録に取る。ビニール袋を取り出し、200ml 程度のビーカー内に静置する。このフロックを病原微生物の検出試験に供する。

- 4) 次の運転を開始するには、ローターに新しいビニールを取り付け、3.3 に従い運転再開を行う。

### 3.5 運転終了

- 1) 薬液ラインをビーカーから取り出し、薬液注入を停止する。
- 2) 精製水でラインをすすぐ。
- 3) 運転終了時間を記録する。
- 4) 上水の供給を停止する。(供給停止後、15分程度の運転で両攪拌槽の水はなくなる。)
- 5) 急速攪拌槽および緩速攪拌槽を精製水ですすぎ、すべてのフロックを遠心機に送る。
- 6) 攪拌装置をすべて停止させる。
- 7) 送液ポンプを停止する。
- 8) 連続遠心を停止する。ローターからフロックの入ったビニールを回収する。

### 3.6 保守

- 1) 1日ごと、もしくは送液速度を変化させた際に、送液速度を確認する。
- 2) 200時間ごと、もしくは送液速度が半減したら、ポンプヘッド内のチューブを交換する。
- 3) 2,000時間ごとに、チュービングポンプのギアを取扱説明書にある手順に従って点検する。

### 4 フロックからの微生物の回収方法

- 1) 連続遠心機の回収液(約170mL)中のフロック量は使用するPACの濃度および連続運転時間により異なり、表1に示すようにPAC150ppm、2時間の運転では30mL、12時間で170mLとなる。
- 2) 回収液170mlに対し、1%TritonX-100

を200 $\mu$ L加えて、フロックを砕かないように攪拌し、50mL遠心チューブに分注する。分注する本数は、沈渣量およびこれから添加する塩酸の量に従う。

- 3) 1,000 $\times$ gで短時間(30秒間ほど)遠心し、ブレーキを解除して停止し、上清を除く。
- 4) ボルテックスミキサーを用いて攪拌し、沈渣をほぐす。チューブをまとめる際のすすぎ液には0.001%Triton X-100溶液を用いる。
- 5) 表1にある塩酸量を参照して、1M塩酸を滴下・攪拌してフロックを完全に溶解する。(1molの炭酸カルシウムを溶解するのに必要な塩酸は2molであるが、酸性下で水酸化アルミフロックの乖離を促す必要性から、表1の条件は塩酸過剰に設定してある。炭酸カルシウムに塩酸を添加する際、CO<sub>2</sub>発生に伴い発泡するので蓋をしめない。)
- 6) 発泡が収まってから、遠心チューブの蓋をしめて強く攪拌し、残った炭酸カルシウムを溶解する。
- 7) 5,200 $\times$ g程度10分間遠心し、沈渣を得る。
- 8) 沈渣に0.001%Triton X-100溶液を適量加えて懸濁する。
- 9) 懸濁液を15mL遠心管に移す。(最少本数にまとめる。)
- 10) 5,200 $\times$ g10分間遠心し、沈渣を得る。
- 11) Tris添加塩化ナトリウム液を適量加えて懸濁する。
- 12) 5,200 $\times$ g10分間遠心し、沈渣を得る。
- 13) 濃縮量に応じて沈渣を適量(～1mL)のTris添加塩化ナトリウム液に懸濁する。懸濁液をPCR、顕微鏡観察、培養等の検出系の試料とする。
- 14) 蛍光顕微鏡で蛍光ビーズの回収率を確認する。

表1 フロックの溶解に必要な塩酸量等\*

濃縮時間	試料水濃縮量	CaCO <sub>3</sub> 使用量	フロック遠心後容積	1M塩酸量	50mLチューブ数
ジャーテスト	1L	40mg	2mL	1mL	1
1h	10L	400mg	24mL	10mL	1
2h	20L	800mg	30mL	20mL	2
3h	30L	1.2g	40mL	30mL	2
4h	40L	1.6g	60mL	40mL	3
6h	60L	2.4g	90mL	60mL	4
12h	120L	4.8g	170mL	120mL	8

\*各数値は、処理速度10L/h、炭酸カルシウム40mg/L、PAC150mg/Lの条件下における目安を示している

## 5 回収率の検討

炭酸カルシウムおよび PAC による凝集沈殿の有効性について確認実験を行った。枯草菌芽胞または *Cryptosporidium* トレーサービーズと水道水の混合液 20L を用意し、炭酸カルシウムおよび PAC をそれぞれ 40mg/L、150mg/L (ビーズの際は 30mg/L) となるように添加した。枯草菌芽胞は 80°C 20 分の熱処理を行い、栄養体を除いた。芽胞回収の際は、0.2g のチオ硫酸ナトリウムの添加により水道水に含まれる残留塩素を中和した。*Cryptosporidium* トレーサービーズとは、*Cryptosporidium* と同じ 5 $\mu$ m の粒径を持つアクリル粒子で、凝集沈殿ろ過の処理の評価を目的として開発された市販の製品である。

先に記した方法に従い、凝集沈殿物より芽胞、あるいはビーズを回収した。フロックの酸処理後に芽胞を培地に接種し、37°C 16 時間の培養後にコロニー数を計数し、回収率を求めた (表 2)。ビーズはフローサイトメーターを用いて計数した (表 3)。枯草菌芽胞は約 60% が回収された。これは一般の浄水処理における除去率と遜色ない結果と考えられた。一方のビーズは枯草菌芽胞より若干高い約 80% の回収率が得られた。結果には示していないが芽胞の回収には高濃度の PAC を必要とし、30mg/L の条件では 50% に満たない回収率しか得られなかつ

た。

フロックに取り込まれた粒子の顕微鏡観察を行った。100mL ビーカーに水道水、ビーズおよび大腸菌を入れ、炭酸カルシウム 40mg/L および PAC 30mg/L の条件下において凝集沈殿を行った。フロック中にある枯草菌芽胞の観察は困難であることから、ここでは大腸菌を用いた。急速攪拌を 2 分間、緩速攪拌を 5 分間、静置 10 分間の後にフロックを一部とり、観察した。大腸菌およびビーズが凝集塊中に取り込まれた様子が蛍光顕微鏡を用いて観察された (図 6)。大腸菌は SYBR Green I で染色することで、B 励起下で緑色蛍光を発する微細な桿状体 (短桿菌) として観察された (図 6a)。フロックを微分干渉顕微鏡で観察すると、蛍光の分布とフロックの分布が一致しており、これらの蛍光粒子はフロック内に効率的に取り込まれていることが確認された (図 6b)。同様に、フロック中のトレーサービーズが UV 励起下で青い蛍光を発する様子が観察された (図 6c)。

フロックから酸処理後に沈渣を回収し、沈渣を顕微鏡観察および DNA 精製用試料として検査に供することが可能である。なお、ほとんどの微生物は酸処理により失活・破壊されることから、本方法は細菌の芽胞やクリプトスポリジウムオーシストなどの耐性を持つ微生物を対象とした場合に

適用される。

(Logsdon GS. 微生物と飲料水ろ過. In Drinking water microbiology. Ed. MvFeters GA. 1990, Springer-Verlag. (飲料水の微生物学、金子 光美 監訳、pp109-135))。

表 2 枯草菌芽胞回収率

No.	% recovery
1	61
2	69
3	56
4	50
Average	59

20L の水道水に枯草菌芽胞 約  $1 \times 10^7$  を添加し、流速 10L/h、 $\text{CaCO}_3$  40mg/L、PAC 150ppm の条件下において、芽胞の回収実験を行った結果を示した。

表 3 蛍光ビーズ回収率

No.	% recovery
1	75
2	86
3	101
4	82
Average	86

20L の水道水に蛍光ビーズ ( $5\mu\text{m}$ )  $9 \times 10^4$  個を添加し、流速 10L/h、 $\text{CaCO}_3$  40mg/L、PAC 30ppm の条件下において、蛍光ビーズの回収実験を行った結果を示した。

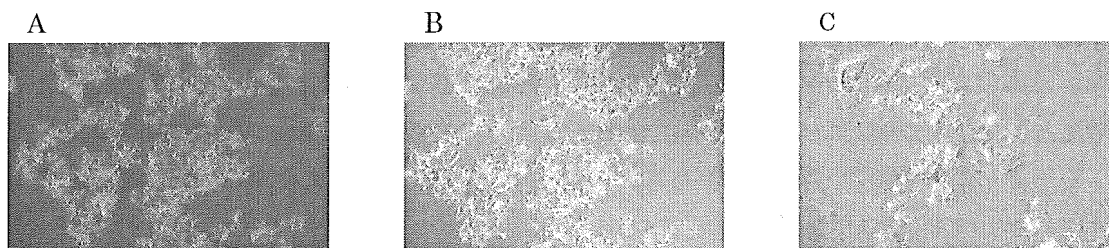


図 6 凝集沈殿による捕集の様子