

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年1月26日(26.01.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/013731 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 7/02 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/070663
- (22) 国際出願日: 2015年7月21日(21.07.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: D I C 株式会社(DIC CORPORATION)
[JP/JP]; 〒1748520 東京都板橋区坂下三丁目3番5号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 平橋 智裕(HIRAHASHI Tomohiro); 〒2858668 千葉県佐倉市坂戸631番地 D I C 株式会社 総合研究所内 Chiba (JP). 中熊 大英(NAKAGUMA Hirohide); 〒2858668 千葉県佐倉市坂戸631番地 D I C 株式会社 総合研究所内 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 河野 通洋(KONO Michihiro); 〒1038233 東京都中央区日本橋三丁目7番20号 D I C 株式会社内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,

BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PURIFIED VIRUS SOLUTION, METHOD FOR DETECTING VIRUS, AND VIRUS PURIFICATION MEMBER

(54) 発明の名称: 精製ウイルス液の製造方法、ウイルス検出方法及びウイルス精製部材

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: a method for producing a purified virus solution, whereby it becomes possible to collect and purify only a virus specifically while trapping humic acid that is a contaminant; and a virus purification member which enables the aforementioned virus purification. A method for producing a purified virus solution, comprising a step of bringing a sample solution containing a virus and humic acid into contact with a base member that has, on the surface thereof, a functional group A of which a conjugated acid has a pKa value of 8.0 to 9.9, said method being characterized in that the functional group A comprises a single functional group.

(57) 要約: 夾雑物であるフミン酸はトラップしたまま、ウイルスのみを特異的に回収し精製することができる精製ウイルス液の製造方法、及び該ウイルス精製を行えるウイルス精製部材を提供することを課題とする。ウイルス及びフミン酸を含有するサンプル液と、共役酸のpKaが8.0~9.9である官能基Aを表面に有する基材とを接触させる工程を有する、精製ウイルス液の製造方法であって、上記官能基Aが単一の官能基であることを特徴とする、製造方法。

WO 2017/013731 A1

明 細 書

発明の名称：

精製ウイルス液の製造方法、ウイルス検出方法及びウイルス精製部材 技術分野

[0001] 本発明は、精製ウイルス液の製造方法、ウイルス検出方法及びウイルス精製部材に関する。

背景技術

[0002] 安全志向が高まる近年、河川水や海水といった環境水、水道水や井戸水等の生活用水、土壌や食品等、我々を取り巻く環境に対する安全性の担保が非常に重要視されている。特に環境水や生活水が各種ウイルスによって汚染されると、近隣住民へと爆発的に感染し、甚大な健康被害を生じる恐れがあり、とくに開発途上地域における生活用水のウイルス汚染は大きな問題となっている。

[0003] これらを鑑み、環境中のウイルス汚染を恒常的に監視することは、人々の安全安心を維持していく上で非常に重要であり、そのためには簡便で正確にウイルス量を評価する方法を確立することが急務である。

[0004] しかし、様々な環境、特に環境水中のウイルス量はごく少量であるため、検出することが非常に難しいということが課題となっている。そこで、ウイルスを濃縮回収したうえで、ウイルスを検出する方法が試みられてきた。

[0005] 例えば、ウイルス検出に用いる試料を、超遠心やポリエチレングリコール法などによって濃縮する方法などが知られている。

[0006] また、特許文献1においては、表面処理された中空糸にウイルスを含む液を通じてウイルスを捕捉し、ウイルスの濃度を評価する方法が報告されており、その際には、必要に応じて限外ろ過膜で2次濃縮を行う場合もある。

[0007] 上記のような方法でウイルスを濃縮回収し、得られたウイルス液を、各種方法で検出、同定を行う。一般的によく行われるのが、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）等に代表される核酸増幅検査（NAT）法である。NAT法

は、ウイルスに含まれる核酸を人工的に増幅して高感度に検出する方法であり、ウイルスに特異なプライマーによって検出を行う場合や、遺伝子を増幅させた後にハイブリダイゼーション等で同定を行う。

[0008] しかし、上記のようなウイルス濃縮方法では、環境中に存在する N A T 法を阻害する物質であるフミン酸も同時に回収してしまうという問題があった。

[0009] フミン酸とは、環境中に存在する腐植物質の一種であり、植物残差や微生物、プランクトンの遺骸が微生物による分解を受け、その分解生成物から化学的、生物的に合成された高分子有機酸の混合物である。腐植物質はフミン質とも呼ばれ、アルカリ溶液に可溶だが、酸性溶液では沈殿を形成するフミン酸、どの pH でも可溶なフルボ酸、及びアルカリに不溶なヒューミン（またはフムス質）が存在する。フミン質は、動植物由来物質であることから、土壌・海水・河川湖沼水や排水・廃棄物等、環境中のあらゆる場所に存在する。フミン質は、動植物由来であることから不定形の高分子物質であるが、芳香環族を多数有する三次元網目状構造をもつものが多い。その中でもフミン酸は、水酸基やカルボキシル基と言った酸性基を一つ以上有するポリフェノール型カルボン酸であることが多く、その構造から金属類のキレート性を有し、工業的にはキレート剤として用いられる。

[0010] 一方、ウイルスの回収及び同定を行う際に N A T 法を用いる場合、このフミン酸が阻害物質として働くという問題点があった。フミン酸は上記のように様々な環境中に存在することから、環境中から得たサンプル中へのフミン酸のコンタミネーションは避けられず、環境中からウイルスを濃縮したとしてもフミン酸まで回収してしまうと、N A T 法での検出が行えなくなり、ウイルスが存在しているのにもかかわらず不検出と判断されてしまう為、環境安全に対する脅威となっている。

[0011] 上記問題を解決する為に、特許文献 2 においては、特定の細孔を持つシリカゲルにフミン酸等の夾雑物を吸着させることによる、ウイルス検出率の向上方法が報告されている。しかし、細孔の大きさに依存した非特異的な吸着

であるため、定量的測定には不十分であるといった問題があった。

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1：国際公開第2012／144554号

特許文献2：特開2011－155919号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明の課題は、夾雑物であるフミン酸はトラップしたまま、ウイルスのみを特異的に回収し精製することができる精製ウイルス液の製造方法、及び該ウイルス精製を行えるウイルス精製部材を提供することを課題とする。また、該精製ウイルス液の製造方法によって得られる精製ウイルス液を用いたウイルス検出方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは鋭意検討の結果、所定の基材を適用することにより上記課題が解決されうることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0015] すなわち、上記課題は、以下の手段により達成される。

[0016] (1) ウイルス及びフミン酸を含有するサンプル液と、共役酸の pK_a が8.0～9.9である官能基Aを表面に有する基材とを接触させる工程を有する、精製ウイルス液の製造方法であって、上記官能基Aが単一の官能基であることを特徴とする、製造方法；

(2) 前記サンプル液と接触させた前記基材を、 pH 10～12の回収液に接触させる工程をさらに有する、(1)に記載の製造方法；

(3) 前記基材が中空糸膜である、(1)または(2)に記載の製造方法；

(4) 前記官能基Aがアミノ基である、(1)～(3)のいずれかに記載の製造方法；

(5) 前記サンプル液の pH が3.0～9.0である、(1)～(4)の

いずれかに記載の製造方法；

(6) ウイルス及びフミン酸を含有するサンプル液と、共役酸の pK_a が8.0～9.9である官能基Aを表面に有する基材とを接触させる工程と、 pH 10～12である回収液を基材と接触させる工程と、基材と接触後の回収液を回収して得られる精製ウイルス液をウイルス検出工程にかける工程とを有し、前記官能基Aが、単一の官能基であることを特徴とする、ウイルス検出方法；

(7) 共役酸の pK_a が8.0～9.9である官能基Aを表面に有する基材を有し、前記官能基Aが単一の官能基であることを特徴とする、ウイルス精製部材。

発明の効果

[0017] 本発明の精製ウイルス液の製造方法は、夾雑物であるフミン酸を濃縮することなく、ウイルスのみを特異的に回収し濃縮することができることから、ウイルス検出方法に対し感度よく定量的なウイルス含有試験液を提供することが可能である。

発明を実施するための形態

[0018] 本発明は、ウイルス及びフミン酸を含有するサンプル液と、共役酸の pK_a が8.0～9.9である官能基Aを表面に有する基材とを接触させる工程を有する精製ウイルス液の製造方法であって、上記官能基Aが単一の官能基であることを特徴とする。

[0019] 本発明の官能基Aを有する基材は、サンプル液中のウイルス及びフミン酸を吸着することができる。この時、官能基Aの共役酸の pK_a が8.0～9.9であり、なおかつ単一の官能基である時、回収液を基材に接触させると、フミン酸を吸着したままウイルスのみを溶出できることから、フミン酸が除去された精製ウイルス液（すなわち、フミン酸は濃縮されることなく、またはほとんどなく、ウイルスのみを特異的に濃縮したウイルス液）を得ることができる。得られた精製ウイルス液はフミン酸が選択的に除去されているため、その後のウイルス検出工程を精度よく定量的に実施することができる。

。

[0020] [ウイルス及びフミン酸を含有するサンプル液]

本発明におけるウイルス及びフミン酸を含有するサンプル液とは、ウイルス及びフミン酸が含まれる水媒体の液体である。ウイルス及びフミン酸を含有するサンプル液は、ウイルスを含有すると思われるサンプルを水に混濁すればよく、ウイルスを含有するサンプルとは、河川水・湖沼水・海水・雨水といった環境水、井戸水・水道水・ボトルドウォーターといった飲料水や下水・排水・プール水・農業用水・工業用水・冷媒水といった産業用水に代表される生活用水；食品、土壌、動植物、血液等の体液など、様々なものをサンプルとして用いることができる。

[0021] ウイルス及びフミン酸を含有するサンプル液は、ウイルスを含有するサンプルを水に混濁することによって得られ、例えば環境水や生活用水のような液体サンプルであれば滅菌水で希釈すればよく、固形サンプルであれば滅菌水で混濁した上清や、固形サンプル表面を滅菌水で洗浄した洗浄液等もサンプル液として用いることができる。

[0022] 本形態に適用可能なウイルスとしては、特に制限されず、2本鎖DNAウイルス、1本鎖DNAウイルス、2本鎖RNAウイルス、1本鎖RNAウイルス、1本鎖RNA逆転写ウイルス、2本鎖DNA逆転写ウイルス等が挙げられる。

[0023] 前記2本鎖DNAウイルスとしては、アデノウイルス、ポドウイルス等が挙げられる。

[0024] 前記1本鎖DNAウイルスとしては、パルボウイルス等が挙げられる。

[0025] 前記2本鎖RNAウイルスとしては、ロタウイルス、レオウイルス等が挙げられる。

[0026] 前記1本鎖RNAウイルスとしては、エンテロウイルス、A型肝炎ウイルス（HAV）、C型肝炎ウイルス（HCV）ノロウイルス、ネコカリシウイルス等のmRNAとして作用する1本鎖RNAウイルス；麻疹ウイルス、狂犬病ウイルス、マールブルグウイルス、エボラウイルス、インフルエンザウ

イルス等の mRNA の相補鎖として作用する 1 本鎖 RNA ウイルスが挙げられる。

[0027] 前記 1 本鎖 RNA 逆転写ウイルスとしては、ヒト免疫不全ウイルス、泡沫状ウイルス等が挙げられる。

[0028] 前記 2 本鎖 DNA 逆転写ウイルスとしては、B 型肝炎ウイルス等が挙げられる。

[0029] これらのうち、本形態に適用されうるウイルスは、水中に存在し、ヒトに感染しうるアデノウイルス、ポリオーマウイルス、A 型肝炎ウイルス (H A V)、ノロウイルス、エンテロウイルス、ポリオウイルス、E 型肝炎ウイルス (H E V)、ロタウイルス、アイチウイルス、パレコウイルス、レオウイルスであることが好ましく、ノロウイルス、H A V、H E V、エンテロウイルス、ロタウイルスであることがより好ましい。

[0030] 上述のウイルスは単独で適用しても、2 種以上が混合されて適用されてもよい。

[0031] また、本形態のサンプル液に含有されうるフミン酸としては、特に制限されず、公知のもの、例えば、自然界に存在しうるフミン酸、自然界のフミン酸と化学構造の少なくとも一部が異なるフミン酸誘導体等が挙げられる。これらのフミン酸はサンプル液中に単独で含まれていても、2 種以上が混合して含まれていてもよい。

[0032] フミン酸は、上述のように複雑な構造を有しているが、吸光度の測定によりフミン酸の検出、評価を行うことができる。

[0033] サンプル液の pH は、3.0～9.0 であることが好ましく、8.0～9.9 であることがより好ましい。サンプル液の pH が上記範囲にあると、ウイルス及びフミン酸の電荷バランスが好適になることから好ましい。pH は公知慣用の方法で調整すればよく、各種酸塩基で調整してもよいし、無機塩のバッファーで調整してもかまわない。また、サンプルが、所望の pH である場合は、無調整でそのままサンプル液とすることができる。

[0034] [ウイルス及びフミン酸を含有するサンプル液と、共役酸の p K a が 8.0

～ 9. 9 である官能基 A を表面に有する基材とを接触させる工程]

本形態に係る精製ウイルス液の製造方法は、ウイルス及びフミン酸を含有するサンプル液を、共役酸の pK_a が 8. 0 ～ 9. 9 である官能基 A を表面に有する基材と接触させる工程を有する。この際、前記官能基 A は単一の官能基である。

[0035] 本発明の共役酸の pK_a が 8. 0 ～ 9. 9 である官能基 A を表面に有する基材とは、官能基 A を表面に有する基材であればよい。官能基 A を表面に有するとは、基材自体が官能基を有していてもよいし、基材表面に官能基 A を有する化合物を固定化してもよいし、官能基 A を有する化合物を基材表面に塗布することでも得ることができる。

[0036] 基材の材質は特に限定は無いが、好ましくは疎水性の材料であり、具体的にはオレフィン系樹脂、スチレン系樹脂、アクリル系樹脂、スルホン系樹脂、ポリイミド系樹脂、ウレタン系樹脂、エステル系樹脂、エーテル系樹脂、セルロース混紡エステルが挙げられる。

[0037] オレフィン系樹脂としては、例えば、ポリエチレン（例えば、低密度ポリエチレン、直鎖状低密度ポリエチレン、超低密度ポリエチレン、中密度ポリエチレン、高密度ポリエチレンなど）、ポリプロピレン、ポリブテン、ポリブチレン、ポリブタジエンの他、エチレンープロピレン共重合体（ランダム共重合体）等のエチレン及び／又はプロピレンと他の α -オレフィンとの共重合体（特にランダム共重合体）などが挙げられる。

[0038] スチレン系樹脂としては、スチレンの単一重合体のほか、ハイインパクトポリスチレン（HIPS）、メチルメタクリレート・ブタジエン・スチレン共重合体、スチレン・無水マレイン酸共重合体、スチレン・アクリロニトリル共重合体などが挙げられる。

[0039] アクリル系樹脂としては、（メタ）アクリル系単量体（（メタ）アクリル酸、（メタ）アクリル酸 C 1 - 18 アルキルエステル、（メタ）アクリル酸ヒドロキシアルキル、（メタ）アクリル酸グリシジル、（メタ）アクリロニトリルなど）の単独又は共重合体、例えば、ポリ（メタ）アクリル酸メチル

などのポリ（メタ）アクリル酸エステル、メタクリル酸メチルー（メタ）アクリル酸共重合体、メタクリル酸メチルーアクリル酸エステル（メタ）アクリル酸共重合体、メタクリル酸メチルー（メタ）アクリル酸エステル共重合体、（メタ）アクリル酸エステルースチレン共重合体（MS樹脂など）などが挙げられる。

[0040] スルホン系樹脂としては、ポリスルホン樹脂、ポリエーテルスルホン樹脂、ポリアリールスルホン樹脂などが例示できる。

[0041] ポリイミド系樹脂としては、ポリエーテルイミド系樹脂、ポリアミドイミド系樹脂、ポリベンズイミダゾール系樹脂などが挙げられる。

[0042] ウレタン系樹脂としては、例えば、ジイソシアネート類（ヘキサメチレンジイソシアネートなどの脂肪族ジイソシアネート類、1,4-シクロヘキサジイソシアネート、イソホロンジイソシアネートなどの脂環族ジイソシアネート類、トリレンジイソシアネート、ジフェニルメタン-4,4'-ジイソシアネート、1,5-ナフタレンジイソシアネートなどの芳香族ジイソシアネート類又はその水添ジイソシアネート類、キシリレンジイソシアネートなどの芳香脂肪族ジイソシアネート類又はその水添ジイソシアネート類など）と、ポリオール類（例えば、ポリエステルポリオール、ポリテトラメチレンエーテルグリコールなどのポリエーテルポリオール、ポリカーボネートポリオールなど）と、必要により鎖伸長剤との反応により得られるポリウレタン系樹脂などが挙げられる。

[0043] エステル系樹脂としては、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート等の芳香族ポリエステル、さらに塗料用樹脂等で使用されるジオールとジカルボン酸との縮合により得られるポリエステルなどが挙げられる。

[0044] エーテル系樹脂としては、ポリ（チオ）エーテル系樹脂が挙げられ、ポリオキシアルキレン系樹脂（安定化されたポリオキシメチレングリコール又はホモ又はコポリアセタール系樹脂、ポリオキシプロピレングリコール、ポリオキシテトラメチレングリコールなどのポリオキシC1-4アルキレンジオ

ール)、ポリフェニレンエーテル系樹脂、ポリフェニレンエーテルケトン系樹脂、ポリスルフィド系樹脂(ポリフェニレンスルフィド又はその共重合体などのポリチオエーテル系樹脂)、ポリエーテルケトン系樹脂(ポリエーテルエーテルケトン系樹脂を含む)などが挙げられる。

[0045] 〔官能基A〕

本発明における官能基Aとは、共役酸の pK_a が8.0～9.9、好ましくは8.5～9.9、より好ましくは9.0～9.5であり、かつ基材表面に存在するとき、官能基Aは単一の官能基である。

[0046] この際、「官能基Aが単一の官能基である」とは、基材の表面に存在する官能基A(pK_a が8.0～9.9である官能基)が、単一のものからなることを意味する。この際、官能基Aは、基材に直接存在していても、他の要素(例えば、介在する基)を介して存在していてもよい。

[0047] よって、複数種の官能基Aが存在するポリエチレンイミン等については、官能基Aが単一の官能基であるとはいえない。

[0048] 官能基Aが単一であるか否かは、官能基Aを含む基材を酸で滴定した際に得られる滴定曲線の変曲点数を計測することで判別することができる。

[0049] なお、本明細書において、「官能基Aの共役酸の pK_a 」の値は、官能基Aを含む基材を酸で滴定した際の滴定値から、ヘンダーソン・ハッセルバルヒの式により算出された計算値を採用するものとする。すなわち、当該「官能基Aの共役酸の pK_a 」は基材に導入された形態で算出されたものであるため、例えば官能基Aが「 $-CH_2NH_2$ 」である場合には、これに相当するアミンである「 CH_3NH_2 」の共役酸の pK_a の値とは異なる場合がある。

[0050] また、基材が介在する基を有する場合において、「官能基A」は、 pK_a が8.0～9.9であり、かつ、当該 pK_a を満たす最小の基を意味するものとする。例えば、基材の表面に存在する基が「 $-CH_2NHCH_2CH_2OH$ 」である場合、官能基Aとしては、「 $-CH_2NHCH_2CH_2OH$ 」「 $-NHCH_2CH_2OH$ 」「 $-CH_2CH_2OH$ 」「 $-CH_2OH$ 」「 $-OH$ 」の5種の基が考えられる。これらのうち、「 $-CH_2CH_2OH$ 」「 $-CH_2OH$ 」「 $-$

OH」の共役酸のpKaは8.0未満であることから、これらの基は官能基Aではない。一方、「 $-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 」および「 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 」はpKaが8.0～9.9の範囲内にあることから官能基Aとなりうる。このうちの最小の基は「 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 」であることから、当該「 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 」が官能基Aとなる（よって、「 $-\text{CH}_2-$ 」は介在基である）。

[0051] 官能基Aの具体例としては、特に制限されないが、アミノ基が挙げられる。アミノ基としては、1-ヒドロキシ-2-アミノエチル基等の1級アミノ基；1-ヒドロキシ-2-(N-メチルアミノ)エチル基等の2級アミノ基；1-ヒドロキシ-2-(N,N-ジメチルアミノ)エチル基、N,N-ジメチルアミノエトキシカルボニル基、N,N-ジエチルアミノエトキシカルボニル基等の3級アミノ基等が挙げられる。

[0052] なお、本明細書において、「共役酸」とは、下式における AH^+ のことを指す。



[0053] 官能基Aを表面に有する基材と、ウイルス及びフミン酸を含有するサンプル液とを接触させると、官能基Aにウイルスとフミン酸が吸着する。これは、共役酸のpKaが8.0～9.9である官能基Aがプラスを帯び、ウイルス及びフミン酸がマイナスを帯びていることから、電気的な結合が生じているものと思われる。

[0054] 上記基材の表面に官能基Aを導入するには、様々な方法がある。例えば、アミノ基を有する化合物を基材表面に塗布してもよい。この際、用いられるアミノ基を有する化合物としては、N-β（アミノエチル）γ-アミノプロピルトリメトキシシラン等のアミノ基含有シランカップリング剤や、アミノ基を有する公知各種の樹脂が挙げられる。また、基材表面に官能基Aを有する化合物を結合させてもよく、例えば基材表面に有するエポキシ基を介してアンモニアやジエチルアミンを反応させる方法などもある。またジメチルアミノエチルメタクリレートや、ジエチルアミノエチルメタクリレートとい

ったアミノ基含有モノマーを塗布後グラフト重合させることにより、基材表面に官能基を導入する方法などもある。

[0055] 〔回収液〕

前記サンプル液と接触させた基材は、例えば、 $\text{pH } 10 \sim 12$ の回収液を接触させることで、精製ウイルス液を得ることができる。すなわち、一実施形態において、本発明に係る精製ウイルス液の製造方法は、サンプル液と接触させた前記基材を、 $\text{pH } 10 \sim 12$ の回収液に接触させる工程をさらに有する。 $\text{pH } 10 \sim 12$ の回収液と接触させると場がアルカリ側になるため、官能基Aの電荷が中性となり、ウイルスと官能基A間の電氣的な結合が解除され、ウイルスが脱離されるからと考えられる。この際、フミン酸は基材から脱離しないため、精製されたウイルス液を得ることができる。これは、フミン酸の疎水的な構造が基材と相互作用して吸着されているからではないかと考えられる。

[0056] なお、共役酸の pK_a が $8.0 \sim 9.9$ である官能基が複数存在する（官能基Aが単一ではない）場合、例えばポリエチレンジアミンを固定化した基材のような場合、回収液と接触させてウイルスを脱離させる際、フミン酸までもが溶出しやすくなり、精製ウイルス液にフミン酸が混入しうる。この理由は定かではないが、複数の官能基がウイルスと結合する事により、回収液と接触させてもウイルスが脱離しにくくなり、より高いアルカリ性の回収液と接触させなければウイルスを脱離させる事ができなくなる結果、フミン酸も同時に脱離・溶出してしまう為と考えられる。

[0057] 〔基材〕

本発明の基材の形状は特に限定は無く、多孔質膜状、中空糸状、平膜状、ビーズ状、が挙げられるが、サンプル液との接触効率の点から中空糸状であることが好ましく、多孔質膜からなる中空糸状が特に好ましい。

[0058] 本発明の基材とサンプル液を接触させる場合、様々な方法を用いることができる。バッチ式の場合、基材とサンプル液をビーカーや試験管、マイクロチューブやチップ等に入れ、攪拌することで接触させることができる。攪拌

する場合、攪拌翼や攪拌子を使用してもよいし、振動式ミキサー等で攪拌してもよい。

[0059] フロー式の場合、基材をカラムやチューブに詰めた上、サンプル液を通液してもよいし、担体に基材を固定したうえで通液してもよい。

[0060] [精製ウイルス液の回収工程]

上記回収液をサンプル液と接触させた基材と接触させると、回収液にウイルスが溶出するため、ウイルスが溶出した回収液を回収することで、精製ウイルス液を得ることができる。精製ウイルス液を回収するには、基材と回収液とを分離すればよい。分離の方法は公知慣用の方法を用いればよく、濾過、デカンテーション、遠心分離等の方法を用いることができるし、注射器等を用いて液のみを採取してもよい。

[0061] [ウイルス検出工程]

得られた精製ウイルス液は、ウイルス検出工程に供することができる。

[0062] ウイルス検出工程とは、ウイルスを検出、及び同定する工程である。ウイルス検出方法としては、古くは単離培養からの形態的同定法が用いられていたが、現在はポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）等に代表される核酸増幅検査（NAT）法が用いられる。NAT法は、培養方法が確立していないウイルスを検出できるうえ、培養日数が不要なため短期間での検出が可能と言う利点がある。

[0063] 回収工程で得られる精製ウイルス液中で、ウイルス濃度が低い場合、公知慣用の方法でウイルスを濃縮してもよく、具体的には陽電荷膜法や陰電荷膜法、ポリエチレングリコール沈殿法、セルロース凝集法、限外ろ過法などが挙げられる。本発明で得られる精製ウイルス液は、NAT法を阻害するフミン酸が除去、またはほとんど分離されているため、感度よく検出することが可能である。

[0064] 精製ウイルス液をNAT法に供する場合、ウイルスから核酸を抽出する前処理を行うことが好ましい。ウイルス核酸（DNA，RNA）の抽出は、特に限定されるものではなく、フェノール・クロロホルム抽出法、界面活性剤

やプロテアーゼを併用した抽出法等が用いられる。また、ウイルス核酸精製に関しても、液相抽出法、エタノール沈殿法やスピンカラム法等により行うことができる。

[0065] 抽出された核酸は、N A T法により検査を行うが、N A T法はウイルス等の微量の遺伝子を人工的に増幅して高感度に検出する方法の総称であり、P C R法その他、転写媒介増幅（T M A）法、鎖置換反応（L A M P）法、等温遺伝子増幅（I C A N）法、核酸配列増幅（N A S B A）法、リガーゼ連鎖反応（L C R）法等が挙げられる。

[0066] 例えばP C R法の場合、ウイルスに特異的なプライマーを用いて核酸増幅を行い、増幅が認められればウイルスが存在することが判明する。

実施例

[0067] 以下、実施例を用いて本発明を説明するが、本発明は実施例の記載に制限されるものではない。また、実施例において特段の記載がない場合、部及び％は質量基準である。

[0068] （参考例1）基材の調製例

密度0.968 g / c m³、メルトインデックス5.5の高密度ポリエチレン（三井石油化学工業株式会社製H I Z E X 2200 J）を吐出口径16 mm、円環スリット幅が2.5 mm、吐出断面積が1.06 c m²の中空糸賦型用紡糸口金を用い、紡糸温度160℃で紡糸し、紡糸ドラフト1890でポビンに巻き取った。得られた未延伸中空糸の寸法は内径が324 μ m、膜厚が48 μ mであった。

[0069] この未延伸中空糸を115℃で24時間、定長で熱処理した。つづいて室温で7500％ / m i nの変形速度で1.8倍延伸した後、100℃の加熱炉中で変形速度が220％ / m i nとなるように総延伸倍率が3.8倍になるまで熱延伸を行った、さらに125℃の加熱炉で総延伸倍率が2.3倍になるまで連続的に熱収縮を行い、延伸糸を得た。得られた多孔性中空糸膜の内径は294 μ m、膜厚は40 μ mであった。

[0070] （実施例1）

1) エチレンービニルアルコール共重合体 (日本合成化学製品、エチレン含量 44 モル%、重量平均分子量 90000) 2. 5 wt % エタノール/水混合溶液 (50℃) に参考例 1 で得られた中空糸を 100 秒間浸漬し、50℃のエタノール飽和蒸気下で 80 秒保温した後、さらに 80 秒かけて溶剤を乾燥させて親水化処理を行った。このようにして得られた中空糸 (約 13 cm、約 150 本: 樹脂固定化量 19.5 mg) を、アセトン 20 mL、エピクロロヒドリン 16 mL、40% NaOH 水溶液 4 mL を入れた試験管中に浸漬した。超音波をかけながら、30~40℃で 5 時間反応させ、反応終了後、アセトンと水で洗浄し、真空乾燥し、エポキシ基が導入された中空糸を得た。

[0071] 上記で作製したエポキシ基が導入された中空糸を、20% エタノールアミン水溶液に浸漬し、40℃で 15 時間反応させた。反応終了後は水で洗浄し、アミノ基 (共役酸の pK_a 8.9) が導入された中空糸を得た。中空糸を滴定して官能基量を測定したところ、導入された官能基量は、 $0.040 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ (内表面積) であった。

[0072] 2) 該アミノ基固定化中空糸 (6 cm × 12 本) を用いて、少量サンプル用モジュール (内径 3 mm、外径 5 mm、有効長 5 cm、外表面積 5 cm^2) を作製した。

[0073] 3) 精製水に Q β ファージ (NBRC 20012) 及びフミン酸 (ナカライテスク株式会社) をそれぞれ終濃度 $1 \times 10^8 \text{ PFU}/\text{mL}$ 、10 ppm となるよう加えてファージ・フミン酸混合液 (pH: 7.0) を調製した。

[0074] 上記のファージ・フミン酸液 1 mL を、注射器を用いてモジュールに通液し、ろ液を非吸着画分として回収した。次いで $1 \text{ mmol}/\text{L}$ NaOH 1 mL を回収液 (pH: 11) として、注射器を用いてモジュールに通液し、ろ液を溶出画分として回収した。

[0075] それぞれの画分において、フミン酸を 260 nm の吸光度測定にて定量した。また、それぞれの画分から、QIAGEN MinElute Virus Spin キット (株式会社キアゲン) を用いてファージ RNA を抽出

し、リアルタイムRT-PCR法にてRNA量を定量した。測定に用いたプライマー及びプローブの配列は文献 (Journal of Virological Methods 149 (2008), p123-128) に従って作製し、測定はStepOnePlusリアルタイムPCRシステム (ライフテクノロジースジャパン株式会社) を使用した。

[0076] ファージ及びフミン酸の濃度を測定した結果、基材への接触処理前(以降これを未処理とする)のファージ・フミン酸混合液に対し、非吸着画分中に含まれるファージ及びフミン酸量はそれぞれ8%、4%であった。よって、モジュール中の基材に対する吸着率は、それぞれファージが92%、フミン酸が96%であることが分かった。

[0077] また、ファージ・フミン酸混合液を通液後、回収液にて溶出操作を行ったところ、未処理のファージ・フミン酸混合液に対し、溶出画分におけるファージ、フミン酸の回収率はそれぞれ64%、46%であった。

[0078] 上記で得られたフミン酸の回収率に対するファージの回収率 (フミン酸の回収率/ファージの回収率) を回収率比として算出したところ、0.72であった。なお、回収率比は、その値が小さいほどフミン酸を分離することができたことを意味する。

[0079] (実施例2)

1) 実施例1と同様にして作製したエポキシ基が導入された中空糸を、28%アンモニア水に浸漬し、20℃で15時間反応させた。反応終了後は水で洗浄し、アミノ基 (共役酸のpKa 9.5) が導入された中空糸を得た。中空糸を滴定して官能基量を測定したところ、導入された官能基量は、0.022 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ (内表面積) であった。

[0080] 2) 実施例1と同様に少量サンプル用モジュールを作製し、ファージ・フミン酸混合液1mLの吸着・1mmol/L NaOH 1mL (pH: 11) による回収評価を実施した。未処理のファージ・フミン酸混合液に対する非吸着画分におけるファージ、フミン酸の吸着率はそれぞれ95%、100%であった。また、溶出画分におけるファージ、フミン酸の回収率はそれ

ぞれ69%, 32%であった。よって、回収率比は0.46である。

[0081] (実施例3)

1) 実施例1と同様にして作製したエポキシ基が導入された中空糸を、20%ジエチルアミン水溶液に浸漬し、40℃で15時間反応させた。反応終了後は水で洗浄し、アミノ基（共役酸の pK_a 9.9）が導入された中空糸を得た。中空糸を滴定して官能基量を測定したところ、導入された官能基量は、 $0.025 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ （内表面積）であった。

[0082] 2) 実施例1と同様に少量サンプル用モジュールを作製し、ファージ・フミン酸混合液1mLの吸着・ $10 \text{ mmol}/\text{L}$ NaOH 1mL（ pH : 12）による回収評価を実施した。未処理のファージ・フミン酸混合液に対する非吸着画分におけるファージ、フミン酸の吸着率はそれぞれ96%, 100%であった。また、溶出画分におけるファージ、フミン酸の回収率はそれぞれ63%, 46%であった。よって、回収率比は0.73である。

[0083] (比較例1)

1) 実施例1と同様にして作製したエポキシ基が導入された中空糸を、5%ポリアリルアミン水溶液に浸漬し、40℃で15時間反応させた。反応終了後は水で洗浄し、アミノ基（共役酸の pK_a 10.6）が導入された中空糸を得た。中空糸を滴定して官能基量を測定したところ、導入された官能基量は、 $0.015 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ （内表面積）であった。

[0084] 2) 実施例1と同様に少量サンプル用モジュールを作製し、ファージ・フミン酸混合液1mLの吸着・ $1 \text{ mmol}/\text{L}$ NaOH 1mL（ pH : 11）による回収評価を実施した。未処理のファージ・フミン酸混合液に対する非吸着画分のファージ、フミン酸量はそれぞれ0%であることから、ファージ及びフミン酸の吸着率はそれぞれ100%, 100%と算出された。また、ファージ・フミン酸混合液を通液後、回収液にて溶出操作を行ったところ、未処理のファージ・フミン酸混合液に対し、溶出画分におけるファージ、フミン酸はほとんど回収されず、回収率はそれぞれ0%であった。このため、回収率比は算出できなかった。

[0085] (比較例 2)

1) 実施例 1 と同様に作製したエポキシ基が導入された中空糸を、5 %ポリ ϵ リジン水溶液に浸漬し、40℃で15時間反応させた。反応終了後は水で洗浄し、アミノ基（共役酸の pK_a 7.6）が導入された中空糸を得た。中空糸を滴定して官能基量を測定したところ、導入された官能基量は、 $0.042 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ （内表面積）であった。

[0086] 2) 実施例 1 と同様に少量サンプル用モジュールを作製し、ファージ・フミン酸混合液 1 mL の吸着・ $1 \text{ mmol}/\text{L}$ NaOH 1 mL (pH : 11) による回収評価を実施した。未処理のファージ・フミン酸混合液に対する非吸着画分におけるファージ、フミン酸の吸着率はそれぞれ 100%, 87%であった。また、溶出画分におけるファージ、フミン酸の回収率はそれぞれ 71%, 65%であった。よって、回収比率は 0.92 である。

[0087] (比較例 3)

1) 実施例 1 と同様に作製したエポキシ基が導入された中空糸を、5 %ポリエチレンイミン（和光純薬製品、平均分子量 600）の水溶液に浸漬し、40℃で15時間反応させた。反応終了後は水で洗浄し、アミノ基（共役酸の pK_a 8.8；平均値）が導入された中空糸を得た。中空糸を滴定して官能基量を測定したところ、導入された官能基量は、 $0.021 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ （内表面積）であった。

[0088] 2) 実施例 1 と同様に少量サンプル用モジュールを作製し、ファージ・フミン酸混合液 1 mL の吸着・ $10 \text{ mmol}/\text{L}$ NaOH 1 mL (pH : 11) による回収評価を実施した。未処理のファージ・フミン酸混合液に対する非吸着画分におけるファージ、フミン酸の吸着率はそれぞれ 100%, 97%であった。また、溶出画分におけるファージ、フミン酸の回収率はそれぞれ 70%, 68%であった。よって、回収比率は 0.97 である。

[0089] 実施例 1～3 および比較例 1～3 で得られた結果を下記表 1 に示す。

[0090]

[表1]

	基材の官能基A				回収液 のpH	吸着率(%)		回収率(%)		回収比率 ^{*2}
	アミノ基由来原料	種類	pKa	官能基量 (μ mol/mL)		ファージ	フミン酸	ファージ	フミン酸	
実施例1	エタノールアミン	単一	8.9	0.040	11	92	96	64	46	0.72
実施例2	アンモニア	単一	9.5	0.022	11	95	100	69	32	0.46
実施例3	ジエチルアミン	単一	9.9	0.025	12	96	100	63	46	0.73
比較例1	ポリアリルアミン	単一	10.6	0.015	11	100	100	0	0	—
比較例2	ポリエリジン	単一	7.6	0.042	11	100	87	71	65	0.92
比較例3	ポリエチレンジアミン	複数	8.8 ^{*1}	0.021	11	100	97	70	68	0.97

* 1: 平均値

* 2: 回収比率＝ファージ回収率／フミン酸回収率

[0091] 表1の結果からも明らかなように、実施例1～3では回収率比が特に小さく、選択的にファージを分離することができ、得られた液は、ウイルスのみを好適に濃縮した精製ウイルス液であるといえる。

[0092] 一方、比較例1～3では、回収率比が1に近い値となっており、得られた回収液には、ウイルスとともにフミン酸も混合していることが分かる。

産業上の利用可能性

[0093] 本発明の精製ウイルス液の製造方法は、ウイルス検査方法に対し好適に使用可能である。

請求の範囲

- [請求項1] ウイルス及びフミン酸を含有するサンプル液と、共役酸の pK_a が 8.0～9.9 である官能基 A を表面に有する基材とを接触させる工程を有する、精製ウイルス液の製造方法であって、
上記官能基 A が単一の官能基であることを特徴とする、製造方法。
- [請求項2] 前記サンプル液と接触させた前記基材を、 pH 10～12 の回収液に接触させる工程をさらに有する、請求項 1 に記載の製造方法。
- [請求項3] 前記基材が中空糸膜である、請求項 1 または 2 に記載の製造方法。
- [請求項4] 前記官能基 A がアミノ基である、請求項 1～3 のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項5] 前記サンプル液の pH が 3.0～9.0 である、請求項 1～4 のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項6] ウイルス及びフミン酸を含有するサンプル液と、共役酸の pK_a が 8.0～9.9 である官能基 A を表面に有する基材とを接触させる工程と、
 pH 10～12 である回収液を基材と接触させる工程と、
基材と接触後の回収液を回収して得られる精製ウイルス液をウイルス検出工程にかける工程とを有し、
前記官能基 A が、単一の官能基であることを特徴とする、ウイルス検出方法。
- [請求項7] 共役酸の pK_a が 8.0～9.9 である官能基 A を表面に有する基材を有し、前記官能基 A が単一の官能基であることを特徴とする、ウイルス精製部材。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/070663

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N7/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N7/00-7/08, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{Y}$	JP 2010-193720 A (Asahi Kasei Chemicals Corp.), 09 September 2010 (09.09.2010), claims (Family: none)	$\frac{7}{1-7}$
$\frac{X}{Y}$	TOYOPEARL Sogo Catalog (2014-2016), 2014, pages 12 to 13 (page 12)	$\frac{7}{1-7}$
Y	STRAUB T.M. et al., Removal of PCR inhibiting substances in sewage sludge amended soil. Wat. Sci. Tech., 1995, vol.31, no.5-6, pp.311-315 (ABSTRACT, Table)	1-7
Y	LEWIS G.D. et al., Influence of environmental factors on virus detection by RT-PCR and cell culture. J. Appl. Microbiol., 2000, vol.88, no.4, pp.633-640 (Abstract, Table)	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 October 2015 (14.10.15)

Date of mailing of the international search report
27 October 2015 (27.10.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/070663

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HATA A. et al., Organic substances interfere with reverse transcription-quantitative PCR-based virus detection in water samples. Appl. Environ. Microbiol., 2015 Mar., vol.81, no.5, pp.1585-1593 (Abstract, FIG., TABLE)	1-7
Y	Akihiko HATA et al., "Concentration of Organic Matter During a Virus Concentration and Inhibition on Virus Detection", Japan Society on Water Environment Symposium Koenshu, 2012, vol.15, pages 275 to 280 (figures, tables)	1-7
E,X	JP 2015-167536 A (DIC Corp.), 28 September 2015 (28.09.2015), claims (Family: none)	1-7
E,Y	WO 2015/111606 A1 (DIC Corp.), 30 July 2015 (30.07.2015), claims (Family: none)	1-7

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N7/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N7/00-7/08, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
$\frac{X}{Y}$	JP 2010-193720 A (旭化成ケミカルズ株式会社) 2010.09.09 (請求項) (ファミリーなし)	$\frac{7}{1-7}$
$\frac{X}{Y}$	TOYOPEARL 総合カタログ(2014-2016), 2014, pp.12-13 (第12頁)	$\frac{7}{1-7}$

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 4 . 1 0 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

2 7 . 1 0 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

戸来 幸男

4 B

3 9 6 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	STRAUB T.M. et al., Removal of PCR inhibiting substances in sewage sludge amended soil. Wat. Sci. Tech., 1995, vol.31, no.5-6, pp.311-315 (ABSTRACT、Table)	1-7
Y	LEWIS G.D. et al., Influence of environmental factors on virus detection by RT-PCR and cell culture. J. Appl. Microbiol., 2000, vol.88, no.4, pp.633-640 (Abstract、Table)	1-7
Y	HATA A. et al., Organic substances interfere with reverse transcription-quantitative PCR-based virus detection in water samples. Appl. Environ. Microbiol., 2015 Mar., vol.81, no.5, pp.1585-1593 (Abstract、FIG.、TABLE)	1-7
Y	端昭彦 外, ウイルス濃縮過程における共存有機物の濃縮とウイルス検出阻害. 日本水環境学会シンポジウム講演集, 2012, vol.15, pp.275-280 (図、表)	1-7
E, X	JP 2015-167536 A (D I C株式会社) 2015.09.28 (請求項) (ファミリーなし)	1-7
E, Y	WO 2015/111606 A1 (D I C株式会社) 2015.07.30 (請求項) (ファミリーなし)	1-7