

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4792590号
(P4792590)

(45) 発行日 平成23年10月12日 (2011.10.12)

(24) 登録日 平成23年8月5日 (2011.8.5)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 1/10 (2006.01)
 BO 1 D 61/14 (2006.01)
 BO 1 D 63/02 (2006.01)
 BO 1 D 71/02 (2006.01)
 BO 1 D 71/16 (2006.01)

GO 1 N 1/10 B
 GO 1 N 1/10 P
 BO 1 D 61/14 500
 BO 1 D 63/02
 BO 1 D 71/02

請求項の数 18 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-502070 (P2002-502070)
 (86) (22) 出願日 平成13年6月8日 (2001.6.8)
 (65) 公表番号 特表2003-536057 (P2003-536057A)
 (43) 公表日 平成15年12月2日 (2003.12.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2001/001786
 (87) 国際公開番号 W02001/094527
 (87) 国際公開日 平成13年12月13日 (2001.12.13)
 審査請求日 平成20年4月24日 (2008.4.24)
 (31) 優先権主張番号 00/07459
 (32) 優先日 平成12年6月9日 (2000.6.9)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 592011479
 ビヨ・メリウー
 フランス国 エフー69280 マルシイ
 レトワール, シュマン ド ロルム
 (74) 代理人 100064388
 弁理士 浜野 孝雄
 (73) 特許権者 509187886
 シュエ アンヴィロンマン
 フランス国 エフー75383 パリ セ
 デックス 08, リュ ダストル 1
 (74) 代理人 100064388
 弁理士 浜野 孝雄
 (74) 代理人 100088236
 弁理士 平井 輝一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 きわめて大量の試料から分析用試料を調製する濾過手段の使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

中に複数の中空の繊維（3）が互いに並行に配置され、その各多孔質の壁（3a）が開口（4）を画定した、ハウジング（2）を有し、上記中空の繊維の複数の平行な開口（4）からなる内部通路（A）と、上記繊維と上記ハウジングの間で利用可能な容積に対応する外部通路（B）とを有し、希釈状態で大きさの異なる複数の微生物を含む大量の初期液体試料を処理して、濃縮状態で初期液体試料と同じ組成からなる微生物を含む少量の最終液体試料を得るために用いられる、濾過手段の使用において、上記手段が用いられるときには、少なくとも一つの濃縮工程が行われ、その中では、

a. 単一の濾過手段が使用され、
 b. 上記濾過手段は、前面モードで使用され、
 c. 繊維の多孔質の壁（3a）の遮断閾値は、初期試料の最も小さい微生物を保持するように決定され、
 そして、不連続的に、

d. 濾過段階では、初期液体試料がすべて上記濾過手段の内部通路（A）を介して導入され、濾過液は、上記濾過手段の外部通路（B）を介して除去され、濃縮液は、液体試料が導入された通路を介して蓄積され、

e. 収集段階では、試料がすべて通過した後、上記一方の通路から上記他方の通路への上記濾過手段（1）を通る液体試料の通過を停止し、濃縮液から出口液体試料を得、

f. 逆流洗浄段階の間、微生物のない液体の流れを、上記一方の通路から上記他方の

10

20

通路へ循環させる、
ことを特徴とする濾過手段の使用方法。

【請求項 2】

中に複数の中空の繊維（３）が互いに並行に配置され、その各多孔質の壁（３ a）は、開口（４）画定した、ハウジング（２）を有し、上記中空の繊維の複数の平行な開口（４）からなる内部通路（Ａ）と、上記繊維と上記ハウジングの間で利用可能な容積に対応する外部通路（Ｂ）とを有し、希釈状態で大きさの異なる複数の微生物を含む大量の液体試料を処理して、濃縮状態で初期液体試料と同じ組成からなる微生物を含む少量の最終液体試料を得るために用いられる、濾過手段の使用において、上記手段が用いられるときには、少なくとも一つの濃縮工程が行われ、その中では、

10

- a. 単一の濾過手段が使用され、
- b. 上記濾過手段は、前面モードで使用され、
- c. 繊維の多孔質の壁（３ a）の遮断閾値は、初期試料の最も小さい微生物を保持するように決定され、

そして、不連続的に、

d. 濾過段階では、初期液体試料がすべて上記濾過手段の外部通路（Ｂ）を介して導入され、濾過液は、上記濾過手段の内部通路（Ａ）を介して除去され、濃縮液は、液体試料が導入された通路を介して蓄積され、

e. 収集段階では、試料がすべて通過した後、上記一方の通路から上記他方の通路への上記濾過手段（１）を通る所期液体試料の通過を停止し、濃縮液から出口液体試料を得る、
ことを特徴とする濾過手段の使用方法。

20

【請求項 3】

濾過段階（d）と収集段階（e）の間、外部通路は、空にされ得るか、空気で加圧され得ることを特徴とする請求項 1 に記載の使用方法。

【請求項 4】

上記収集段階（e）は、濃縮液の重力による流れおよび／または、加圧空気の内部通路内への通過によって行われることを特徴とする請求項 1 に記載の使用方法。

【請求項 5】

上記濾過段階（d）の間、初期液体試料は、内部通路の入口への送り出しおよび／または、上記内部通路の出口での吸引によって循環することを特徴とする請求項 1 に記載の使用
方法。

30

【請求項 6】

逆流洗浄段階の間、微生物のない液体の流れを、上記一方の通路から上記他方の通路へ循環させることを特徴とする請求項 2 に記載の使用。

【請求項 7】

上記濾過段階（d）と上記収集段階（e）の間、外部通路は、部分的または完全に空にされ
ることを特徴とする請求項 2 ～ 6 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 8】

最終液体試料は、外部通路内での濃縮液溶離によって得られることを特徴とする請求項 2
、 6、および 7 のいずれか一項に記載の使用
方法。

40

【請求項 9】

上記濾過段階（d）は、初期液体試料の事前濾過なしに行われることを特徴とする請求項
1 ～ 8 のいずれか一項に記載の使用
方法。

【請求項 10】

上記濾過手段は、超濾過手段であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載
の使用。

【請求項 11】

上記濾過手段の繊維は、有機膜からなることを特徴とする請求項 1 ～ 10 のいずれか一項
に記載の使用
方法。

50

【請求項 1 2】

上記濾過手段の繊維は、酢酸セルロース、エチルセルロース、ポリエーテル・スルホン、またはポリアクリロにトリルでつくられる有機膜であることを特徴とする請求項 1～請求項 1 1 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 1 3】

上記濾過手段の繊維は、セラミックスからなる無機膜であることを特徴とする請求項 1～請求項 1 1 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 1 4】

上記濾過手段の中空の繊維は、両端がそれぞれ樹脂の中に埋め込まれ、内部通路（A）と外部通路（B）との間および、上記濾過手段と外部との間を、いかなる汚染物質も通過するのを防ぐことを特徴とする請求項 1～1 3 のいずれか一項に記載の使用方法。

10

【請求項 1 5】

上記濾過手段の大きさおよび濾過段階の時間は、初期試料の量と得られる濃縮液の量の比率が、少なくとも50に等しく、好ましくは150と500の間になるように定められることを特徴とする請求項 1～1 4 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 1 6】

少なくとも二つの連続する液体試料濃縮工程が行われ、これら二つの工程は、請求項 1 に記載の濾過手段を使用して行われ、第一の濃縮工程の終わりに得られた濃縮液が、第二の濃縮工程のための初期液体試料を構成することを特徴とする請求項 1～1 5 のいずれか一項に記載の使用方法。

20

【請求項 1 7】

液体試料に少なくとも二つの連続する処理が行われ、これらの処理の少なくとも一つは、請求項 1 に記載の濃縮工程であり、第一の処理の終わりに得られた濃縮液が、第二の処理のための初期液体試料を構成することを特徴とする請求項 1～1 5 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 1 8】

上記濾過手段の寸法および処理の実施時間は、初期試料量と最終試料量の間の比率が、少なくとも5000に等しく、好ましくは15,000から100,000の間となるように定められることを特徴とする請求項 1 6 または 1 7 に記載の使用方法。

【発明の詳細な説明】

30

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、希釈状態で大きさの異なる複数の微生物（ウイルス、バクテリア、寄生虫）および各種有機および無機高分子を含む大量の試料を処理して、濃縮された状態でとくに汚染物質の同じ相対的混合物を含む少量の液体試料を得るため必要とするような、液体媒質中に存在する汚染物質の分析の分野に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

このような汚染物質とくに微生物の集積体および分析用の少量の試料は、微生物生化学的および生物学的分析方法、とくに例えば多重検出などの免疫検定方法や分子生物学的手法を用いる場合に、必要となるものである。

40

【0 0 0 3】

例えば吸着法を用いて微生物とくにウイルスを分離濃縮する手段は、公知である。しかし、これらの手段では、それらが微生物の生存能力を保証するものでないことに加えて、上に述べたような分析法で使用できる量の試料を得ることができない。

【0 0 0 4】

液体媒質中の微生物を収集するために用いられる他の手段では、濾過方法および種類のみの微生物の分析が求められるが、常に定量的な分析結果が得られるものではない。

【0 0 0 5】

バクテリアおよび寄生虫の場合には、規格化された方法では、種によって異なるが、0.2

50

μmから1 μmの範囲の大きさの多孔性の平坦な膜を使用することが望ましい。

【0006】

例えば、とくにフランス国特許明細書FR-B-2693474から、公知の方法で一つ以上の膜を使用してウイルス程度の大きさの微生物を分離できるようにし、同時に微生物の生存能力を保障する接線限外濾過にもとづく手法も知られている。

【0007】

しかし、最終液体試料の量に関する必要性から、この手法を生化学的または生物学的分析法で分析する試料を作製するために使用することはできない。

【0008】

オータキ等 (Wat. Sci. Tecch. 37, 10, 107-116, 1998) から、精密濾過膜の性能を確認するために、中空繊維を用いた限外濾過装置を連続正接モードで使用し、供給液、濾過液、および濃縮液からそれぞれ試料を回収することによって周期的に得られる回収物を分析することも知られている。

10

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

正接モードの濾過および限界濾過手段の使用には、膜での正接速度を維持して懸濁液内の粒子を濾過するようにし、同時に使用されている膜がすぐに詰まるのを避けるために濃縮液のすべてまたは一部を再循環させることのできる回路の存在が必要となる (レオス・J・ジーマン、アンドリュウ・L・ジドニー、マーセル・デッカー「精密濾過および限外濾過 — 原理および応用」、ニューヨーク — バーゼル — 香港、1996 “Microfiltration and Ultrafiltration — Principles and Applications” Lea J. Zeman, Andrew L. Zydney, Marcel Dekker, Inc. New York — Basle — Hong Kong 1996)。

20

【0010】

濾過された流体の再循環は、長い濾過時間が必要となり、とくに、最終的に得られる量に影響することなく濃縮物および微生物の一部を回収するために余分の量が必要となる。

【0011】

これらの手法では、配管機構の大きさおよび壁に残存する微生物を抽出するために必要な溶離液の量の大きさ、から大量の濃縮液が用いられ、また、濾過時間が長くなる。そのため、これらの手法は分析に少量を必要とし、また例えば飲料水あるいは人が消費する目的の他の流体の汚染に関する疑問に答えるために、迅速に結果が得られるような分析手段には使用できない。

30

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明の目的は、濾過手段を使用するにあたって、大量あるいは予め定められた量の初期液試料から、微生物の生存能力を保障しながら、同時に、微生物の生化学的および生物学的分析方法、とくに例えば多重検出などの免疫検定方法や分子生物学的手法を実施可能な、充分に少量の分析試料を得ることができるようになることである。

【0013】

本発明にしたがって使用される濾過手段は、前面モードで中空の繊維を用いる限外濾過の手法に基づくものである。

40

【0014】

前面モード (frontal mode) とは、正接モード (tangential mode) と異なり、初期液試料が濾過手段を通過する任意の単流路であって、それは同じ試料の少なくとも一部が濾過手段の入口に循環して、戻ることのないような単流路を意味すると理解すべきものである。

【0015】

この前面モードの限外濾過手段を使用することによって、単流路内で長くとも一時間程度の時間内に試料を濃縮して少量の濃縮液を得、同時に、微生物の生存能力、多重収集、および100%に近い収量を保障することができる。

【0016】

「多重収集」という表現は、最終試料から、初期試料中に存在するほぼすべての異なる種

50

類または種の微生物を収集することが可能であることを意味すると理解すべきものである。

【0017】

上に述べたような高い収量が得られるのは、他の装置と異なり、例えば再循環用配管機構などの補助的配管機構が存在するため、また中空の繊維の全長に沿った多孔部の信頼性のために、無駄となる量がないためである。

【0018】

【実施例】

使用される濾過手段の諸特徴は、添付の図面を参照して以下に行う説明から明らかとなるう。

10

【0019】

上記濾過手段は、中に複数の中空の繊維（3）が互いに並行に配置されたハウジング（2）を有し、その各多孔質の壁（3a）は、開口（4）画定し、したがって、上記手段は、上記中空の繊維の複数の平行な開口（4）からなる内部通路（A）および上記繊維と上記ハウジングの間で利用可能な容積に対応する外部通路（B）を有する。

【0020】

本発明によると、この手段は、希釈状態で大きさの異なる複数の微生物を含む大量の初期液体試料を処理して、濃縮状態で同じ組成の微生物を含む少量の最終液体試料を得るために用いられる。

【0021】

20

この手段が用いられるときには、少なくとも一つの濃縮工程が行われ、その中では、
a) 単一の濾過手段が使用され、
b) 上記濾過手段は、前面モードで使用され、
c) 繊維の多孔質の壁（3a）の遮断閾値は、初期試料の最も小さい微生物を保持するように不連続に決定され、
d) 濾過段階では、初期液体試料がすべて上記濾過手段の一方の通路（A，B）を介して導入され、濾過液は、上記濾過手段の他方の通路を介して除去され、濃縮液は、液体試料が導入された通路を介して蓄積され、
e) 収集段階では、試料がすべて通過した後、上記一方の通路から上記他方の通路への上記濾過手段（1）を通る所期液体試料の通過を停止し、濃縮液から出口液体試料を得る。

30

【0022】

濃縮液によって形成される出口液体試料は、単純に重力を利用する、圧縮気体を用いる、または上記濾過手段を物理的に攪拌することによって収集できるが、T W E E N 2 0 型洗剤および／またはB S A（牛血清アルブミン）型表面活性剤を含むP B S型の食塩溶液（例：NaCl 120ミリモル、KCL 2.7mモル、NaH₂PO₄ 10ミリモル）を用いた微生物の場合には、任意の物質を用いた溶離によっても収集することも可能である。

【0023】

本発明の他の一実施例にあっては、濃縮液で形成された出口液体試料は、第二の濃縮工程を施し、この第二の濃縮工程で得られた試料が初期液体試料として用いられる。

【0024】

40

中空の繊維（3a）の壁は、上に述べたような多孔質の中空の繊維の製造が可能な任意の材料、例えば酢酸セルロース、エチルセルロース、ポリエーテル・スルホン、またはポリアクリロトリルなどの有機膜あるいはセラミックなどの無機膜などを用いてつくることができる。

【0025】

上記繊維の多孔質の壁（3a）に関する遮断閾値は、初期試料の最も小さい微生物を保持するように決定される。したがって、限外濾過の領域では、10ないし100nmの孔の多孔質の繊維が用いられ、濃縮液は、ウイルスを含めてウイルスの大きさ以上のすべての微生物を含むことになるが、とくに検出すべき粒子の大きさが10nm以下の場合には、ナノメートルの領域用として1ないし10nmの多孔質の繊維が用いられる。

50

【0026】

本発明の一実施例にあっては、初期試料が導入される通路は、内部通路（A）であり、出口試料が抽出される通路は、外部通路（B）である。したがって、微生物は、繊維の内部に蓄積されて濃縮液が形成され、濾過液は、繊維とハウジング（B）の間に利用可能な容積の中の繊維の外部に沿って通過する。

例えば10ないし100リットルの量の回収された水の試料からなる処理すべき試料は、弁（C）を介してモジュールの中空の繊維の中に導入され、蠕動ポンプ、または弁（D）および（F）を閉じたままにして、弁（E）によって濾過液側で低圧を生じさせるなど、他の手段を用いて行われる吸引によって搬送される。

【0027】

処理されるべき全量がモジュールを通過したとき、ポンプを停止させ、弁（C）を閉じて試料源から切断する。

【0028】

次に、例えば弁（E）を開いた後例えば圧縮空気で0.5バールに加圧するなどしてモジュールを大気圧下において、例えば弁（F）を介して濾過液を除去してハウジングを空にし、その後に弁（E）を再び閉じる。

【0029】

濃縮液の収集は、弁（D）を介して行うが、最初は弁（C）を開いて重力を利用し、最後は弁（C）を閉じて繊維の中に圧縮空気を注入して行う。

【0030】

別の一実施例にあっては、初期試料が導入される通路は、外部通路（B）であり、出口試料が抽出される通路は、内部通路（A）である。したがって、微生物は、繊維とハウジングの間に利用可能な容積内の繊維の外部に蓄積されて濃縮液を形成し、濾過液は、除去されるべき繊維の内部に沿って通過する。

【0031】

例えば10ないし100リットルの体積の回収された水の試料からなる処理すべき試料は、弁（E）を介してハウジング内に導入され、蠕動ポンプで行われる吸引によって低圧を生じさせ、または例えば弁（C）を閉じたままにして弁（D）によって中空の繊維の内部の濾過液側で低圧を生じさせることによって搬送される。

【0032】

処理されるべき全量がモジュールを通過したとき、ポンプを、作動させ続け、弁（E）を試料源から遮断し、モジュールのハウジングの中に収容されている濃縮液の量を減らす。量は、完全に減らしてもあるいは一部を減らしてもよい。

【0033】

所定の濃縮液の濃度レベルに達したら、ポンプを停止させ、弁（D）を他のすべての弁とともに閉じる。

【0034】

溶離液をハウジングの中に導入し、次にモジュールを攪拌し、その後に弁（F）を介して濃縮液または溶離液を収集し、弁（B）を介して弁（E）を介して圧縮空気を注入して終わることも可能である。

【0035】

吸着現象を制限するために、繊維を例えばT W E E N 2 0型洗剤および／またはB S A（牛血清アルブミン）型表面活性剤で予め処理しておくこともできる。

【0036】

一実施例にあっては、濾過段階（C）は、分析すべき流体の懸濁物質に応じて、初期液体試料の事前濾過なしに行うことができる。

【0037】

内部通路（A）を介して導入する方法の場合には、濃縮液の濃度は、濾過手段の大きさと直接関係する。外部通路（B）を介して導入する場合には、上記濃縮液の量は、上記濾過手段の大きさではなく、ハウジングの中に残された量および／またはハウジングの中に導

10

20

30

40

50

入された溶離液の量に依存する。

【0038】

濾過手段は、濾過時間を二十分と一時間の間として、初期試料の量と得られる濃縮液の量の比が、少なくとも50に等しく、好ましくは150と500の間になるような大きさとされる。

【0039】

用途によって許される場合には、モジュールは、逆流洗浄した後または例えば酵素の処理に用いられるような50 ppm塩素溶液などの浄化剤で処理した後、再使用することができる。

【0040】

逆流洗浄するために使用できる方法は、試料が内部通路（A）または外部通路（B）のいずれを介して導入されるかに応じて二つあり、洗浄水は、分析用試料導入の流れに抗して導入される。

10

【0041】

試料が導入される通路が、弁（C）を通る内部通路（A）である場合には、逆流を浴びせることは、水の供給源と弁（F）の間に配置された蠕動ポンプなどの給水手段を用い、上記弁を介して本管の水を導入することによって行われる。この場合、弁（D）は、閉じられ、弁（E）は、一時的に開いたままにしておく。

【0042】

ハウジングが一杯になって、弁（E）を閉じると、水は、強制的に繊維の内部に沿って流され、弁（C）または（D）を通して流れていくことになる。

20

【0043】

試料が導入される通路が、外部通路（B）である場合には、逆流洗浄することは、弁（D）を介して本管の水を導入することによって行われる。この場合、弁（E）および（F）は、閉じられる。

【0044】

繊維が水で一杯になったら、すなわち、弁（C）から流れる水の中に気泡が見られないようになったら、この弁を閉じて、水を、強制的にハウジングの中の繊維の外部をまわって流し、弁（E）または弁（F）を通して流れていくことになる。

【0045】

モジュールは、一回のみ使用するものと想定されている。さらに、最初に、例えばガンマ線殺菌処理によってモジュールを消毒することが想定されている。

30

【0046】

他の一実施例にあっては、シールの必要のないモジュールを使用することができる。それによって、外部の汚染（例えば周囲の空気などモジュール外部の流体による）の危険を避けることができ、また、汚染物質がシールを横切って濃縮液から濾過液に入り込むのを避けることができる。密閉は、図1に示すように、繊維の両端をそれぞれ樹脂の中に埋め込み、いかなる汚染物質も漏れ出すのを防ぐようにして行う。シールのあるモジュールでは、このようなことができない。

【0047】

他の一実施例にあっては、採用する分析方法で使用する量の濃縮液を得るために、得られた濃縮液に第二の濃縮工程を施す。

40

【0048】

この第二の濃縮工程では、使用する濾過手段は第一の濃縮工程で使用されるものと同じ構成のものでもよいが、濃縮液の初期の量と所定量の間の比にもとづいて計算されたよりも、少ない量のものとする。

【0049】

処理される量が、1 mlの百分の一程度であるので、例えばミリポア社からセントリコンープラス80の商品名で市販されている装置など遠心分離法を用いた濾過装置などの公知の手段を使用することができる。

【0050】

50

これらの濾過手段では、初期試料量と最終試料量の間の比が、少なくとも5000に等しく、好ましくは15,000から100,000の間となるように、その大きさおよび処理時間が選ばれる。

【0051】

したがって、本発明にもとづく濾過手段を使用すれば、多重収集および多量の分析用液体中に存在する微生物の100%に近い収量が可能となり、微生物の生存能力を保障し、長くとも一時間程度の時間でこの多重収集を行うことができ、例えば連続健康監視のための要件を満たし、とくに免疫検定法や分子生物学的手法などの生化学的、または生物学的分析方法で使用する事が可能な量の分析用濃縮液を得ることができるなどの効果が得られる。

10

【0052】

以下、例によって本発明にもとづく濾過手段の使用を説明するが、本発明の範囲が、これらの例によって限定されるものではない。

【0053】

例1

器具および方法

中空の酢酸セルロース繊維でつくられた濾過面積1 m²濾過手段を使用する。

【0054】

MS2 バクテリオファージでドーピングした本管の水50リットルからなる試料を、内部通路を介して導入する。

20

【0055】

濃縮液は、重力および圧力を利用して収集する。

【0056】

濃縮液を、バクテリオファージの生存能力および感染能力の双方を定量的に（試料の順次10倍希釈の後）または性質的に（MS2 感応性培養バクテリアの感染による生物学的拡大）も測定するリーシス・プラーク法を用いて分析する。

【0057】

順序

水道水の試料のドーピングおよびタンク内への回収に先立って、接種材料を超音波で処理し、ウイルスの粒子を分解した。

30

【0058】

チオ硫酸ナトリウム20mg/l（TM（Merck 106516））、すなわち50 l に1g、を加えた後、試料をMS2 でドーピングした。

【0059】

濾過を一回行い、次にハウジングを空にし、密閉し、空気圧（0.5 b）のもとに置いた。次に、重力を用いて濃縮液を収集する。次に、圧縮空気（0.5 b）を繊維の中に注入して繊維の中に残っていた濃縮液の最後の数ミリリットルまで収集する。

【0060】

濃縮液を予め超音波で処理し、大腸菌（E Coli）感応性リーシス・プラーク技術を用いて計算を行った。

40

【0061】

接種材料の調製

MS 2 希釈	MS 2 希釈量	SPW	最終タイター (PFU/ml)
ストック	-	-	$2 \cdot 10^8$
I10 ⁷	500 μ m ストック	9.5 ml	10^7
I10 ⁶	1 ml of I10 ⁷	9 ml	10^6
I10 ⁵	1 ml of I10 ⁶	9 ml	10^5
I10 ⁴	1 ml of I10 ⁵	9 ml	10^4
I10 ³	1 ml of I10 ⁴	9 ml	10^3
I100	1 ml of I10 ³	9 ml	100
I10	1 ml of I100	9 ml	10
I1	1 ml of I10	9 ml	1

10

SPW = 塩ペプトン水

PFU = 斑（プラーク）形成単位（感染性ウイルス単位）

I10^x = ml あたり 10^x の PFU を含む接種材料

【0062】

濾過

STS で中和した水道水50リットルを濾過し、ハウジングを空にした後、一つのブランク＝ブランク1（B1）を構成する濃縮液を収集する。

【0063】

膜を逆流洗浄した後、STS で中和した水道水50リットルを濾過し、ハウジングを空にした後、一つのブランク＝ブランク2（B2）を構成する濃縮液を収集した。膜を逆流洗浄した後、水道水50リットルをSTS で中和する。

20

【0064】

15分間待機した後、1リットルを引き出してタンク用の接種材料を希釈する。

【0065】

1リットルに希釈した I10（ 10^4 PFU）1 ml を用いてドーピングを行う。

【0066】

一回の濾過の後、濃縮液を収集する（C10）。

【0067】

逆流洗浄を行う。

30

【0068】

この例では、逆流洗浄は、少なくとも20リットルの水で行う。

【0069】

上の順序を繰り返して、I10⁴（ 10^4 PFU）1 ml でドーピングする。濾過の間の濾過液の試料の回収によって、試料（F）が得られた。濾過の終わりに、濃縮液を収集する（C10⁴）。

【0070】

B1 の100ml を I10⁴（ 10^4 PFU）でドーピングすることによって、ドーピングしたブランク・コントロール試料（BD10⁴）を得る。

【0071】

40

分析

— I100、I10、I1、C10⁴、BD10⁴の定量滴定。

【0072】

各純粋な試料のアリコート（一部）と接種材料を試験管の中にいれ、希釈を行う前に超音波で処理する。

【0073】

リーシス・プラーク技術（lysis plaque technique）を用い、以下の順序で感染性粒子の数を数える。

【0074】

融解した（44℃）柔らかいトップ・アガール（寒天）（Top Agar）（0.95%）2ml をウ

50

ウイルス懸濁液1ml および指数増殖期の培養物E.coli Hfr 0.3ml と混ぜ合わせた。これらの組み合わせは、手早くしかも静かに混ぜ合わせた後、ペトリ皿の中の栄養素を含む硬い寒天の全表面に上に注ぐ。37℃で培養した後、翌日にリーシス・プラークを読み取る。

【0075】

得られた結果

希釈	計算				平均	標準偏差	全平均	コメント
I 100	61	78	74	75	72.0	6.5	74.5	
I 10	9	7	17	8	10.3	4.0		
I 1	1	1	0	0	0.5	0.5		
C10 ⁴ pure	14	13	15	*6	14.0	0.8	13.9	* 6は除外：読取り値が疑わしい。
C10 ⁴ 10 ⁻¹	1	3	1	0	1.3	1.1		
BD10 ⁴ 10 ⁻¹	61	81	60	78	70.0	9.6	78.2	
BD10 ⁴ 10 ⁻²	13	19	14	18	16.0	2.5		

10

【0076】

例えば、C10⁴ 10⁻¹は、10⁴ PFUでドーピングした試料から得られた濃縮液の1/10の希釈液を指す。

【0077】

	量 (ml)	予想タイター (PFU/ml)	得られたタイター (PFU/ml)	予想量 (PFU)	得られた量 (PFU)	得られた値 ／予想値
I 10 ⁴	-	1.E+04	7.45E+03	-	-	74.5%
C 10 ⁴	325	31	14	1.E+04	4506	45.1%
BD 10 ⁴	100	1.E+02	78	1.E+04	7818	78.2%

20

C=	45.1%
C/BD=	57.6%
C/I=	60.4%

【0078】

定性試験

I 10⁴ (正のコントロール=T+)、F (1 50ml 試料)、B 2 (6×50 ml + 全試料を覆うための残量)、C 10 (6×50 ml + 全試料を覆うための残量) 上でのファージの存在または不在の検出。

30

【0079】

試料一分量を二倍に濃縮した栄養素の液体培地と混ぜ合わせた。37℃で30分間培養した後、指数増殖期の培養物E.coli Hfrを接種した。37℃で一晩培養した後(ウイルス増殖期)、指数培養物E.coli Hfrをすべてペトリ皿の中の栄養素の寒天の上に塗り付け、乾燥させた。ウイルス拡大液体培地の滴を入れ、37℃で少なくとも6時間培養する。

【0080】

滴を入れたポイントでリーシス・プラークの多少の融合が生じることによって、感染性粒子の存在が明らかとなる。

40

【0081】

感染性粒子が存在しない場合には、E.coli Hfrの成長によって、滴を沈殿した場所で細胞の厚い層が生成される。

【0082】

	合計量	試料の量 (ml)	P F U 予想値／試料 値	定性試験						部分評価 (PFU/量)	外挿 (PFU/ PFU)
B2	325	25	0	N						0	na
		50	0	N	N	N	N	N	N	0	na
F	50	50	0	N						0	na
C10	302	6	1	N						0/6 ml	4-6/10
		50	1.5	P	P	P	P	N	N	4-6/ 300 ml	
T+	Na	na	na	P	P	P	P	P	P	Na	na

10

N = 陰性； P = 陽性； na = 適用不能

【0083】

結果の解釈

ブランク（B2）は、感染性のバクテリオファージを含んでいない。したがって、モジュールは、事前にMS2で汚染されておらず、後で行われた10PFUの濃縮は、有効である。

【0084】

10⁴PFUの濃縮中に採取された濾過液の試料（50ml）は、検出可能なMS2を含んでいない。したがって、膜は、直径25nmのこのウイルスを効果的に保持する。

20

【0085】

C10の中で四つの感染性の単位が検出された。したがって、検出閾値は、10PFUよりも低い。

【0086】

実際の収量（すなわち、接種材料の測定タイター：C/Iに関係する）は、特定の収集方法がない場合（攪拌なし、溶離なし）には10⁴PFUのドーピングに関して60%である。これは、測定が、バクテリオファージの感染性に関するものであるために、生存能力を考慮したものである。

【0087】

比率C／BDは、実際の収量にきわめて近い。このことは、濃縮液による干渉がないことを示している。

30

【0088】

例2

器具および方法

中空の酢酸セルロース繊維でつくられた濾過面積0.6m²の濾過手段を使用する。

【0089】

寄生虫クリプトスポリジウム・パルヴムの接合子嚢でドーピングした本管の水50リットルからなる試料を、外部通路を介して導入する。

【0090】

濃縮液は、重力および圧力を利用した攪拌および収集によって収集する。

40

ダイナル抗リプトスポリジウム・ダイナビーズ・キット、ref.730.01（接合子嚢の一体性の尊重）を用いたIMS－IFA：免疫磁気分離－免疫蛍光検定法（米国環境保護庁出版の規格法1622－EPA-EPA-821-R-99-001参照のこと）を使用して分析を行う。

【0091】

順序

水道水をタンク内に入れ、チオ硫酸ナトリウム20mg/l（STS（Merck 106516））、すなわち50lに1g、を加える。

【0092】

試料をC・parvumの接合子嚢でドーピングする。

【0093】

50

ハウジングを部分的に空にし、モジュールを攪拌してハウジング内に残された液体の力で繊維の外表面上のすべての接合子嚢を収集した後、重力を用い、次に圧縮空気（0.5 b）をハウジングの中に注入して濃縮液を収集する。

【0094】

I M S - I F Aを用いて接合子嚢のストックおよび濃縮液のストックの計算を行う。

【0095】

濾過

方法

S T Sで中和した水道水50リットルを濾過し、ハウジングを空にした後、一つのブランク（B 1）を構成する濃縮液を収集した。この濾過の後に、膜を逆流洗浄する。

10

【0096】

次に、水道水50リットルをS T Sで中和し、さらに接合子嚢のストック（すなわち約10の接合子嚢）のI 10希釈液でドーピングする。

【0097】

濾過の後、ハウジングを空にし、濃縮液を収集した。（C 10）15分待機した後、1リットルを引き出してタンク用の接種材料を希釈する。

【0098】

1リットルに希釈したI 10（10 P F U）1mlを用いてドーピングする。

【0099】

一回の濾過の後、濃縮液を収集する（C 10）。

20

【0100】

この濾過の後、少なくとも10リットルの水で逆流洗浄する。

【0101】

上の順序を繰り返し、I 100（約100の接合子嚢）でドーピングを行い、濃縮液C 100を生成し、次にI 1000（約1000の接合子嚢）でドーピングを行って濃縮液C 1000を得る。

【0102】

分析

— I M S - I F Aを用いたI 10、I 100、I 1000、B、C 10、C 100、C 1000の計算。

【0103】

結果

30

接種材料		濃縮液		収量
-	-	B	0	-
I10	4	C10	15	=100%
I100	43	C100	57	=100%
I1000	335	C1000	236	70%

【0104】

接種材料に関する測定値よりも高いC 10およびC 100に関する結果は、驚くにはあたらない。顕微鏡での接合子嚢を計算するためのサンプリングは、同一の試料から得られた計算値を乗算してみるとわかるように、必然的に変動をとまなうものである。この現象は、接合子嚢が稀な場合により顕著になる。

40

【0105】

したがって、C 10およびC 100に関しては、濾過の後の値の大きさが一定であると考えべきである。

【0106】

C 1000に関しては、収量を議論することができる。

【0107】

結果の解釈

外部通路による濾過法は、接合子嚢100以下の感度を有する。

接合子嚢1000の接種材料では、得られる収量は、最適化なしで70%である。

50

【0108】

例3

用いた順序および方法は、濾過手段を除いて例1で用いたものと同じである。

【0109】

中空の酢酸セルロース繊維でつくられた濾過面積 0.6m^2 の濾過手段を使用して濾過を行う。

【0110】

試料は、MS2バクテリオファージでドーピングした本管の水50リットルからなるものである。上記試料を、内部通路(A)を介して導入する。

【0111】

濃縮液は、重力および圧力を利用して収集する。

【0112】

ブランク(B_1)を一つだけを作製し、1、10、100PFUで連続してドーピングを行う。

【0113】

例1の場合と同様に、分析は、リーシス・プラーク技術によって行った。

【0114】

上に述べた濾過作業で得られた濃縮液を濾過する第二の工程を以下に述べる順序で行った。

【0115】

ブランク(B_1)濃縮液および各ファージ濃縮液(C_11 、 C_110 、 C_1100)、すなわち各約230ml、をそれぞれ三つの等しい部分(70-80ml)に分け、三つの市販のセントリコンプラス80モジュール(ミリポア ref. UFC5LGC08)で第二回目の濃縮液を行う。

【0116】

このようにして得られた各ドーピング用の三つの濃縮液 C_2 ($<1\text{ml}$)を混ぜ合わせ、リーシス・プラークによる定量滴定で分析した。濃縮液 B_1 から得た三つのブランク(B_2)に関しても、同じ順序で行った。

【0117】

結果

- 接種材料の滴定： $I_{100} = 144\text{PFU}$ (例1と同様に全平均)；
- 第二回目の濾過の後に得られた濃縮液の滴定；

	滴定の読取り (PFU)	接種材料 (PFU)
B2	0	0
C ₂ 1	2	1.44
C ₂ 10	8	14.4
C ₂ 100	61	144

【0118】

例えば、 C_11 は、1PFUでドーピングした初期試料を濃縮する第二の工程の終わりで得られた三つの濃縮液の混合物を指す。

【0119】

結果の解釈

まとめて行った二つの濃縮工程によって、50リットルの試料の量が3ml以下に減少した。感応性は、1PFUに近かった。

【0120】

もちろん、本発明は、ここで図面および図表を参照して説明する実施例に限定されるものではなく、添付の特許請求の範囲に入るすべての他の実施例を含むものである(とくに、試料を濃縮するために用いられる膜の性質および特徴に関して)。

【0121】

例4

器具および方法

第一の濾過段階のためには中空の酢酸セルロース繊維でつくられた0.12m²の濾過手段を使用し、第二の濾過段階のためには使い捨てのVivace1170（サートリアス・ヴィヴァサイエンス ref. VS6002）を使用する。

【0122】

試料は、寄生虫クリプトスポリジウム・パルヴムの300の接合子嚢および大腸菌の300のCFUで同時にドーピングした30リットルの本管の水で作製する。

【0123】

濃縮

水道水をタンク内に入れ、チオ硫酸ナトリウム20mg/l（Merck 106516）、すなわち30 lに0.6 g、を加える。

【0124】

試料をC.parvumE.Coli細胞の接合子嚢でドーピングする。

【0125】

段階1： 30リットルから70mlへ

外路通路を使用して濾過を行った。

【0126】

ハウジングを部分的に空にし、モジュールを攪拌した後、圧縮空気（0.5 b）をハウジングの中に注入して微生物を含む滞留液約35mlを収集した。

【0127】

閉じられた内部コンパートメントの中にドーピングされていない中和された本管の水を注入によって繊維を通してハウジング内に再導入し（約35ml）、前と同じように攪拌と収集を行う。

【0128】

二つの収集された試料の化合物70mlが、滞留物R1を構成した。

【0129】

段階2： 70mlから300マイクロリットルへ

使い捨てVivace1170の中で、滞留物R1に供給業者の指示通りに25℃で1000Gの遠心力を10分間加えて濃縮を行った。収集効果を改善するため、濾過室内で1mlの濾過液を濃縮液に加え、次に濾過要素を高速で短時間「渦巻かせた」。以前と同じ条件下でさらに遠心作業を行った結果、最大で300マイクロリットルまで再濃縮することができた。これによって、最終滞留物R2が生成された。

【0130】

三回このような結果を得て三つの滞留物R2を並行的に生成した。

【0131】

分析：C. parvumの探索

接合子嚢のストックおよび滞留物の一部を、IMS（免疫磁気分離 — ダイナル抗リプトスポリジウム・ダイナビーズ・キット、ref.730.01）およびそれに続くIFA（免疫蛍光検定）で計算した（方法1622参照）。

【0132】

滞留物の一部を、下記の順序で、IMS（上を参照のこと）およびそれに続くPCRで分析した。

【0133】

— IMSからビーズ／接合子嚢の複合物を10μlの超純無菌水+10μlの水中50% Chelex 100の中に取り込んだ。

— 95℃で2分間 / -80℃で2分間の熱ショックを5回あたえた。

— 遠心によって濃縮液ペレットにした。

— 増幅ミックス（PCRバッファー、MgCl₂：1.5mM、牛の血清アルブミン：10pg/μl、dNTP：200pモル／μl、Taq DNAポリメラーゼ：50U、プライマーBB-3およ

10

20

30

40

50

び B B - 4 : 各 1p モル / μ l 、超純水を加えて 50 μ l としたもの) 30 μ l を加えた。

【 0 1 3 4 】

プライマー B B - 3 および B B - 4 は、Balatbat A.B. 他、J.Clin.Microbiol.1996,34,1769-1772 に記載されている。

【 0 1 3 5 】

ー 次のような P C R プログラムを行う： 94℃で5分間、[94℃で30秒間、60℃で45秒間、72℃で1分間] を40サイクル、次に72℃で5分間。

ー 臭化エチジウムの存在下で2%のアガローゼを含む電気泳動ゲル上で P C R 反応物 10 μ l を泳動させる。

【 0 1 3 6 】

E. coli の探索

培養物 E.coli と滞留物の一部を「コリラート 18 h」法を用い、I D E X X の供給業者の勧告にしたがって計算した。この方法は、大腸菌のベクターグルクロニダーゼの活動の検出をベースにしたものである。

【 0 1 3 7 】

以下の順序で、ベクターグルクロニダーゼに関する遺伝情報を指定した u i d A 遺伝子に対して行った入れ子式 P C R によって滞留物の一部を分析する。

【 0 1 3 8 】

ー 濃縮液の一部を膜で濾過する（ミリポア、直径 13mm、デュラポア G V W P 0 1 3 0 0 による孔 0.2 μ m）。

ー 上記膜を 0.2ml の P C R 管の中に挿入する。

ー 熱ショックによって細胞をライズ (lyze) させる。(85℃ 1分間 / 氷 1分間 を6サイクル)

ー プライマー U 2 7 0 および L 1 0 5 4 を用いたリーシス管の中での最初の増幅。

U 2 7 0 : 5 ' - g g T C A C T C A T T A C g g C A A A g - 3 '

L 1 0 5 4 : 5 ' - T T A A A g C C g A C A g C A g C A g T - 3 '

【 0 1 3 9 】

膜を入れた P C R 管の中に配置された増幅ミックス (Amplification mix) (150 μ l) :

P C R バッファー、MgCl₂ : 1.5mM、d N T P : 200pモル / μ l、T a q D N A ポリメラーゼ : 1.5U、プライマー : 各 1pモル / μ l、超純水を加えて 150 μ l としたもの。

【 0 1 4 0 】

P C R プログラム : 95℃で10分間、[94℃で1分間、60℃で1分間] を30サイクル、次に4℃に保持。

【 0 1 4 1 】

ー 得られたアンプリコン (amplicons) を超純水で100倍に希釈し、この希釈液 1 μ l をプライマー V a l 7 5 4 および V a l 9 0 0 とともに第二回の増幅用の基質として使用する (入れ子式 P C R として公知)。

V a l 7 5 4 : 5 ' - A A A A C g g C A A g A A A A g C A g - 3 '

V a l 9 0 0 : 5 ' A c g C g T g g T T A C A g T C C T g C g - 3 '

【 0 1 4 2 】

新しい管の中に配置された増幅ミックス (50 μ l) : P C R バッファー、MgCl₂ : 1.5mM、d N T P : 200pモル / μ l、T a q D N A ポリメラーゼ : 0.5U、プライマー : 各 1pモル / μ l、超純水を加えて 50 μ l としたもの。

【 0 1 4 3 】

P C R プログラムは、前と同じ。

【 0 1 4 4 】

ー 臭化エチジウムの存在下で2%のアガローゼを含む電気泳動ゲル上で P C R 反応物 10 μ l を泳動させる。

【 0 1 4 5 】

滞留物 R 2 の処理

10

20

30

40

50

滞留物を各100マイクロリットルの三つの部分：R 2 a、R 2 b、R 2 cに分割する。

【0146】

部分R 2 aをさらに二つに分割した：その50 μ lを、「コリラート18h」法（E.coli計算）を用いて処理し、他の50 μ lをIMS-I FA（C.parvum計算用）で処理した。

【0147】

部分R 2 bをuidA入れ子式PCR（E.coliの分子検出）で分析したが、その前に二つに分割した：その50 μ lを、直接分析し、他の50 μ lにはE.coli遺伝子DNAを添加した（抑制試験）。

【0148】

R 2 cをIMS-I FA（C.parvumの分子検出）で分析したが、その前に二つに分割した：その50 μ lを、直接分析し、他の50 μ lにはC.parvum遺伝子DNAを添加する（抑制試験）。

【0149】

PCRは、各々が、陰性のコントロール（標的DNAなし、滞留物なし）および陽性のコントロール（標的DNAあり、滞留物なし）を有する。

【0150】

アンプリコン（amplicons）は、すべて、臭化エチジウムの存在下、アガローゼ・ゲルの上で電気泳動によって観察される。

【0151】

結果

各地点は、三回再生成された。下の表では、繰り返しで得られた結果は、記号「/」で分けて示されている。

【0152】

	分析した部分での理論的計算値	結果（計算あるいはゲル上の帯）
E. coli計算（コリラート）	50	0/1/2
E. coli uidA入れ子式PCR検出	50	+ / + / +
uidA PCR抑制試験	50	+ / + / +
uidA PCR陽性コントロール	50	+
uidA PCR陰性コントロール	50	-
C. parvum計算（IMS-I FA）	50	1/11/9
C. parvum IMS-PCR検出	50	+ / + / +
C. parvum IMS-PCR抑制試験	50	+ / + / +
C. parvum IMS-PCR陽性コントロール	50	+
C. parvum IMS-PCR陰性コントロール	50	-

【0153】

結果の解釈

濃縮液中でコリラートによって検出されたE.coliの細胞の数が少ないのは、この試験が酵素の活動の検出をベースにしたものであるため、濃縮中にバクテリアが経験したストレスあるいは死亡によるものと説明できる。

【0154】

uidA PCRは、三回の繰り返しで陽性であった。このことは、5リットルの中の50のバクテリア、すなわち1リットルあたり5のバクテリアが、全体としてこの方法を繰り返しても感応性を保持していることを示している。

【0155】

論理的には、抑制制御のために一部分にバクテリアDNAを付加すると、陽性の反応が得られる。C.parvumの場合には、個体群法（IMS－IFA）によって、理論的予想値より有意に低い計算が得られた。分子生物学にもとづく他の実験で、10リットル中一つの接合子囊の収集を繰り返すことができることが示されているので（この特許出願の中には開示されていないデータ）、この場合も、若干の接合子囊が、濾過装置の中に保持されずに濃縮中に悪い影響を受けたと考えることができる。

10

【0156】

ところで、IMS－PCRは、三回の繰り返しで陽性であった。このことは、5リットルの中の50のバクテリア、すなわち1リットルあたり5のバクテリアの感応性がきわめて低いことを示している。

【0157】

結論

この例は、二つの工程を一つにまとめた濃縮装置および分子生物学的方法を用いてバクテリアと寄生虫でドーピングした同じ水の試料を使用することの有効性を示している。

20

【符号の説明】

- 2 ハウジング
- 3 繊維
- 3 a 壁
- 4 開口
- A 内部通路
- B 外部通路
- C 弁
- D 弁
- E 弁

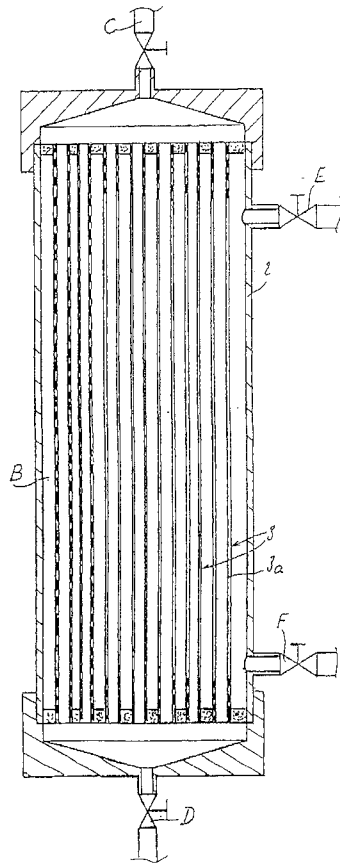
【図面の簡単な説明】

30

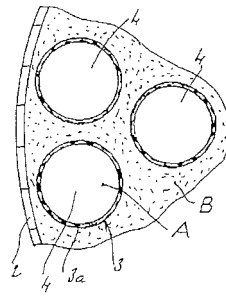
【図1】 本発明にもとづく濾過手段の縦断面略図である。

【図2】 図1の濾過手段の拡大断面図である。図面中の繊維の大きさは、本発明を理解しやすくするために、意図的に誇張して拡大されている。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
B 0 1 D	71/22	(2006.01)	B 0 1 D 71/16
B 0 1 D	71/42	(2006.01)	B 0 1 D 71/22
C 1 2 Q	1/24	(2006.01)	B 0 1 D 71/42
G 0 1 N	1/28	(2006.01)	C 1 2 Q 1/24
G 0 1 N	33/48	(2006.01)	G 0 1 N 1/28 J
C 1 2 M	3/06	(2006.01)	G 0 1 N 33/48 S
			C 1 2 M 3/06

- (72)発明者 ギヨロ, エマニュエル
フランス国 7 8 1 0 0 サン ゲルマン アン レイエ, リュ ド トゥールビル 2 3 ビス
- (72)発明者 デュラン-ブールリエ, ローレンス
フランス国 9 2 1 4 0 クラマル, アヴニュー マルゲリート ルノーダン 6 4
- (72)発明者 ビュルトー, ステファンヌ
フランス国 6 9 0 0 7 リヨン, リュ サン ジエロム 2 2

審査官 土岐 和雅

- (56)参考文献 英国特許出願公開第0 2 3 3 9 1 5 5 (GB, A)
特開平0 6-2 7 9 2 9 7 (JP, A)
特開平0 6-2 4 6 1 9 6 (JP, A)
特開昭6 1-2 5 5 6 6 5 (JP, A)
特開平1 0-3 1 4 5 5 2 (JP, A)
特開平1 1-0 9 0 1 8 4 (JP, A)
特開平1 1-1 8 8 2 4 6 (JP, A)
特開昭6 0-0 6 8 0 0 6 (JP, A)
Loc Trinh and Joseph Shiloach, Recovery of Insect Cells Using Hollow Fiber Microfiltration, Biotechnol Bioeng, 米国, 1 9 9 5年1 1月2 0日, Vol.48 No.4, 401-405
橋本温、志村有通、小川祐子、西崎綾、平田強, 中空糸UF膜による水中のCryptosporidium オーストの濃縮, 日本水環境学会年会講演集, 日本, 1 9 9 9年 3月1 5日, Vol.33, 495

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N1/00~1/44, B01D53/22, 61/00~71/00, C02F1/44