

表5 河川水から単離したクリプトスポリジウムの遺伝子型

試料番号	採取日	調査地点	遺伝子型
1	2007/8/28	小山川 高橋	<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
2		小山川 高橋	<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
3		A川 上流	<i>C. andersoni</i> (AB089285)
4			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
5			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
6			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
7		A川 中流	<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
8			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
9			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
10			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
11			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
12			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
13			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
14			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
15	2007/10/17		<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
16			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
17			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
18			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
19			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
20		A川 下流	<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
21			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
22			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
23			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
24			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
25			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
26			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
27			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
28			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
29			<i>C. andersoni</i> (AB089285)
30	2007/10/28	小山川 高橋	<i>C. andersoni</i> (AB089285)
31			<i>C. andersoni</i> (AB089285)
32		利根川 上武大橋	<i>C. andersoni</i> (AB089285)
33			<i>C. pig genotype II</i> (EF012375)
34	2007/12/17	小山川 高橋	<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
35			<i>C. pig genotype II</i> (EU331243)
36		A川 上流	<i>C. meleagridis</i> (AF112574)
37	2008/2/25		<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
38			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
39			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
40			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
41			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
42			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
43		A川 中流	<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
44			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
45			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
46			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
47			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
48			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
49			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
50			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
51		A川 下流	<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)
52			<i>C. pig genotype I</i> (AF115377)

53	C927	C. pig genotype I (AF115377)
54	C931	C. pig genotype I (AF115377)
55	C932	C. pig genotype I (AF115377)
56	C935	C. pig genotype I (AF115377)
57	C936	C. pig genotype I (AF115377)

表 6 河川水の試料からの代替トレーサーの回収率

濃縮及び精製法	膜		試料		オーシスト トレーサー			シスト トレーサー			
	種類	孔径 ( $\mu\text{m}$ )	寸法 (mm)	水量 (L)	濁度 (度)	検出数 (個)	回収率 (%)	平均値	検出数 (個)	回収率 (%)	平均値
アセトン溶解法 <sup>a)</sup>	MC <sup>c)</sup>	1.2	293	40	6.4	10	10	7.5	18	18	11.5
					9.5	5	5				
免疫磁気ビーズ法	MC <sup>c)</sup>	1.0	142	10	5.3	7	7	5.7	2	2	3.7
					5.3	6	6				
					5.3	4	4				
親水性 PTFE 法 <sup>b)</sup>	PTFE <sup>d)</sup>	1.0	142	10	5.3	59	59	50.6	41	41	40.8
					5.3	58	58				
免疫磁気ビーズ法					25.6	32	32		26	26	
					7.4	52	52		52	52	

<sup>a)</sup> メンブレンフィルター加圧ろ過—アセトン溶解法

<sup>b)</sup> 親水性 PTFE メンブレンフィルター法

<sup>c)</sup> Mixed Cellulose タイプ

<sup>d)</sup> 親水性 PTFE タイプ

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」  
平成 19 年度分担報告書

ハイドロキシアパタイトを用いた多種類の微生物の同時濃縮法の開発

分担研究者：片山浩之 東京大学 工学系研究科

協力研究者：金 京 柱 東京大学 工学系研究科

**A. 研究目的**

クリプトスポリジウムを捕捉するための手法としてハイドロキシアパタイト粒子を用いた方法が提案されているが、同時にウイルス濃縮を行うことが微生物監視の観点からは望ましい。

ハイドロキシアパタイト (HAP) は、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  という分子式で表される結晶で、酸性条件下で溶解する。この性質は、クリプトスポリジウム捕捉のために非常に有利な性質である。HAP で形成した層を用いてクリプトスポリジウムをサイズ面で捕捉した場合、回収することが容易であると考えられる。そこで、サイズが均質な HAP 粒子による層を形成する方法が開発され、実用化に向けて研究が進められている。

本研究では、この方法を取り入れて、クリプトスポリジウムのみならず腸管系ウイルスを濃縮する方法を開発することを試みる。腸管系ウイルスは、水道においても注意すべき管理対象として着目されていることから、水道水源となりえるような河川水からクリプトスポリジウム並びに腸管系ウイルスを測定することを想定して開発を試みる。既存のウイルス濃縮法である陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出法<sup>1)</sup>にお

いて、ハイドロキシアパタイト (HAP) 均等粒子層を膜面上に形成させてクリプトスポリジウムの回収を行い、同時にウイルス濃縮に支障がないかを調べる。HAP 層は、クリプトスポリジウムの回収を可能にし、さらには試料のろ過において膜の目詰まりを防ぐ効果などが期待されることから、水中の病原微生物監視のための重要な貢献になると考えられる。

**B. 方法**

大腸菌ファージ Q $\beta$  およびポリオウイルス 1 型ワクチン株を、精製水もしくは 50mM MgCl<sub>2</sub> 溶液に入れたものを試料として用いた。ナイロンメッシュフィルター（孔径 10 $\mu\text{m}$ 、口径 25mm）を支持層として 0.49g (1kg/m<sup>2</sup>) の HAP 粒子（直径 20 $\mu\text{m}$ ）を加えて層を形成させたものをろ材として用い、ウイルスの透過性を調べた。

次に、陰電荷をもつ精密ろ過膜（孔径 0.45 $\mu\text{m}$ 、セルロースアセテート製、ミリポア HA、口径 25mm）に HAP 粒子層を同じく形成させ、MgCl<sub>2</sub> 溶液に入れたポリオウイルスに対し、酸洗浄法を用いて濃縮し、その回収率を調べた。なお、HAP 粒子層がない場合にはウイルスは 80%程度の高い回収率を示すことがわかっている。

Q $\beta$  およびポリオウイルスの濃度をリアルタイム RT-PCR 法により測定し、その結果から回収率を算定した。

### C. 結果

表 1 にナイロンネットフィルターを用いた実験結果を、ウイルス透過率として示す。なお、ウイルスは後段の HA 膜において濃縮されることが期待されているため、HAP 層において 100%通過することが望ましい。

精製水を用いた場合には、Q $\beta$  およびポリオウイルスともに、一部のウイルスが HAP 粒子に吸着していることが分かった。また、Mg を添加した場合には、Q $\beta$  は HAP 粒子層を効率よく透過するのに対し、ポリオウイルスはほぼ完全に吸着していることが分かった。

この結果から、Mg を用いた場合にポリオウイルスがウイルス濃縮法で回収できない可能性が考えられたので、次いで、ウイルス濃縮を行ってその回収率を調べる実験を行った。結果を表 2 に示す。ポリオウイルスは高い回収率を示したことがわかる。

以上から、HAP 粒子層を用いた場合でも、ウイルス濃縮は可能であることが示された。

### D. 結論

これまでの 25mm 口径の平膜を用いた実験では、既存のウイルス濃縮法である陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出法において、ハイドロキシアパタイト (HAP) 均等粒子層を膜面上に形成させてもウイルス濃縮に支障がないことが分かった。クリプトスポリジウムとウイルスの同時濃縮のための有効な手法のシーズが得られた段階にある。

### 次年度の研究計画

H19 年度にウイルス濃縮法の可能性が示されたことを受け、H20 年度は実用的な規模にスケールアップすることを試みる。カートリッジ型の膜を用いて膜面積を大きくし、ろ過可能量を増やし、ウイルスの回収率に対する影響等を調べる。また、その際にクリプトスポリジウムの回収において支障がないか検討する。

### E. 参考文献

- 1) Katayama H., Shimasaki A. and Ohgaki S. (2002) Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater, *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1033-1039.

### F. 健康危機管理情報

なし

### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

Kyungju Kim, Hiroyuki Katayama and Shinichiro Ohgaki (2007) Development of a concentration system for *Cryptosporidium* oocysts and bacteriophage Q $\beta$  for single sample by using hydroxylapatite, *Proc. Of 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology*, Sep 9-15, 2007, Tokyo, Japan

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 HAP層のウイルス透過率

	精製水	Mg
Q $\beta$	24%	97%
ポリオウイルス	5%	0.5%

表2 ポリオウイルスの回収率

	回収率	標準偏差
ポリオウイルス	140%	±49%

研究成果の刊行に関する一覧表 (平成 19 年度)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Pei Y, Terajima J, Saito Y, Suzuki R, Takai N, Izumiya H, Morita-Ishihara T, Ohnishi M, Miura M, Iyoda S, Mitobe J, Wang B, Watanabe H.	Molecular Characterization of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 Isolates Dispersed across Japan by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis.	Jpn J Infect Dis.	61(1)	58-64	2008
Yoshitoshi Ogura, Tadasuke Ooka, Asadulghani., Jun Terajima, Jean-Philippe Nougayrede, Ken Kurokawa, Kousuke Tashiro, Toru Tobe, Keisuke Nakayama, Satoru Kuhara, Eric Oswald, Haruo Watanabe and Tetsuya Hayashi.	Extensive Genomic Diversity and Selective Conservation of Virulence-Determinants in Enterohaemorrhagic Escherichia coli strains of O157 and non-O157 serotypes.	Genome Biology	8(7)	R138	2007
Fumihiko Kawamori, Midori Hiroi, Tetsuya Harada, Katsuhiko Ohata, Kanji Sugiyama, Takashi Masuda and Norio Ohashi	Molecular typing of Japanese Escherichia coli O157:H7 isolates from clinical specimens by multilocus variable-number tandem repeat analysis and PFGE	J Med Microbiol	57	58-63	2008
Ichiro Tatsuno, Jun Sawai, Akira Okamoto, Masakado Matsumoto, Masaaki Minami, Masanori Isaka, Michio Ohta and Tadao Hasegawa	Characterization of the NAD-glycohydrolase in streptococcal strains.	Microbiology	153	4253-4260	2007

Seto, K., Taguchi, M., Kobayashi, K., Kozaki, S.	Biochemical and molecular characterization of minor serogroups of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> isolated from humans in Osaka Prefecture.	J. Vet. Med. Sci.	69	1215-1222	2007
Yamazaki-Matsune, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., Kitazato, M., Nukina, M., Misawa, N., Tsukamoto, T.	Development of a multiplex PCR assay for identification of <i>Campylobacter coli</i> , <i>C. fetus</i> , <i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>C. lari</i> and <i>C. upsaliensis</i> .	J. Med. Microbiol.	56	1467-1473	2007
Shimosako, J., Onaka, T., Yamanouchi, M., Yokota, M., Nakamura, T., Fujii, F., Matsumoto, E., Shibata, H., Fukuda, M., Tanaka, T.	An Outbreak of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing <i>Shigella sonnei</i> at a Day Care Nursery in Sakai City	Jpn. J. Infect. Dis.	60	408-409	2007
Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS	Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens.	Arch Virol	152	457-61	2007
Ozawa K, Oka T, Takeda N, Hansman GS	Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan.	J Clin Microbiol	45	3996-4005	2007
Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, Katayama K, Miyashita K, Takagi H, Tohya Y, Sato H, Takeda N	Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases.	J Virol	81	6798-806	2007

Hansman GS, Sano D, Ueki Y, Imai T, Oka T, Katayama K, Takeda N, Omura T	Sapovirus in water, Japan.	Emerg Infect Dis	13	133-5	2007
Hansman GS, Saito H, Shibata C, Ishizuka S, Oseto M, Oka T, Takeda N	An outbreak of gastroenteritis due to Sapovirus.	J Clin Microbiol	45	1247-1349	2007
Hansman GS, Oka T, Sakon N, Takeda N	Antigenic diversity of human sapoviruses.	Emerg Infect Dis	13	1519-1525	2007
Hansman GS, Oka T, Okamoto R, Nishida T, Toda S, Noda M, Sano D, Ueki Y, Imai T, Omura T, Nishio O, Kimura H, Takeda N	Human sapovirus in clams, Japan.	Emerg Infect Dis	13	620-2	2007
Hansman GS, Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Oka T, Takeda N	Recombinant sapovirus gastroenteritis, Japan.	Emerg Infect Dis	13	786-788	2007
Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N	Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification.	Rev Med Virol	17	133-41	2007
Susana Guix, Miyuki Asanaka, Kazuhiko Katayama, Sue E. Crawford, Frederick H. Neill, Robert L. Atmar, and Mary K.	EstesNorwalk Virus RNA Is Infectious in Mammalian Cells.	J Virol	81	12238-12248	2007
片山和彦	NoV 複製系における最近の知見	IASR	28	293-294	2007
片山和彦	NoV について	心と体の健康	11	86-88	2007
田中智之、武田直和	ノロウイルスの現状と院内感染対策	感染症	37(3)	94-104	2007
田中智之、奥田真珠美	ウイルス性胃腸炎診断法の進歩と院内感染予防対策	小児科診療	70(6)	985-990	2007
田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和	院内発生時における感染拡大防止対策 -ノロウイルス	月刊薬事	49(11)	37-42	2007



田中智之、三好龍也、 内野清子、武田直和	調理従事者を介して起こるノロウイルス食中毒	食と健康	10	6-14	2007
田中智之、加藤大介、 鎌田公仁夫、三好龍也、 内野清子、吉田永祥、 田尻 仁、奥田真珠美、 中山佳子、平山吉郎、 北元憲利、武田直和	ノロウイルス迅速抗原検査	検査と技術	36(3)	235-239	2007