

## 1-4 病原微生物の同定方法および挙動に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 11～平 17

担当チーム：材料地盤研究グループ（リサイクル）

研究担当者：尾崎正明、諏訪守、陶山明子

### 【要旨】

17年度は、PCR法によるクリプトスポリジウムの検出において流入下水からのオーシストの回収率を向上させることを目的に、試料の前処理法を変更し、その回収率の評価を行った。その結果、流入下水からのオーシストの回収では、前処理として100Gの粗遠心処理を行うことで回収率は向上するため、検出感度は従来法よりも若干高くなるものと考えられた。ウイルスに関しては低濃度試料に対応した安定した測定値を得るため、現状のウイルスの定量・検出限界値を明らかにするとともに、検出感度を向上させるため濃縮試料中から抽出したウイルス遺伝子の逆転写効率の検討を行った。その結果、逆転写反応に関しては、添加するプライマー濃度を10 $\mu$ M、鋳型となる遺伝子量を0.5 $\mu$ gとすることで逆転写効率は向上し、検出感度が従来法よりも高くなった。

キーワード：クリプトスポリジウム、オーシストの回収率、ノロウイルス、リアルタイムPCR法

### 1. はじめに

下水処理水が関与した病原微生物による集団感染を未然に防止するため、下水処理水の病原微生物に関する安全性確保が求められている。下水処理水の衛生学的安全性を評価するためには、下水中の極低濃度の病原微生物を、迅速・簡便・安全に検出できる方法の開発と、下水処理過程や環境水中での病原微生物の挙動を解明することが重要である。

本課題では上記の要請を踏まえ、分子生物学的手法（特にPCR (Polymerase Chain Reaction) 法）により、下水中・環境水中のウイルスおよび原虫を、迅速かつ高感度に検出できる手法を提案し、また下水処理過程や環境中でのウイルスおよび原虫の挙動を解明することを目的としている。本研究で研究対象としている病原ウイルスはノロウイルス、原虫はクリプトスポリジウムであり、17年度は以下の研究を行った。

- 1) 流入下水からのオーシスト回収率を向上させるための試料の前処理法に関し検討を行った。
- 2) 現状のウイルスの定量・検出限界値を明らかにし、測定値に関し信頼性を評価した。
- 3) 低濃度試料に対応したウイルス測定法を確立するために、抽出遺伝子の逆転写効率の向上手法を評価した。

### 2. 研究目的

#### 2.1 流入下水からのオーシスト回収率の向上実験

リアルタイムPCR法によるオーシストの測定感度は1オーシストであるが、試料中のオーシストを測定する場合には濃縮・回収・精製プロセスが必要であるため、実際に含まれる個数に対する測定個数は低くカウントされる。これら回収割合を把握するための回収率試験結果では、流入下水試料20%、処理水20～50%、精製水40～70%程度と特に流入下水では低レベルであった。このため検出感度の向上を目的に測定試料の前処理法を見直し、回収率改善のための検討を行った。

#### 2.2 ウイルス

下水中のウイルスは処理過程の進行や河川水などへの放流により希釈され低濃度となるため、その測定値にバラツキが生ずる可能性がある。特に抽出遺伝子の逆転写効率は、安定した測定値を得る上で重要な測定プロセスの1つと考えられる。また、細胞培養法で検出ができないノロウイルスは、リアルタイムPCR法により下水処理過程での消長を含めその実態を明らかにすることが求められている。

本研究の目的は、下水処理水や河川水などの環境水中に低濃度に存在するウイルスの測定法を確立するため、現状のウイルスの定量・検出限界値を明らかにして信頼性の評価を行うとともに、抽出遺伝子の逆転写効率の向上手法を検討するものである。

### 3. 研究方法

#### 3. 1 流入下水からのオーシスト回収率の向上実験

従来の測定法では、オーシストとともに濃縮された夾雑物などが超音波剥離やビーズによる精製に悪影響を及ぼしている可能性が推定された。このため、夾雑物の影響を極力回避するため、流入下水の前処理法として 100G、200G の 10 分間の粗遠心処理を行った。遠心処理後、上澄液をポリカーボネート製メンブランフィルター（公称孔径 2 μm）でろ過し超音波剥離させ免疫磁気ビーズで分離精製の後、PCR 法により定量を行い回収率を算出した。併せて従来の測定法や顕微鏡観察による定量法によっても回収率試験を行い、その割合を比較して向上率を把握した。PCR 法においては、凍結融解と DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を組み合わせた方法により、オーシスト DNA を抽出し、Roche 社製の Real Time PCR 装置 (LightCycler) でオーシスト数の定量を行った。顕微鏡観察法においては、免疫磁気ビーズで分離精製したオーシストを染色キットを用いて蛍光染色を行い、顕鏡によりオーシスト数を定量した。

#### 3. 2 ウイルス

##### 3. 2. 1 ウイルス遺伝子の抽出

流入下水 500 ml、二次処理水 1 L、高度処理水（砂ろ過水）2 L を試料水として用いた。試料水中のウイルスはポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法により濃縮した。すなわち試料水 1 L に対して PEG#6000（終濃度 8%）および NaCl（終濃度 0.4 M）を添加して攪拌し完全に溶解させた。4℃ で一夜静置した後、10,000×g、30 分遠心分離して沈殿を回収し、RNase-free 水 0.5~1 ml に再浮遊させてウイルス濃縮液とした。ウイルス濃縮液からのウイルスのゲノム RNA の抽出には QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN) を使用した。抽出した RNA に微量に含まれている DNA を除去するため DNase I 処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit (QIAGEN) を用いて RNA を精製した。

##### 3. 2. 2 リアルタイム PCR 法

内部蛍光プローブを用いる TaqMan™ PCR 法を用いてウイルスのゲノム RNA を定量した。すなわち上記で抽出したウイルス RNA 1 μg からランダムプライマー（ヘキサマー）、Omniscript RT Kit (QIAGEN) を用いた逆転写反応により cDNA を作製し、2 μl をリアルタイム PCR に供した。リアルタイム PCR は QuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN) を用いて行った。使用したプライマ

ーおよびプローブを表-1 に示す。

ファージ Qβ の検出は、片山らの報告<sup>1)</sup> に準じた。またノロウイルスの検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、食安監発第 1105001 号「ノロウイルスの検出法について」に準じ、エンテロウイルスの検出は Nijhuis らの報告<sup>2)</sup> に準じた。リアルタイム PCR 装置は LightCycler (ロシュ・ダイアグノスティックス社) を使用した。

表-1 使用したプライマーおよびプローブ

対象ウイルス		プライマー		プローブ
ファージ Qβ		Qβ+	Qβ-	Qβ probe
ノロウイルス	GI 型	COG1F	COG1R	RING1-TP (a) と RING1-TP (b) を混合
	GII 型	COG2F	COG2R と ALFP を混合	RING2AL-TP
エンテロウイルス		FEV1	REV1	EVP1
		FEV1	REV2	EVP2

##### 3. 2. 3 定量・検出限界

リアルタイム PCR によるウイルス濃度測定では、低濃度 (10 コピー/リアルタイム PCR 反応溶液) では測定値のばらつきが大きい。下水処理水中のウイルス濃度は低濃度であるため、定量・検出限界を把握し、検出感度の向上を図る必要がある。

検出限界の検討では、陰性コントロール（水、すなわちノロウイルス 0 コピー）を用いて、同一人、同一装置、同時測定でリアルタイム PCR による多重測定 (20 重) を行った。

定量限界の検討では、2、5、10、20 コピー/リアルタイム PCR 反応液のノロウイルス GI 型および GII 型遺伝子 (DNA) を用いて、同一人、同一装置、同時測定でリアルタイム PCR による多重測定 (18 重) を行い、相対標準偏差 (RSD) を調べた。

使用したノロウイルス遺伝子は、260 nm の吸光度を測定し、次式から濃度を算出した。

ノロウイルス遺伝子濃度 (コピー数/μl) = [260 nm の吸光度] × 50 × 10<sup>-9</sup> × 6.02 × 10<sup>23</sup> / ノロウイルス遺伝子の塩基数 / 660

\* 今回使用したノロウイルス遺伝子の塩基数は、ノロウイルス GI 型 : 85 塩基、ノロウイルス GII 型 : 98 塩基である。



### 3. 2. 4 抽出遺伝子の逆転写効率の向上

リアルタイム RT-PCR では、ランダムプライマー（ヘキサマー、ノナマーなど）またはオリゴ dT プライマーを逆転写反応に使用することができる。従来法ではランダムプライマー（ヘキサマー）を 1 μM（終濃度）添加していたが、①ランダムプライマーの添加量は 10 μM（終濃度）を推奨する、②ランダムプライマー（ノナマー）あるいはオリゴ dT ランダムプライマーを使用すると逆転写効率が向上する、という報告<sup>3)</sup>があった。そこで、逆転写効率の向上を目的として、同一試料を用いてプライマーの種類および濃度の違いによる逆転写反応の効率を評価した。さらに、逆転写反応に関与する逆転写酵素の反応効率を向上させるため、反応基質として添加する抽出遺伝子濃度の最適化を検討した。

プライマーの検討実験では、A 下水処理場二次処理水から抽出したウイルス遺伝子 1 μg と各プライマー、Omniscrypt RT Kit (QIAGEN) を用いた逆転写反応を行い、cDNA を作製し、3. 2. 2 のとおりリアルタイム PCR を行い、ノロウイルス濃度を測定し、ノロウイルス濃度が高いものほど逆転写効率が良いと判定した。各プライマーは①ランダムプライマー（ヘキサマー）（終濃度 1 μM）、②ランダムプライマー（ヘキサマー）（終濃度 10 μM）、③ランダムプライマー（ノナマー）（終濃度 10 μM）、④オリゴ dT プライマー（終濃度 1 μM）⑤ランダムプライマー（ヘキサマー）（終濃度 10 μM）+オリゴ dT プライマー（終濃度 1 μM）⑥ランダムプライマー（ノナマー）（終濃度 10 μM）+オリゴ dT プライマー（終濃度 1 μM）である。

抽出遺伝子最適濃度の検討実験では、A 下水処理場二次処理水から抽出したウイルス遺伝子 0.05 μg、0.1 μg、0.5 μg、1 μg、とランダムプライマー（ヘキサマー）（終濃度 1 μM）、Omniscrypt RT Kit を用いた逆転写反応により cDNA を作製し、3. 2. 2 のとおりリアルタイム PCR を行い、ノロウイルス濃度を測定した。

## 4. 研究結果と考察

### 4. 1 流入下水からのオーシスト回収率の向上実験結果

オーシスト回収率の向上実験結果を表-2 に示す。従来法は目開きが 20 μm のふるいで夾雑物を除去、フィルターでろ過濃縮を行い、超音波剥離させた後、夾雑物とオーシストを免疫磁気ビーズで分離精製させ PCR 法あるいは顕微鏡観察により測定を行った。その平均回収率は 20% 程度であったが、前処理として 100

G、200G の 10 分間の粗遠心処理を行った流入下水試料では、各々 40、33% 程度と回収率は従来法と比較して 10~20% 向上しており、100G の前処理の回収率では約 1.5 倍となり、以前の回収率試験で得られた処理水の回収率とほぼ同等となった。これは、粗遠心処理による夾雑物の除去量がふるいよりも多くかつ前処理の遠心力が 100G あるいは 200G と比較的 low、オーシスト自体が沈降せず夾雑物との分離が比較的良好に行えたため、測定プロセス後段の分離、精製に及ぼす影響が少なくなったものと考えられる。

よって、本前処理法を適用することで流入下水からのオーシストの回収率が向上するため、検出感度を高めることができるものと考えられた。

表-2 流入下水からのオーシストの回収率

前処理法 検出法	%		
	ふるい (従来法)	遠心処理 (100 G)	遠心処理 (200 G)
リアルタイム PCR 法	26	40	33
顕微鏡における検鏡	33	43	27

## 4. 2 ウイルス

### 4. 2. 1 定量・検出限界

低濃度試料に対応した安定した測定値を得るために、まず現行法における定量・検出限界を明らかにした。検出限界値は、陰性コントロール（水、すなわちノロウイルス 0 コピー）を用いて、同一人、同一装置、同時測定でリアルタイム PCR による多重測定（20 重）を行い求めた。その結果を表-3 に示す。

ノロウイルス GI 型検出用プライマーおよびプローブを使用した場合、20 個の測定値のうち 5 個が 0 より大きい値（0.7695 から 2.607）を示した。ノロウイルス GII 型検出用プライマーおよびプローブを使用した場合は、20 個の測定値のうち 15 個が 0 より大きい値（0.2710 から 2.148）を示した。

表-3 陰性コントロール（0 コピー）の多重測定結果 (n=20)

使用したプライマー及び プローブ	測定値平均（コピー） [ ]内は測定値の範囲	標本標準偏差
ノロウイルス GI 型 検出用	0.375 [ 0 ? 2.607]	0.75
ノロウイルス GII 型 検出用	0.595 [ 0 ? 2.148]	0.62

検出限界値は下水試験方法<sup>4)</sup>を参照して、以下の式から算出した。

$$xL = xb + k\sigma B \quad (k=3)$$

検出限界値  $xL$ 、平均値  $xb$ 、標準偏差  $\sigma B$

測定結果から得られた平均値、標準偏差(表-3)を上式の式に代入し、ノロウイルス GI 型の検出限界値: 2.63 コピー/リアルタイム PCR 反応液、ノロウイルス GII 型の検出限界値: 2.46 コピー/リアルタイム PCR 反応液、が得られた。

よって上記濃度がリアルタイム PCR での検出限界値である。

次に、定量限界値の検討を行った。2、5、10、20 コピー/リアルタイム PCR 反応液のノロウイルス GI 型および GII 型遺伝子(DNA)を用いて、同一人、同一装置、同時測定でリアルタイム PCR による多重測定(18重)を行い、相対標準偏差(RSD)を算出することで測定値のばらつきを評価した。評価結果を表-4に示す。ノロウイルス GI 型および GII 型とも 10 コピーの場合に最小の RSD 値(29%)を示すことを明らかにした。

検出限界はリアルタイム PCR 反応液あたりノロウイルス GI 型で 2.63 コピー、ノロウイルス GII 型で 2.46 コピー、定量限界はリアルタイム PCR 反応液あたり 10 コピーであることから、定性的な評価では 2.63 コピー、定量的評価では 10 コピー以上の濃度が必要であると考えられた。

以上の知見から、安定した測定値を得るために必要な遺伝子量を明らかにすることができた。

表-4 リアルタイム PCR によるノロウイルス遺伝子測定の RSD (n=18)

使用したプライマー及びプロブ	ノロウイルス遺伝子コピー数 (コピー/リアルタイム PCR 反応液)	RSD (%)
ノロウイルス GI 型 検出用	2	107
	5	68
	10	29
ノロウイルス GII 型 検出用	2	63
	5	42
	10	29

#### 4. 2. 2 抽出遺伝子の逆転写効率の向上

リアルタイム RT-PCR では、ランダムプライマー(ヘ

キサマー、ノナマーなど)またはオリゴ dT プライマーを逆転写反応に使用することができる。従来法ではランダムプライマー(ヘキサマー)を 1  $\mu\text{M}$ (終濃度)添加していたが、ランダムプライマーの添加量を増加させることにより逆転写効率が向上する、またランダムプライマー(ノナマー)あるいはオリゴ dT ランダムプライマーの使用により逆転写効率が向上する、という報告<sup>3)</sup>があった。そこで、同一試料を用いて、プライマーの種類および濃度の違いによる逆転写反応の効率を評価した。その結果を表-5に示す。

従来法ではノロウイルス GII 型が  $1.48 \times 10^2$  コピー/ル検出されたが、同一試料を用いてランダムプライマー(ヘキサマー)を 10 倍量(終濃度 10  $\mu\text{M}$ )添加して逆転写反応を行った場合、ノロウイルス GII 型は  $3.30 \times 10^2$  コピー/ル検出され、従来法より検出感度は約 2.2 倍向上した。またランダムプライマー(ノナマー)を終濃度 10  $\mu\text{M}$  添加して逆転写反応を行った場合も  $2.90 \times 10^2$  コピー/ル検出され、従来法より検出感度は約 2 倍向上した。これは添加量が多いほど、ランダムプライマーが抽出遺伝子と効率よく結合して逆転写反応を開始できるためであると考えられる。

一方、オリゴ dT プライマー(終濃度 1  $\mu\text{M}$ )を使用した場合は  $2.30 \times 10^1$  コピー/ルと従来法の 16%程度のウイルス量しか検出できなかった。これは、ランダムプライマーを用いた逆転写反応では RNA 分子の数箇所逆転写反応が開始されるが、オリゴ dT プライマーを用いると 3'末端のみから逆転写反応が開始されるため、反応効率に差が生じたと考えられる。

よって今回の実験結果から、終濃度 10  $\mu\text{M}$  のランダムヘキサマーを逆転写反応に用いることで反応効率が向上することから、検出感度を高めることができた。

表-5 逆転写反応に及ぼすプライマーの影響

逆転写反応に使用したプライマー	ノロウイルス濃度 (コピー/ル)
ランダムプライマー(ヘキサマー)(終濃度 1 $\mu\text{M}$ ) (従来法)	$1.48 \times 10^2$
ランダムプライマー(ヘキサマー)(終濃度 10 $\mu\text{M}$ )	$3.30 \times 10^2$
ランダムプライマー(ノナマー)(終濃度 10 $\mu\text{M}$ )	$2.90 \times 10^2$
オリゴ dT プライマー(終濃度 1 $\mu\text{M}$ )	$2.30 \times 10^1$
ランダムプライマー(ヘキサマー)(終濃度 10 $\mu\text{M}$ ) +オリゴ dT プライマー(終濃度 1 $\mu\text{M}$ )	$3.47 \times 10^1$
ランダムプライマー(ノナマー)(終濃度 10 $\mu\text{M}$ ) +オリゴ dT プライマー(終濃度 1 $\mu\text{M}$ )	$8.83 \times 10^0$



次に、逆転写酵素の反応基質となる抽出遺伝子濃度の最適化を検討した。その結果を図-1に示す。従来法(抽出遺伝子を1.0 $\mu$ g添加)ではノロウイルスGII型は $9.55 \times 10^1$ コピー/L検出されたが、添加する抽出遺伝子の濃度を0.05 $\mu$ g、0.1 $\mu$ g、0.5 $\mu$ gとした場合、それぞれ $1.02 \times 10^2$ コピー/L、 $1.88 \times 10^2$ コピー/L、 $4.13 \times 10^2$ コピー/L検出された。抽出遺伝子濃度の増加に伴い逆転写効率が向上し、抽出遺伝子濃度0.5 $\mu$ gで逆転写効率が最大となり、1.0 $\mu$ gでは逆転写効率が低下することが明らかとなった。一般に酵素反応においては基質濃度の増加とともに反応速度が増加するが、基質濃度が過剰になると反応速度は平衡に達し減少する。逆転写反応も逆転写酵素による酵素反応であるため、同様の傾向を示した。

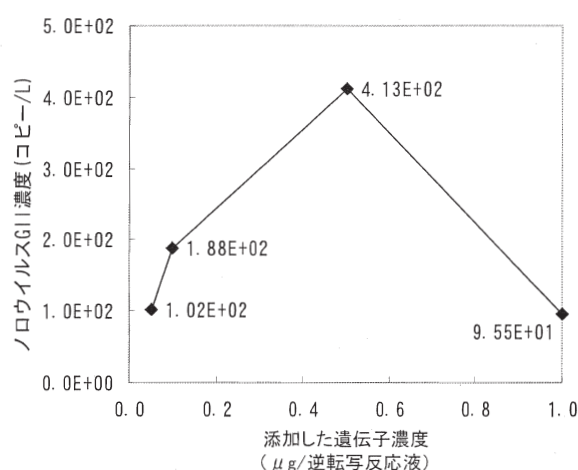


図-1 逆転写反応に及ぼす鋳型遺伝子濃度の影響

今回の結果から、添加する抽出遺伝子の最適濃度を0.5 $\mu$ gとすることで検出感度が約4.3倍向上させられることを明らかにした。

## 5. まとめ

17年度は、流入下水からクリプトスポリジウムのオーシストの回収率を向上させることを目的に、試料の前処理法を変更しその回収率の評価を行った。ウイルスに関しては低濃度試料に対応した安定した測定値を得るため、濃縮試料中から抽出したウイルス遺伝子の逆転写効率の向上手法を評価した。さらに、現状のウイルスの定量・検出限界値を明らかにし、その向上手法についても検討を行った。以下に結果を示す。

1) 流入下水からのオーシストの回収では、前処理として100Gの粗遠心処理を行うことで回収率は

向上するため、検出感度を高めることができるものと考えられた。

- リアルタイムPCRによるノロウイルスの現出・定量限界値を求め、安定した定量値を得るためには10コピー以上の濃度(反応溶液あたりのコピー数)が必要であることを明らかにした。
- 逆転写反応において終濃度10 $\mu$ Mとなるようランダムヘキサマーまたはランダムノナマーを添加することで抽出遺伝子の逆転写効率を向上できる、また鋳型となるウイルス遺伝子を0.5 $\mu$ gを添加することで抽出遺伝子の逆転写効率を向上できるため、低濃度試料に対応したウイルスの測定法を確立できた。

## 6. 本研究の総括

本研究の目標は、分子生物学的手法(リアルタイムPCR法)を活用した病原性原虫、ウイルスの迅速・高感度検出法の提案、下水処理過程や水環境中での原虫やウイルスの挙動解明、環境中での病原性原虫の感染性消失効果の解明である。各々の目標に対して得られた成果を以下に述べる。

### 6.1 リアルタイムPCR法を活用した病原性原虫、ウイルスの迅速・高感度検出法の提案

- クリプトスポリジウムのオーシストの検出では、DNAの蛍光標識法の1手法であるハイブリダイゼーション法を適用することで特異性の高い検出が可能となることを明らかにした。
- 18SリボソームDNA遺伝子を標的とし、土木研究所が開発したプローブ、プライマーを適用することでオーシスト数1個相当から定量検出可能とすることが可能となった。また、下水中からのオーシストの検出は、免疫磁気ビーズで回収を行い、凍結融解+スピナム法でDNAの精製を行うことで可能とすることを明らかとした。
- リアルタイムPCR法は顕微鏡観察と比較して、高濃度域においても同程度の検出感度であることを明らかとした。
- 流入下水からのオーシストの回収では、試料の前処理法として粗遠心処理を行うことで回収率は向上するため、検出感度を高めることができた。

従来の顕微鏡観察によるオーシストの検出法と比較して迅速にまた、顕微鏡観察では検出されたオーシストの判定に熟練を要したが、リアルタイム

PCR法の適用はこのような労力を必要としない。

- 5) リアルタイムPCR法によるノロウイルスの検出では、各種の濃縮・誘出法を検討し、高回収率の得られる手法を提案した。流入下水を対象とした場合、超遠心処理法やポリエチレングリコール沈殿法、二次処理水などの清浄な試料ではセルロース吸着・凝集法を適用することで高回収率が得られる。
- 6) ノロウイルスの検出・定量限界値を求め、安定した測定値を得るために必要な遺伝子量を解明した。
- 7) 適用プライマーとその添加濃度さらに、抽出遺伝子濃度の違いによる逆転写効率を評価し、最適条件を確立したことでウイルスの検出感度を高めることができた。

細胞培養法による従来の腸管系ウイルスの測定法と比較して、迅速・簡易かつ高感度に測定が行えることを可能とした。

## 6. 2 下水処理過程や水環境中での原虫やウイルスの挙動解明

- 1) 活性汚泥処理法によるオーシストの除去率は2log程度であり、感染症発生時において高濃度のオーシストが流入する場合には、除去率を向上させるために追加対策手法の導入が必要であることを明らかにした。
- 2) 凝集剤添加活性汚泥法、凝集剤添加砂ろ過法のオーシスト除去率を評価し、下水処理場における除去率向上手法を確立した。
- 3) 再生水中の腸管系ウイルス濃度の分布と人が誤摂取する再生水量から、ウイルスに感染するリスクを計算し、ウイルス制御手法の選定方法を提案した。
- 4) 流入下水中のノロウイルス濃度は、夏季と冬季で大きな違いがあり、高濃度のウイルスが流入する冬季では、処理水中への残存が測定されたため、冬季の感染流行期における下水処理場での対策の必要性を明らかにした。
- 5) ノロウイルスの分子系統解析を行ったが、流入下水中には複数の遺伝子型が存在しており、また採水日毎に検出される遺伝子型が異なっていた。

## 6. 3 環境中での病原性原虫の感染性消失効果の解明

- 1) マウスを利用した感染性の評価では、海水、水道水、河川水の順で感染確率が低下するが、これらの試料中に1ヶ月間保存した後でも感染能力を有していることを明らかにした。
- 2) 細胞培養法による顕微鏡観察およびELISA法によってもオーシストの感染能力の有無を判定できるため、マウスの感染性試験と比較すれば、簡易かつ短期間で感染能力の把握が行えることを明らかにした。

## 今後の課題

現在のところノロウイルスに関しては生死判定を行うことができないため、今後はリアルタイムPCR法を適用した消毒による不活化効果の判定手法の構築、さらに、冬季の感染流行期における下水処理場での対策手法の構築などが必要である。

なお、本研究は、運営費交付金（一般勘定）により実施されたものである。

## 参考文献

- 1) 片山浩之他(2002) 陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出によるウイルス濃縮法の開発, 水環境学会誌, 25(8), 469-475.
- 2) M. Nijhuis, N. van Maarseveen, R. Schuurman, S. Verkuijlen, M. de Vos, K. Hendriksen and A. M. van Loon. (2002) Rapid and Sensitive Routine Detection of All Members of the Genus Enterovirus in Different Clinical Specimens by Real-Time PCR. J. Clinical. Microbiol., 40(10), 3666-3670.
- 3) リアルタイムPCR成功のための重要なファクター, 平成14年, (株)キアゲン配布資料.
- 4) 下水試験方法 上巻-1997年度版-p.46~48