原 著

培養細胞における腸管アデノウイルスの分離に関する研究

荒 木 和 子

(帝京大学医学部小児科学教室)

(受付: 昭和61年9月110日)

総 括

1982年—1985年の冬期の急性胃腸炎患児から急性期下痢便を採取した。ラテックス凝集法による糞便中のロタウイルス陰性の材料、あるいはロタウイルス抗原の検出を行っていない糞便材料の計765検体について電子顕微鏡法によってアデノウイルスの検出を試みた。23検体でアデノウイルスが観察された。他の施設ですでに電顕法などでアデノウイルス陽性の11糞便材料がさらに送付されたので対象に加えた。

これら34検体の糞便材料について培養細胞を用いてウイルス分離を行った。また糞便材料、および感染細胞中のアデノウイルスを精製し、ウイルス DNA を制限酵素により切断して電気泳動法を行い、DNA の分析を行った。

15検体の糞便材料を HEP-2, ヒト胎児腎 (HEK), および293細胞に接種してそれぞれ3代継代した。8検体から腸管アデノウイルス (アデノウイルス40, 41; Ad40, Ad41) が分離された。また Ad40 の分離された3検体、およびその他の2検体より Ad 1, および Ad 5 が分離された。アデノウイルス陽性材料については DNA 分析、および抗血清を用いた中和反応 (Ad 1, Ad 5) によって血清型を同定した。

これら15検体中11検体の糞便材料を293細胞と共生培養法 (co-cultivation) によって増殖させ継代した。腸管アデノウイルスの増殖、継代とも通常のウイルス分離法によるよりも co-cultivation の方法によった方が成績が良かった。とくに Ad40 では293細胞との co-cultivation による1代めの感染細胞からの DNA の検出率

がもっとも優れていた。

残りの検体についても293細胞との co-cultivation を行った。総計29検体について co-cultivation を施行し、24検体でアデノウイルスが陽性 (82.8%) であった。Ad40が16検体、Ad41が5検体、および Ad31が3検体であった。

えられた5例のベア血清では糞便材料より検出されたアデノウイルスと同型の血清型に対する抗体陽転がみられた。

序 文

乳幼児の急性ウイルス性胃腸炎の患児の糞便からは、電子顕微鏡法によって様々なウイルスが検出されている。その中でロタウイルスは主として冬期の主要な病因ウイルスとなっている。次いで多く検出されるのは腸管アデノウイルスである¹⁾。ロタウイルスは1981年に Sato ら²⁾ によって培養細胞を用いて糞便材料からのウイルス分離が可能となった。その後急速にロタウイルスのウイルス学的、疫学的研究が進められ多くのことが解明されてきた。腸管アデノウイルスはその抗原性の相異と腸管酵素を用いた DNA の解析によってアデノウイルス40 (Ad40)、アデノウイルス41 (Ad41) に分類されている。Ad40, Ad41は従来の1~39型のアデノウイルスと異なり、HeLa, HEP-2, HEK (ヒト胎児腎細胞) などの細胞でのウイルス分離、継代が不可能でであった。1981年になって Chang conjunctiva 細胞³⁾, Graham 293細胞 (293)⁴⁾, あるいは継代3代めのサル腎細胞⁵⁾ で増殖可能なことであった。

腸管アデノウイルスは世界各地の急性胃腸炎患児の糞便から検出されている。本邦でも Cliba ら⁶⁾ によって Ad40 の流行例が報告されているが、培養細胞でのウイルス分離を行った報告はまだない。

ここでは293細胞, HEP-2細胞, および HEK 細胞を用いて急性胃腸炎患児の糞便からアデノウイルスの分離

Isolation of enteric adenoviruses in cell cultures

Kazuko Araki

(Department of Pediatrics Teikyo University School of Medicine)

と継代を行ったので報告する。分離したアデノウイルスのDNAを制限酵素で切断して電気泳動法を行い、その泳動型をみた。また293細胞でco-cultivationを行うことにより、さらに効率よく腸管アデノウイルスが増殖し継代可能であることを明らかにした。

材料と方法

糞便材料：糞便材料は1982年から1985年の間の急性胃腸炎患児の急性期下痢便を用いた。

ラテックス凝集反応法(ロタレックス・第一化学薬品)でロタウイルス抗原陰性であった糞便材料、あるいはロタウイルス抗原の検出を行っていない糞便材料の計765検体について電子顕微鏡(EM)で検索を行った。23検体でアデノウイルス粒子が観察された。また他の施設で電顕法などでアデノウイルスの存在が確認された11糞便材料が送付された。これらアデノウイルス陽性の糞便材料を以下のグループに分けた。

I グループ・1984年11月から1985年3月の間に帝京大学医学部附属病院およびその近郊の病院を受診した乳幼児からえた12検体。これらと同時期に広島市および札幌市でそれぞれ採取され送付された2検体を加えた計14検体をIグループとした。

II グループ・1985年11月から12月の間に帝京大学附属病院の外来を受診した患児からえた5検体、および入院患児からえた4検体の計9検体をIIグループとした。

III グループ・1982年から1985年に埼玉県衛生研究所でEMによりアデノウイルスが検出された糞便材料の10検体をIIIグループとした。

すでにAd40と同定されている1検体の糞便材料⁶⁾(札幌医科大学より分与された)は、I～IIIグループとは別の対象とした。

34検体の糞便材料は培養細胞を用いてウイルス分離を行った。また糞便材料から直接ウイルスを精製し、DNAの分析を行った。

EM：糞便中のアデノウイルスの検索、およびウイルス分離で細胞変性効果(CPE)の観察された検体からのウイルスの検出はネガティブ染色法によるEMで行った。グリット(H-400, Veco社)には支持膜としてコロジオン膜またはフォルムバル膜を附着させ、カーボン蒸着を行って補強した。親水処理を行った後、検体を一滴附着させ3%酢酸ウランで染色した。

EM(HS-7, 日立)は30,000～70,000倍で観察した。

ウイルス分離：293細胞はFlow Laboratories Productsからえた。HEp-2細胞は1976年に国立仙台病院より分与された継代株を用いた。HEK細胞は1980年に初代培養を行い、-80℃に保存していた細胞の継代3代および4代の細胞を用いた。増殖培地としては10%

fetal calf serum (FCS) 加 Eagle's MEM, 維持培地としては2% FCS 加 Eagle's MEM を用いた。

糞便材料はPBS(磷酸緩衝液)で20%浮遊液とし、8,000×g(Tomy15A)で8分間遠心した。

上清にファンギゾン10μg/ml, ゲンタマイシン100μg/mlを加えてウイルス分離糞便とした。

I グループおよびすでにAd40と同定されている糞便材料(検体番号015)は293細胞, HEp-2細胞, HEK細胞でそれぞれウイルス分離を行い、3代継代した。さらに293細胞で継代した各代の感染細胞をHEp-2細胞に接種した。

HEp-2細胞に接種し継代した材料は293細胞へ、HEK細胞に接種し継代した材料は293細胞とHEp-2細胞へそれぞれ1代継代してCPEを観察した。使用細胞はTrypsin-EDTA(0.025% Trypsin, 0.018% ethylene diamine tetracetic acid 加PBS)で分散し、増殖培地に浮遊させ24穴 semi microplate (Linbro)に1ml/well分注した。それぞれの細胞は培養3日めに単層となるように希釈し、37℃のCO₂ふ卵器で培養した。単層となった細胞の培養液をすて、糞便材料の遠心上清液を0.1ml/well, 1検体につき2wellsに接種した。60分間吸着後、Eagle's MEMで細胞を1回洗浄し、維持液を1ml/well加えた。

293細胞は35℃, HEp-2細胞とHEK細胞は37℃のCO₂ふ卵器でそれぞれ培養した。CPEが広範に認められた細胞層を毛细管で培養液とともに回収した。回収した細胞浮遊液は新しい単層細胞に0.1ml/well接種して継代した。

ウイルス分離初代の細胞浮遊液および継代中にCPEが観察された検体の一部は、ウイルスDNAの分析を行うためにその1mlを8,000×g, 5分間の遠心で細胞沈渣とし、-20℃に保存した。検体を接種後14日間培養してCPEが出現しなかった細胞は、14日めに同様に回収して継代した。いずれかの細胞で継代3代までCPEが観察された検体は3代めの感染細胞をドライアイス・アセトンで凍結融解を行い、EMによる検索およびアデノウイルス1～7・11型の抗血清による中和試験を行った。

I グループの14検体の糞便材料中10検体, II, IIIグループおよびAd40と同定されている糞便材料(no. 015)については293細胞と共生培養(co-cultivation)を行った293細胞をTrypsin-EDTA液で分散し、もとの培養液の10分の1量のEagle's MEMに浮遊させた。細胞浮遊液0.2mlに糞便材料の遠心上清を0.2～0.4ml加え、37℃に90分間おいた。Eagle's MEMを2ml加えて低速遠心を行い、その上清を除いた後に2mlの増殖培地に浮遊させた。この細胞浮遊液を24穴 semi micr-

oplateに1 ml/well ずつ分注し、37℃のCO₂ふ卵器で培養した。細胞が増殖し単層となった際に維持培地に培養液を変えて培養を続けた。CPEが広がった細胞は培養液とともに回収し、その0.2 mlを新しい293細胞浮遊液と混合して継代した。Ⅰ、Ⅱグループおよびno. 015の糞便材料は3代継代した。Ⅲグループの糞便材料はウイルス分離1代のみ行った。回収した各感染細胞浮遊液の1 mlはDNA分析を行うために8,000×g、5分間の遠心を行い細胞沈澱を-20℃に保存した。

アデノウイルス抗血清による同定：Ⅰ、Ⅱグループの検体で継代3代めにCPEの観察された検体を対象とした。抗血清はアデノウイルス1～7および11型に対する免疫家兎血清（国立予防衛生研究所より分与を受けた）を用いた。感染細胞浮遊液はドライアイス・アセトンによる凍結融解を5回行って上清を回収し、ウイルス液とした。5倍に希釈したウイルス液を分注して20単位の各抗血清と等量混和し、室温に60分間さらに4℃に18時間おいた。10⁶個/mlの293細胞浮遊液2 mlにウイルス-抗血清抗合液を0.2 ml加えた。24穴 semi microplateに1 ml/well 分注し、1～3日後にCPEを判定した。またAd31の中和試験による同定は国立予防衛生研究所・松永泰子博士の協力によった。

アデノウイルスDNAの分析；糞便材料およびウイルス感染細胞からアデノウイルスDNAを抽出する方法はUshijimaら⁷⁾によるロタウイルスRNA抽出法、Hirt⁸⁾およびFujinagaら⁹⁾の方法を参考にした。糞便材料を生理食塩水で20%浮遊液とし、3,000rpmで15分間の遠心を行いその上清をさらに9,000rpm、30分間の遠心を行って上清を回収した。35% sucrose上に糞便上清8 mlを重層し、200,000×g、60分間の超遠心でベレットした。これを0.5 mlのTE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) に浮遊させた。proteinase Kを最終濃度 0.025 mg/ml, 10% SDS (Sodium Laurylsulfate) を30 μl加えて室温に60分間放置後8,000×g、8分間の遠心を行った。遠心上清とフェノールを等量混和してフェノール抽出を行った。フェノールはあらかじめその5分の1量のクロロホルムと混和し、NTE buffer (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA; pH 7.3) を加えて飽和させた。フェノール抽出後2倍量のエタノールを加え-20℃に18時間おいてエタノール沈澱を行った。8,000×g、15分間の遠心を行い、エタノールを除いて室温で乾燥させた後10～100 μlの滅菌蒸留水で溶解した。

ウイルス感染細胞からのDNA抽出は、細胞浮遊液1 mlを8,000×g、5分間の遠心で細胞沈澱とし0.5 mlのTE bufferに浮遊させた。以後糞便材料中ウイルスからのDNA抽出、精製と同様の処理を行った。エタ

ノール沈澱後は10 μlの滅菌蒸留水に溶解させた。

制限酵素はSma IとHind IIIを用いた。糞便材料および感染細胞から抽出したDNAはまずSma Iで切断して電気泳動法を行い泳動型をみた。293細胞で継代可能であったAd40とAd41の例についてHind IIIで切断して泳動型をみた。Ad 1～7, 11の標準株（国立予防衛生研究所より分与を受けた）293細胞で増殖させ、ウイルス感染細胞からウイルスDNAを抽出しSma Iで切断した。この標準株の泳動型とWadellらの報告^{10, 11)}による泳動型を参考にして、ウイルス分離株の泳動型からその血清型の判定を行った。Sma IによるウイルスDNAの切断は以下の方法で行った。精製ウイルスDNA溶液に最終濃度40 μl/mlのRNaseA, Sma I buffer (15 mM Tris-HCl; pH 8.5, 15 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-mercaptoethanol), および8単位Sma I (Boeringer) を混和して25℃、3時間反応させた後glycerol dyeを加えた。Hind IIIによるDNAの切断は精製ウイルスDNA溶液に最終濃度40 μl/mlのRNaseA, Hind III buffer (10 mM Tris-HCl; pH 7.4, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 14 mM DL-Dithiothreitol) および10単位のHind IIIを混和して42℃で60分間反応後、glycerol dyeを加えた。

5%ポリアクリルアミド・ゲルにsticking gelとして3.6%ポリアクリルアミド・ゲルを重層した20×20 cmの平板ゲル内で電気泳動(PAGE)を行った。各検体の5 μlを30 mAで6時間泳動した後、銀染色（第一化学薬品）を行った。

患者血清とその中和抗体価の測定；今回糞便材料からウイルス分離を行った患児34例中5例から急性期、回復期、のペア血清が採取された。この5例の患者の糞便材料からは、それぞれAd1, Ad31およびAd40が分離されており、これらの分離株(Ad1; 014株, Ad31; 024株, Ad4; 015株)を用いてペア血清の中和抗体価を測定した。抗体価測定はすべてマイクロ法で行った。ウイルス分離でえた3株のアデノウイルスは293細胞で6～8代継代した後、30～50 TCFD₅₀ 25 μlで用いた。被験血清はPBSで10倍に希釈し56℃、30分間非働化を行った後、4倍階段希釈液を作製した。希釈血清は等量のウイルス液と混和し37℃、60分間さらに4℃18時間反応させた。96穴マイクロプレートに293細胞を単層培養し、血清・ウイルス混合液を50 μl/well 接種した。90分間の吸着後液をすて維持液を100 μl/well 加えた。3～5日後にCPEを判定した。CPEが出現しなかった血清の最高希釈倍数の逆数を血清の中和抗体価とした。

結 果

3種の培養細胞でのウイルス分離成績；293細胞、

Table 1 Isolation of adenoviruses from stools of patients with acute gastroenteritis (Group I and specimen 015)

identification	no. of specimen	serial passages in cell cultures of								
		293			Hep2			NEK		
		p 1	p 2	p 3	p 1	p 2	p 3	p 1	p 2	p 3
Ad40	002	+†	-	-	-	-	-	-	-	-
	004	+†	-	±	-	-	-	±	-	-
	011	±†	-	-	+	-	-	-	-	-
	015	+†	-	-	-	-	-	-	-	-
Ad40	003	+†	-	±††	-	-	-	-	+	+†††
+	008	+†	+	-	+	-	-	-	+†	+††
Ad 5	009	+†	+	+††	+	+	+†	+	+	+
Ad41	006	+†	+	+††	+	-	-	-	-	-
Ad 5	007	-†	-	+††	-	+	+†††	-	-	-
Ad 1	014	+†	+	+††	-	+	+	-	-	-
untyped	005	C			+	-	-	-	-	-
	010	±†	-	+	+	-	-	-	-	-
	013	±†	-	-	+	-	-	-	-	-
viruses other than adenovirus	001	+†	+	+††	+	-	-	-	+	+††
	012	+†	+	+††	+	-	-	-	-	-

† : Aliquots were used for checking the pattern of DNA fragments cleaved by restriction endonucleases

†† : neutralization test by antiserum of adenovirus types 1-7. and 11

+

-

± : equivocal CPE

C : contamination

HEK : human embryonic kidney cells

HEp-2 細胞および HEK 細胞を用いて、I グループおよび no. 015 糞便材料のウイルス分離と継代を行った結果を Table 1 に示した。CPE が起きた例を +, 起きなかった例を一, 判定しがたい例を ± の記号で示した。感染細胞の DNA を精製し, *Sma* I で切断して PAGE を行った例を † で示した。アデノウイルスの抗血清による中和試験を行った例を †† で示した。

293細胞での分離 1 代めの感染細胞について PAGE を行った結果, Ad40 の泳動型を示したのは no. 015 を含め 7 検体であった。この 7 検体中 3 検体では HEp-2 細胞または HEK 細胞で継代中にも CPE が観察された。それぞれの細胞で 3 代継代後, この 3 検体を PAGE および抗血清による中和試験を行った結果 Ad 5 と同定された。no. 011 では HEp-2 細胞での分離 1 代めに CPE が観察されたが継代はされなかった。

Ad 41 の泳動型を示したのは 1 検体 (no. 006) のみで

あった。他に Ad 1, Ad 5 がそれぞれ 1 検体分離された。他の 5 検体では PAGE で泳動型が形成されなかった。この 5 検体のうち継代 3 代めまで CPE が観察された 2 検体の感染細胞浮遊液からは EM によりエンテロウイルス様粒子とレオウイルスがそれぞれ検出された。

Ad 40 のみ検出された 4 検体および同定不可能であった 3 検体のそれぞれの継代細胞を他の細胞へ接種した結果, いずれの細胞でも CPE は観察されなかった。同一検体から Ad 40 と Ad 5 が検出された 3 検体の各継代細胞を他の細胞へ接種した結果, no. 009 では接種したすべての細胞に CPE が観察された。no. 003 および no. 008 では, HEK 細胞で継代した 2, 3 代および 1 ~ 3 代の感染細胞を接種したすべての細胞に CPE が観察された。Ad 41 が分離された no. 006 では HEp-2 細胞での分離 1 代めの感染細胞を接種した 293 細胞にのみ CPE が観察された。Ad 5 が分離された no. 007, Ad 1 が分

Table 2 Comparison of results of adenovirus isolation by conventional isolation method and co-cultivation using 293 cell culture (Group I and specimen 015)

Sample No.	typing by	conventional			co-cultivation			typing by
	DNA restriction	isolation						DNA restriction
	analysis of	serial passages in			serial passages in			analysis of
	adenovirus in	p 1	p 2	p 3	p 1	p 2	p 3	adenovirus in infected
	stool specimen							cells by co-cultivation
002	—	+	—	—	+	±	—	40
004	—	+	—	±	+	+	—	40
011	40	±	—	—	+	+	+	40
015	40	+	—	—	+	+	+	40
008	40	+	+	—	+	+	+	40
003	40	+	—	± †	+	+	—	40
007	40	—	—	+ †	+	+	+	40
009	—	+	+	+ †	+	+	+ †	40 + 5
006	—	+	+	+	+	+	+	41
005	40	C.	n.d.	n.d.	—	—	—	—
010	—	—	—	—	—	—	—	—

† : determined as adenovirus type 5 by the pattern of DNA fragments cleaved by restriction endonucleases and neutralization test

+ : CPE+, — : CPE-, not detected the pattern of DNA fragments, ± : equivocal CPE

n.d.: not done, C.: contamination

離された no. 014 では 293 細胞および HEp-2 細胞での継代中に CPE が出現した例を再接種した Hp-2 および 293 細胞にのみ CPE が観察された。

ウイルス分離、継代法の比較（単層細胞に検体を接種する通常の方法と co-cultivation による方法の比較）；単層培養細胞に検体を接種する通常のウイルス分離、継代方法と co-cultivation による方法とを比較した。I グループのうちの 10 検体および no. 015 の糞便材料を 293 細胞を用いてそれぞれの方法で 3 代継代した成績を Table 2 に示した。各継代に観察された CPE を +, — で示した。これら 11 検体の糞便材料を直接精製してえたウイルス DNA と、co-cultivation を行った細胞からえたウイルス DNA とを *Sma* I で切断して PAGE を行った成績も合わせて示した。

通常の方法でウイルス分離を行うより co-cultivation による方がより多くの例で CPE が観察された。しかし co-cultivation によって Ad 40 が検出された。7 検体中 3 検体 (42.9%) では継代 3 代めの細胞で CPE が出現せず、その感染細胞からのウイルス DNA の泳動型も形成されなかった。3 代まで CPE が観察された検体においても継代にしたがって、CPE が細胞面全体に出現するまでに要する日数が多くかかる例がみられた。Ad41 が分離された no. 006 では co-cultivation による継代にしたがって CPE が短期間で細胞面全体に観察さ

Fig. 1 Restriction profiles of adenovirus strain (009) DNAs digested by *Sma* I. Ad 40 and Ad 5 were found in the same specimen by serial passages in 293 cell cultures

Table 3 Results of primary isolation of adenoviruses by co-cultivation in 293 cell cultures

date of collected Virus in stool	Group I (1984.11-1985.3)	II (1985.11-12)	III (1982.10-1985.12)	total
Ad40	7	2	7	16
Ad41	1	4	0	5
Ad31	0	3	0	3
negative	2	0	3	5
total	10	9	10	29

Table 4 Identification of enteric adenoviruses from stool specimens and primary infected 293 cell cultures by DNA restriction analysis

n=23				
material	DNA restriction analysis	Ad40	Ad41	total
stool	+	9	4	13
293 cell	+			
stool	-	8	1	9
293 cell	+			
stool	+	1	0	1
293 cell	-			
total		18	5	23

れるようになった。また泳動による DNA fragment も継代にしたがって濃く、鮮明に形成されるようになった。

糞便材料から直接えられたウイルス DNA と co-cultivation による細胞からえられたウイルス DNA とは同一の泳動型を示した。

no. 009検体を co-cultivation により 1～3 代継代した感染細胞からえたウイルス DNA を *Sma* I で切断して泳動した像を Fig. 1 に示した。分離 1 代めでは Ad 40 の fragment が鮮明であるが、継代にしたがって Ad 5 の fragment がより鮮明になった。co-cultivation を行った I グループの10検体のうち、継代3代までの感染細胞から腸管アデノウイルス以外のアデノウイルスの DNA fragment が検出されたのは no. 009のみであった。

Co-cultivation による I～Ⅲ グループの糞便材料のウイルス分離成績；I～Ⅲ グループの糞便材料を co-cultivation でウイルス分離を行った。分離 1 代めの感染細胞のウイルス DNA を制限酵素で切断して PAGE を行い泳動型をみた。分離されたアデノウイルスをグループ別に Table 3 に示した。

Ⅱ グループでは 9 検体中 2 検体が Ad40、4 検体が Ad41であった。他の 3 検体から分離されたアデノウイルスはいずれも Ad31であった。この 3 検体の糞便材料はいずれも川崎病で入院中、同時期に急性胃腸炎を発病した患者よりえた。これらⅡグループの 9 検体から分離したアデノウイルスは 1 例 (Ad40) を除き 293細胞で 3 代まで継代可能であった。また 1 代めで検出されたアデノウイルスと異なる型のアデノウイルス、あるいは他のウイルスは継代中に検出されなかった。

Ⅲ グループ10検体の分離 1 代めの感染細胞からは PAGE により 7 検体から Ad40が検出された。他の 3 検体からはウイルス DNA fragment は検出されなかった。

EM でアデノウイルス陽性であった29検体の糞便材料を co-cultivation でウイルス分離を行った結果24検体 (82.8%) からアデノウイルスの分離が可能であった。24検体中21検体 (87.5%) が腸管アデノウイルスであった。他の 3 検体は Ad31であった。

ウイルス分離による感染細胞からと糞便材料からの腸管ウイルス DNA の検出成績の比較；I グループで co-cultivation によるウイルス分離を行った10検体中 5 検体からは直接糞便材料からウイルス DNA が検出された。Ⅱ グループでは 9 糞便材料から Ad31が 2 検

Fig. 2 DNA restriction fragments of 5 Ad 40 strains and Ad 2 prototype after digestion with two different restriction enzymes (*Sma* I and *Hind* III)

Fig. 3 DNA restriction fragments of 5 Ad 41 strains and Ad 2 prototype after digestion with two different restriction enzymes (*Sma* I and *Hind* III)

Table 5 Reciprocal neutralizing antibody titer in paired sera from patients with acute gastroenteritis

Specimen No.	Virus in stool	Ad40	Ad 1	Ad31
		ac. - conv.	ac. - conv.	ac. - conv.
007	Ad40	<10 - 10	<10 - <10	<10 - <10
014	Ad 1	<10 - 160	<10 160	<10 - <10
025	Ad31	<10 - <10	<10 - <10	<10 - 40
022	Ad31	<10 - <10	<10 - <10	<10 - 10
024	Ad31	<10 - <10	<10 - <10	<10 - 10

ac. : acute

conv.: convalescent

体, Ad41が4検体検出された。Ⅲグループの糞便材料からは10検体中4検体からAd40が検出された。

糞便材料からと感染細胞からの腸管アデノウイルスの検出成績を比較してTable 4に示した。いずれかの材料から検出された腸管アデノウイルスはAd40が18検体, Ad41が5検体であった。このうち感染細胞からウイルスDNAが検出されたにもかかわらず、糞便材料から検出されなかったものはAd40が8検体(44.4%), Ad41が1検体(20.0%)であった。また糞便材料からウイルスDNAが検出され、感染細胞から検出されなかったのはAd40の1検体のみであった。

293細胞で分離された13検体のAd40を*Sma* Iで切断

した泳動型は同一の像を示した。13検体中継代が可能であった5検体を*Hind* IIIで切断した泳動型も5検体で同一であった。Ad40を*Sma* Iおよび*Hind* IIIで切断してPAGEを行った泳動像をFig. 2に示した。Ad41が分離された5検体のウイルスDNAを*Sma* Iおよび*Hind* IIIで切断した泳動像をFig. 3に示した。各制限酵素で切断されたfragmentよりa, b, およびcの3種の泳動型に分類された。

患者ペア血清の中和抗体価; 糞便材料からアデノウイルスが分離された患者5名のペア血清の中和抗体価をTable 5に示した。おのおのウイルス分離でえられたアデノウイルスと同じ血清型のアデノウイルスに対して

抗体上昇があった。no. 014の糞便材料からはAd 1が分離されたが、Ad 1とAd 40の両方の型に対して血清中和抗体価の上昇がみられた。

考 察

腸管アデノウイルスは通常の培養細胞中では増殖しない。HEK細胞をAd 5で形質転換を行った293細胞では増殖可能である。腸管アデノウイルスは正常なHEK細胞ではウイルスDNA合成の初期の転写が阻害されるために、増殖できないと考えられている¹²⁾。一方小児の腸管アデノウイルス感染による急性下痢症では急性期下痢便中に多量のウイルスの排出がみられ、腸管腔内のウイルスの増殖がさかんに行われていることを示している。HEK細胞などで増殖可能な従来のアデノウイルス(1-39型)の中の1つのウイルスと腸管アデノウイルスとの同時感染が腸管内でおこっている、あるいは気道アデノウイルスが長期間にわたって腸管内にウイルスの排出を続けている、などの理由によって腸管アデノウイルスは腸管内での増殖が可能なのであろうと推測されている¹²⁾。

Iグループの糞便材料を通常のウイルス分離の方法で行った成績でも、15検体中5検体からAd 1、あるいはAd 5がそれぞれ単独で、またはAd 40とともに分離されている。Brounら¹³⁾の分離成績でも腸管アデノウイルス以外のアデノウイルスが多数分離されている。これらのことは腸管アデノウイルスとそれ以外のアデノウイルスとの腸管内の共存を示唆するものであろう。

腸管アデノウイルス検出のためには単層細胞に分離材料を接種する通常の方法より、co-cultivationによる方法の方が優れていた。I、IIグループの糞便材料19検体をco-cultivationで継代培養した成績では、腸管アデノウイルスとそれ以外のアデノウイルスとが同一検体から分離された例は1検体のみであった。通常の方法で同一検体からAd 40とAd 5が分離された3検体中の2検体からは、co-cultivationによってAd 40のみが分離された。このことはAd 40の増殖、分離のためには、293細胞とのco-cultivationが優れていることを示している。

通常のウイルス分離法を293細胞を用いて行った場合、Ad 40は継代を重ねるとCPEの出現がみられなくなった。またco-cultivationによるウイルス分離でも3代めにCPEの出現がみられない検体もあった(Table 2)。Iグループの糞便材料でAd 40が陽性であった検体の一部を通常のウイルス分離法によって293細胞で再継代した。2、3代めでのCPEの陽性率は低下してきた。Ad 40では分離1代めの感染細胞中のウイルスDNA量が多いのに継代にしたがってウイルスの増殖が悪くな

ってきた。

ウイルス分離1代めの感染細胞から腸管アデノウイルスを精製した方が、糞便材料から直接ウイルスを精製するよりも、ウイルスDNAの検出率は高かった。

Ad 40は293細胞で増殖する際他の1-39型のアデノウイルスと比較して感染性のある完全粒子の形成量が少ないという報告がある¹⁴⁾。Ad 41では293細胞での継代により、増殖能の低下がみられなかった。

急性胃腸炎患児の5例からペア血清が採取された。それぞれ糞便材料、感染細胞から検出されたアデノウイルスに対する抗体の有意上昇がみられた(Table 5)。Ad 1が293細胞により糞便材料から分離された1例(no. 014)では、直接糞便材料を精製する方法ではアデノウイルスDNAのfragmentは検出されなかった。しかしえられたペア血清の中和反応ではAd 1、およびAd 40に対する中和抗体の陽転がみられた。ヒト血清中にはAd 40とAd 41に共通する抗体が感染によって産生される¹⁵⁾ので、Ad 40に対する中和抗体が上昇しても、Ad 41の感染を否定することはできない。したがってこの症例ではAd 1とともにAd 40、あるいはAd 41の混合感染がおこって下痢症状を示したものと考えられる。

IIグループの患児の糞便材料の3検体よりAd 31が同定された。これらの3例の患児は川崎症候群のため同時期に同一の病室に在院していた。急性胃腸炎の院内流行があり、同一泳動型のロタウイルスによる院内感染があった。しかしこの3例の糞便材料からはAd 31が検出された。ウイルスDNAの泳動型は全く同じであった。またこの3例のペア血清ではAd 31に対する中和抗体のみが上昇した。

I～IIIグループの糞便材料29検体からco-cultivationによるウイルス分離によって21検体に腸管アデノウイルスが検出された。Ad 40が16検体(76.2%)、Ad 41が5検体(23.8%)であった。札幌、広島から送付された2検体(それぞれAd 41、およびAd 40)を除く27検体は東京北部、それに隣接する埼玉南部の急性胃腸炎の患児から採取された糞便材料である。1984年冬期のこの地域の糞便材料(Iグループ)と、1982-1985年採取された糞便材料(IIIグループ)からはAd 40のみが検出された。

1985年11-12月の短期間に採取された東京北部の糞便材料(IIグループ)では腸管アデノウイルス分離例6検体中4検体(66.7%)がAd 41であった。対象とした期間中にこれらの地域ではAd 41が優位に流行していたことになる。

さらに検体をふやして腸管アデノウイルスの小児の急性胃腸炎に占める重要性を明らかにし、腸管アデノウイ

ルス感染症の分子疫学をを解明していく必要がある。

稿を終るにあたり御校閲をいただいた帝京大学医学部小児科学教室 藤井良知主任教授、篠崎立彦助教授に感謝いたします。Ad40の糞便の供与をあたいただいた札幌医科大学小児科学教室 千葉峻三博士、多数の糞便の供与をいただいた埼玉県衛生研究所 岡田正次郎博士、検体採取に御協力をいただいた諸先生、諸医療機関に感謝いたします。アデノウイルス、抗ウイルス血清の供与をいただき、またAd31の中和試験に御協力をいただいた国立予防衛生研究所の松永泰子博士に感謝いたします。アデノウイルスの核酸の分析について、協力をいただいた帝京大学医学部小児科学教室 牛島廣治博士、寄生虫学教室の江下優樹博士に感謝いたします。

本研究の一部については文部省科研費A課題番号5944 0048、および森永奉仕会の研究費によった。

文 献

- 1) Uhnöo, I., Wadell, G., Svensson, L., and Johansson, M. (1983). Two new serotypes of enteric adenovirus causing infantile diarrhoea. *Develop. Biol. Standard.* 53, 311-318.
- 2) Sato, K., Inaba, Y., Shinozaki, T., Fujii, R., and Matumoto, M. (1981). Isolation of human rotavirus in cell culture. *Arch. Virol.*, 69, 155-160.
- 3) Kidd, A. H., and Madeley, C. R. (1981). In vitro growth of some fastidious adenovirus from stool specimens. *J. Clin. Pathol.*, 34, 213-216.
- 4) Takiff, H. E., Straus, S. E., and Garon, C. F. (1981). Propagation and in vitro studies of previously noncultivable enteral adenoviruses in 293 cells. *Lancet* ii, 832-834.
- 5) de Jong, J. C., Wingand, R., Kidd, A. H., Wadell, G., Kapsenberg, J. G., Muzerie, C. J., and Wermenbol, A. G. (1983). Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool. *J. Med. Virol.*, 11, 215-231.
- 6) Chiba, S., Nakata, S., Nakamura, I., Taniguchi, K., Urasawa, S., Fujinaga, K., and Nakao, T. (1983). Outbreak of infantile gastroenteritis due to type 40 adenovirus. *Lancet*, ii, 954-957.
- 7) Ushijima, H., Kim, B., Araki, K., Yoshino, K., Shinozaki, T., and Fujii, R. (1984). Epidemiology of rotavirus infection in Tokyo during two winter seasons, as revealed by analyses of recovered viral RNA. *Eur. J. Pediatr.*, 142, 71-72.
- 8) Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.*, 26, 365-369.
- 9) Fujinaga, K., Rankin, A., Yamazaki, H., Sekikawa, K., Bragdon, J., and Green, M. (1973). RD-114 virus: Analysis of viral gene-sequence in feline and human cells by DNA-DNA reassociation kinetics and RNA-DNA hybridization. *Virol.*, 56, 484-495.
- 10) Wadell, G., Hammarskjöld, M.-L., Winberg, G., Varsanyi, T. M., and Sundell, G. (1980). Genetic variability of adenoviruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 354, 16-42.
- 11) Wadell, G. (1984). Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 110, 191-220.
- 12) Takiff, H. E., and Straus, S. E. (1982). Early replicative block prevents the efficient growth of fastidious diarrhea-associated adenovirus in cell culture. *J. Med. Virol.*, 9, 93-100.
- 13) Brown, M., Petric, M., and Middleton, P. J. (1984). Diagnosis of fastidious enteric adenoviruses 40 and 41 in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 20, 334-338.
- 14) Brown, M. (1985). Selection of nonfastidious adenovirus species in 293 cells inoculated with stool specimens containing adenovirus 40. *J. Clin. Microbiol.*, 22, 205-209.
- 15) Kidd, A. H., Banatvala, J. E., and de Jong, J. C. (1983). Antibodies to fastidious faecal adenoviruses (species 40 and 41) in sera from children. *J. Med. Virol.*, 11, 333-341.

Isolation of enteric adenoviruses by cell cultures

Thirty-four stool specimens, collected from patients with acute gastroenteritis and shown to contain adenovirus by electron microscopy, were divided into three groups by different dates and sources collected. Fourteen stool specimens (Group 1) were inoculated onto 293, HEp-2, and human embryonic kidney cell cultures. Of 14 specimens examined, nine induced cytopathic effect (CPE) on primary inoculation in 293 cells. On serial passage of the progeny virus from three cell cultures, it was found that six of these isolates in three cell cultures acquired the ability to grow in cell at passages 2 and 3 materials.

By use of DNA restriction enzyme analysis, and neutralization test, seven of 12 (58%) adenoviruses were identified as enteric adenoviruses 40 and 41 (Ad 40 and Ad 41). On further serial passage of the progeny virus from each passage of cell cultures to other cells, cytopathic effect became unclear or

diminished after further subcultures.

Of the specimens of group 1 to 3, co-cultivation of isolates and 293 cells were compared to conventional isolation assay. The former was more sensitive than the latter for isolation and subculture of enteric adenoviruses.

The detection of enteric adenoviruses by use of DNA restriction enzyme analysis from primary infected 293 cells was more effective than that of direct isolation from stool specimens. Five specimens of three groups determined as Ad 41 showed three different migration patterns of DNA restriction analysis by using Sma I and Hind III in each assay.

Seroconversion to homogenous virus antigen were demonstrated in all five paired serum samples from patients shedding adenoviruses. One of the patients showed a dual infection with Ad 1 and Ad 40 by serodiagnosis.