4. 新型ピコルナウイルス「アイチウイルス」の性状と疫学

山下 照夫

(愛知県衛生研究所微生物部)

はじめに

ウイルス性胃腸炎は集団発生および散発例としてよく知られている。胃腸炎を起こすウイルスとしては、ロタウイルス、アデノウイルス、ノーウォーク様ウイルス、およびアストロウイルスが知られている^{1,4,6-9)}。アイチウイルスは1989年に愛知県で集団発生した胃腸炎患者の糞便から初めて分離された。既知の抗血清とは反応しないためウイルス学的分類ができなかったが、その全遺伝子を調べた結果、ピコルナウイルス科に属することが明らかとなった³⁴⁾。しかし、同科の既知のウイルス属とは異なることから、新しいウイルス(コブウイルス属アイチウイルス)として承認された¹⁶⁾。本ウイルスは日本のみならず、アジア各地に存在している。直接的な証明はされていないが、疫学調査から胃腸炎の病原因子であることが示唆されている^{32,33)}。本稿ではアイチウイルスの性状について述べるとともに、今までの疫学調査の結果を報告する。

最初の事例³¹⁾

1989年3月に愛知県一宮市で胃腸炎の集団発生が起きた。会社の送別会に参加した29名中21人が12~63時間後に下痢、腹痛、嘔吐、発熱などの症状を訴えたもので、酢ガキが原因食品と推定された。細菌検査が陰性であったため、当研究所に5名の患者の糞便とベア血清が搬入された。糞便乳剤を用いてウイルス分離を

試みたところ、5名中2名からBS-C-1細胞に細胞変性効果を起こすウイルスが分離された。患者のベア血清との反応を調べたところ、5名中4名の血清で有意な抗体価の上昇を示し、その抗体価はどちらの分離株に対しても同じ値を示した。以上のことから、分離された2株は同一性状のウイルスで、この胃腸炎の原因ウイルスであると考えられた。

分離ウイルスはエンテロ、ノーウォーク様、およびアストロウイルスの抗血清と反応しなかった。また、分離ウイルスの抗血清もそれら各ウイルスと反応しなかったことから、新しいウイルスと考えアイチウイルスと呼んだ。

理化学的性状³¹⁾

アイチウイルスの粒子の直径は約30nmで、ノーウォーク様ウイルスやアストロウイルスほどではないものの若干の表面構造が認められ、エンテロウイルスの様な滑らかな表面とは異なるものであった(図1)。DNA合成阻害剤(IUDR)存在下でも増殖は抑制されず、クロロホルム処理、熱(50℃, 30分)、酸(pH 3.5)に安定であった。56℃, 30分の熱処理でウイルス感染価は低下するが、1 M MgCl₂を加えることにより安定となる。培養上清を室温に1週間放置してもウイルス力価に変化はなかった。本ウイルスは、BS-C-1, Vero, およびBGM細胞といったサル腎臓由来の細胞では増殖するが、HeLaおよびRD細胞では増殖しないという、エンテロウイルスとは若干異なる特徴を持っていた。

遺伝子解析³⁴⁾

ウイルス分類上の位置をはっきりさせるために、遺伝子解析を行った。アイチウイルス遺伝子は8,251塩基の一本鎖RNAから成り、7,302塩基の翻訳領域(ORF)の5'側に712塩基、3'側に240塩基の非翻訳

Biological and epidemiological characteristics of Aichi virus, as a new member of *Picornaviridae*

Teruo Yamashita

Department of Microbiology, Aichi Prefectural Institute of Public Health

7-6, Nagare, Tsujimachi, Kita-ku, Nagoya, Aichi 462-8576, Japan

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流7-6

図1 アイチウイルスとポリオウイルス1型の電子顕微鏡像の比較
(—: 50nm)

領域が存在していた。この構造はピコルナウイルス科のウイルスの特徴と同じであり、その比較から ORF の上流より構造タンパク (VP0-VP1)、非構造タンパク (2A-3D) の各要素に分けることができた (図2)。

構造タンパク

ピコルナウイルスの構造タンパクは VP1 から VP4 の4つに分けられ、その分子量も一定の範囲の値をとることが知られている²³⁾。アイチウイルスの構造タンパクはポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により3つのポリペプチド (42, 30, および22kDa) に分かれる。この値がピコルナウイルスの範疇からややはずれていたこともあり各ポリペプチドのアミノ酸解析も実施した。その結果、30kDa のポリペプチドが VP1、22kDa のポリペプチドが VP3 であることが判明した。一方、42kDa のポリペプチドは N 末端が何かにブロックされていて解読不能であった。他に VP2 や VP4 に相当するバンドは認められないので、42kDa のポリペプチドは VP4 と VP2 が結合したままの状態の VP0 (ピコルナウイルスの VP4 は N 末端がミリスチン酸でブロックされている) であると考えられた。VP0 は完全粒子には殆ど存在しない

とされているが、本ウイルスは、不完全粒子も完全粒子も同じ泳動パターンを示すことから、その殆どが VP0 のまま存在するという特徴を持つと考えられる。この構造はヒトパレコウイルス1型 (エコーウイルス22型) でも認められている¹⁴⁾。患者血清や免疫血清はこの42kDa のポリペプチドと良く反応することから、このポリペプチドはウイルス粒子の表面に存在していると考えている (図3)。さらに、VP0 の分子量 (42kDa) とミリスチン酸でブロックされる N 末端構造 (GxxxT) の位置から、VP0 の上流に170個のアミノ酸からなる L-プロテインが存在していると考えられた (図2)。この L-プロテインは、エンテロウイルスやライノウイルスには存在せず、アフソウイルスやカルディオウイルスに存在することが知られている。アイチウイルスの L-プロテインが、上記ウイルスの L-プロテインのようなプロテアーゼ活性^{11,21)} や亜鉛を結合する構造⁵⁾ を持つか否かについては、そのアミノ酸配列からは解らなかった。

非構造タンパク

各領域の切断部位をピコルナウイルスのそれと比較して決めたが、P1 と P2 領域の切断部位の相同性はどのウイルスと比較しても低かった。そのため、アイ

MAATRVSRSV	LAAVAHSAAH	RTYHTVLDGY	DRLYLNTNPH	LSYPLPKNSS	FPCPFCQYDE	60
QNEVLSPESL	CGEGAEPCKW	CSQDKPRRKY	NTTPPEDWLY	DSDVQSWFYP	ETYYSDLQKK	120
FFDKLALLSL	PGAYQAKTPE	ERALAGALTQ	LLNFPSTPPL	TLPTTNLQRQ	GNSVTNIYGN	180
GNNVNTDVG	NGWAPTSTVG	LGDGPVSCTP	PTSPSGDTEV	PPPRKPTTFP	APPTKSGSRF	240
SKWWEPAAR	ASESATDSAI	EGIDAAGKAA	SKAITRKLDR	PAAPSSTAMP	QPSLIALNPS	300
ATQSGNASIL	TGSTAPSLLA	YPTATPVPLP	NPDEPSQGP	SGDRTWLLDT	VTWSQEFTRG	360
WNIAGSNGMQ	WTGLESIFP	VSTDTNWTST	SSPTAYPLPF	SFVRAYPDSS	WAAMYNTHSM	420
WNCGWVRQVT	VNGSQFHAGA	LILYMVPEAT	THAIQTARDN	AGFVFYPVIL	NLYESNTATI	480
EVPIYSPTPN	TSSGLHAPWT	FYLQVLSPLN	PPPSLPTSLS	CSIYVTPVDS	SFHGLRYLAP	540
QHKKTRAVPG	AGTFGSAVAG	QELPLCGVRA	YPPNAYIPA	QVRDWLEFAH	RPGLMATVPW	600
TMADEPAERL	GIFPVSPSAI	AGTGAPISYV	ISLFSQWRGE	LAAHLFTGS	AQHYGRLVVC	660
YTPAAPQPPS	TMQEAMRGTY	TVWDVNAAST	LEFTIPFISN	SYWKTVDVNN	PDALLSTTGY	720
VSIWVQNPLV	GPHTAPASAL	VQAFISAGES	FNVRMLQNPA	LTSQTLTEDL	DAPQDTGNIE	780
NGAADNSPQP	RTTFDYTGHP	LPPDTKLENF	FSFYRLPMG	GSGAPSLSFP	ADEGTIIPLD	840
PINWLKGAHV	SGIAAMLSCF	TYIAADLRIT	LRFSNPNDNP	ATMLVAFAPP	GATIPLKPTR	900
QMLSNFYMAE	VPVSAATSTM	VSFSIPYTSP	LSAIPTSYFG	WEDWSGTNFG	QLSSSGSWGNL	960
MLIPSLSVDS	AIPDFQLSC	WVAFGNFKAW	VPRPPPLPP	LPTPAANAER	TVAVIKQGAA	1020
SATPDVDPDD	RVYIVRAQRP	TYVHWAIRKY	APDGSARKIS	LSRSGIQALV	ALEPPEGEY	1080
LEILPSHWTL	AELQLGNKWE	YSATNNCTHF	VSSITGESLP	NTGFSLALGI	GALTAIAASA	1140
AVAVKALPGI	RRQGLLTLSA	DTETNQTLNK	ITGSVNQAAQ	VVSQFDLSGP	ANSVSLAASD	1200
IREAAHKVAS	SLNGFTDVIA	DIKDSLFTRV	SDAVESGVAT	FLTWLKVLFG	YLLVLFSGPT	1260
PMSISGLLVI	ICADLAPHAR	EFFTASGNVL	SSLYYWIASK	LGLSVTPQEC	ERATLEPQGL	1320
KDFNDGALAM	RNVWIGETA	WKAHRLLDW	IPGKAKTDPO	AKLADVHDEI	MLHYSDSILA	1380
LGSEKLPIDH	ITKSISRCRE	LVSIAQEAAS	GPHSSFLNQA	VKNYTLAISQ	HRKCTGPRP	1440
EPVVVYLY	GPPTGKSL	LLAS	LLAQTLSQRL	AGTPDDVYSP	SSASCEYFDG	1500
DIGQDPEGRD	WANFPNLVSS	APFIVPMASL	EKKGTHYTSK	VIVVTSNFHE	PNERAARSMG	1560
ALRRRVHLRI	NVTSGVPPFD	PTNALNPIPG	TQSKYFTAQT	PLTLFQSNTV	RLDRDSIWTP	1620
TFTNMDLVLD	AIVTRLDRST	GVSNSLASLI	RRQGNRVIDA	EPREIPLEYA	DDLLEAMAHH	1680
RPVPCSLGLS	QAIANNTPIQ	QISETFWKYR	KPIFTCTTFL	AVLGFLCSVI	PLARSLWKSK	1740
QDTPQEPQAA	SAISHQKPK	PKSQKVPVTR	HIQRQGISPA	VPGISNNVVH	VESGNGLNKN	1800
VMSGFYIFSR	FLLVPTLRE	PHHTTLTVGA	DTYDWATLQT	QEFGEITIVH	TPTSRQYKGM	1860
RRFIGAHPPH	TGLLVSQFKA	APLYVRISDN	RILDLDFFGV	VVCKQAYGYR	AATFEKICFSS	1920
PLVTDDPSGV	KILGLVAGV	AGTSGFSAPI	HPILGQITQF	ATTQQLSLIVP	TAEVPRGVNV	1980
NRMSRLHPSP	AYGAFPVKKQ	PAPLKRNDKR	LQEGVDLDTQ	LFLKHGKGDV	TGPWPGLCAA	2040
ADLYFSTFPT	SLPVLTQEQA	IHGTPNMEGL	DMGQAAGYPW	NTLGRSRRSL	FDEVEPGVFW	2100
PKPELQAEIN	QTLEDPPDYV	STFLKDELRP	TAKVEQGLTR	IVEAAPIHAI	VAGRMLLGGL	2160
IDYMQGRPGE	HGSAVGCNPD	VHWTSEFFYAF	SEFSQVYDLD	YKCFDATLPS	AVFTLVADHL	2220
TRITGDPRVG	RYIHSIRHSH	HIYGNRMVDM	IGGNPSGCVA	TSILNTIINN	ICVLSALIQH	2280
PDFSPSRFHI	LAVGGLVIYA	TEPPIHPSFL	REFYQKHTPL	VVTPANKGQD	FPPTSTIYEV	2340
TEPPIHPSFL	WVFPD	DVRPIYIHPV	MDPDYEQSV	MWLRDGDFFD	VVTSLSCHLAF	2400
CMKVREQCLK	SGFAPNFLPY	SYLQLRWLNL	LAA			2433

図2 アイチウイルスのアミノ酸配列と酵素による切断部位

■：酵素活性の中心あるいはよく保存された配列 □：ミリスチン酸の修飾する配列
 —：アミノ酸解析によりもとめた配列

図3 アイチウイルスのポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) とウエスタンブロット法によるモルモット免疫血清との反応性 (WB)

チウイルスの P1-P2 切断部位は、VP1 の分子量 (30 kDa) から推定される N 末端部付近に存在し、ライノウイルス 2 型の推定切断部位²⁷⁾ と同じアミノ酸配列 (V/Y) とした。ピコルナウイルスの 2A 領域はタンパク質分解能を持つが^{5,10,24,38)}、アイチウイルスの場合、エンテロおよびライノウイルスのトリプシン様プロテアーゼ活性中心 (GXCG) や、アフソおよびカルディオウイルスにみられる C 末端の自己切断機能を持つ配列 (NPEG) は認められない。2C, 3B, 3C, 3D の各領域には各々ピコルナウイルスに特徴的な配列や活性部位が存在している²⁸⁾。アイチウイルスにおいても同様な配列が存在した (図2)。

非翻訳領域

アイチウイルスの 5' 末端の非翻訳領域は 712 塩基から成るが、IRES 構造は解っていない。オリゴピリミジン (Y_n) と AUG トリプレットを含む Y_n-X_m-AUG ユニットからスパーサー配列なしで翻訳が開始されることから、アフソ、カルディオ、およびヘパトウイルスと同じ 2 型の IRES 構造が推測された^{15,20)}。3' 非翻訳領域は 240 塩基から成り、既知のピコルナウイルスの中で最も長いカルディオウイルス (126 塩基: EMCV) よりもかなり長い。3' 非翻訳領域の 2 次構造は 3 つの種類に分けられる^{2,22)} が、アイチウイルス

がいずれに属するか解っていない。

各種ピコルナウイルスとの比較

ピコルナウイルス科は、エンテロ (ポリオ、コクサッキー、エコーウイルス等)、ライノ、アフソ (口蹄疫ウイルス)、カルディオ (脳筋炎ウイルス等)、ヘパト (A 型肝炎ウイルス)、パレコーウイルス (旧エコー 22, 23 型) の 6 属に分かれていたが¹⁷⁾、アイチウイルスの ORF の各領域のアミノ酸配列の相同性をこれらのウイルスと比較したところ 15~36% という低い値であった。また、分子系統樹 (UPGMA 法) を作成しても、アイチウイルスはいずれのグループとも離れて存在した。以上のことから、アイチウイルスは、既知のウイルスグループには属さない新しい型のピコルナウイルスと考えられ、コブウイルス属という新しい属名が与えられた。「コブ」は日本語の「瘤」に由来し、他のピコルナウイルスと違って表面が滑らかでない事から名付けられたものである。ピコルナウイルス科は他にエルボウイルス属 (ウマライノウイルス 2 型) とテスコウイルス属 (ブタエンテロウイルス 1 型等) が新たに加わり 9 属に分けられた¹⁶⁾。これらウイルスの分子系統樹 (UPGMA 法) による比較を図 4 に示した。

ウイルス診断の方法^{32,36)}

アイチウイルスの感染を知る手段としては、先に述べたサル腎臓由来細胞を用いたウイルスの分離と、ベア血清を用いた中和抗体価の測定の他に、ELISA による抗原検出がある。この方法はアイチウイルスに対するモノクローナル抗体とモルモット免疫血清を用いるサンドイッチ法で、3~4 日で結果の判定が可能である。アイチウイルスが関与した胃腸炎の集団発生でベア血清の得られた 5 事例について比較してみると、ウイルス分離による陽性率が 13% (6/47)、ベア血清によるものが 47% (20/43) であったのに対し ELISA では 28% (13/47) と、ベア血清による陽性率には劣るが、ウイルス分離の約 2 倍の陽性率を示した。最近、アイチウイルスの塩基配列に基づき、RT-PCR 法を検討した。3C 領域下流から 3D 領域上流にいたる 266 塩基を増幅するもので、前述の集団発生 5 事例の陽性率は 63% (25/40) に向上した。

疫 学

上記の方法を併用して、胃腸炎の集団発生例及び、小児の散発患者例、東南アジアへ旅行し帰国時に胃腸

図 4 各種ピコルナウイルス 3 D 領域の分子系統樹による比較

表 1 RT-PCR 法によりアイチウイルス遺伝子が検出された非細菌性胃腸炎の集団発生事例

年	事例数	陽性数	%
1987	1	1	100.0
1988	2	2	100.0
1989	6	2	33.3
1990	4	2	50.0
1991	1	1	100.0
1992	3	0	0.0
1993	1	0	0.0
1994	5	1	20.0
1995	1	0	0.0
1996	1	0	0.0
1997	6	2	33.3
1998	6	1	16.7
1987-98	37	12	32.4

炎症状を訴えた人について、アイチウイルス感染の有無を調べた。胃腸炎の集団発生例については1987年から98年の12年間の37事例を RT-PCR 法で調べたところ、12事例（32.4％）でアイチウイルスの関与が認められた（表 1）。12事例の患者99名中54名（54.5％）が陽性であった。アイチウイルスの関与が認められた12事例中11事例は、生カキが原因食品と推定されたものであった。事例ごとの患者陽性率は81.8％（9 / 11）から14.3％（2 / 14）と様々であった³⁴⁾。ウイルス性食中毒の原因としてはノーウォーク様ウイルスが第一にあげられている^{12, 13, 19, 26, 29)}。私どもの検査でも1997～98年の集団発生12事例のうち、アイチウイルスが陽性であったのは3事例だが、ノーウォーク様ウイルス遺伝子は12事例全てから検出されている（小林他：投稿準備中）。従って、これらの事例の原因がアイチウイルスであったとは言い難いが、1事例は、アイチウイルスの陽性率が63.5％（5 / 8）に対し、ノーウォーク様ウイルス陽性率は25％（2 / 8）であり、別の1

図5 年齢階層別アイチウイルス抗体保有率 (n=20-125/年齢階層)

事例はどちらも50% (2/4) であった。

小児の胃腸炎の散発例については、1987～90年に感染症サーベイランス事業で集められた糞便83件について、ELISAを用いてウイルス抗原の有無を調べたところ全て陰性であった。小児におけるその他の疾患患者についてもその糞便を調べたが、314名中1名(下気道炎)のみ陽性であった³²⁾。これらのことから、現時点ではアイチウイルスと小児疾患との関連については不明である。

一方、1990～92年の3年間にパキスタンのカラチ市民病院小児科で集められた糞便を調べた結果、胃腸炎患者421件中8件(1.9%)がELISAによるウイルス抗原が陽性であった。このうち5件はウイルスも分離されている。また、当研究所では名古屋空港検疫所と共同で、東南アジアからの帰国時に胃腸炎症状を訴えた患者糞便についてウイルス検査を実施しているが、1991～92年に集められた722件をELISAで調べたところ、6件(0.8%)からウイルス抗原が検出された。このうち5件はウイルス分離も陽性であった。陽性者の渡航先はインドネシア(4名)、タイ、およびマレーシア(各1名)であった。これらのことは、

アイチウイルスが日本のみならずアジア各地に存在することを強く示唆している³³⁾。

アイチウイルスはこれまでに17株分離されている。内訳は、集団発生から7株(4事例)、パキスタン小児から5株、海外渡航者から5株である。これらは、アイチウイルス標準株(A846/88)に対するモノクローナル抗体との反応性、P1領域およびP2領域に設定した2組のプライマーに対する反応性、および3C領域下流から3D領域上流に設定したプライマー(これには全株が反応する)で増幅したPCR産物の塩基配列から2つのグループに分けられた。Aグループには、集団発生の4事例中3事例の6株と、インドネシアからの帰国者から分離された1株が属し、Bグループには、集団発生1事例の1株と、パキスタン小児から分離された5株全て、および海外渡航者から分離された5株中4株が含まれた。また、集団発生で得られた患者の糞便から直接検出されたPCR産物の塩基配列を一部調べたところ、12事例中11事例がAグループのウイルスによるものであった。アイチウイルスは地理的に若干の違いが認められ、我が国に流行しているウイルスの多くはAグループに属するものと

表2 アイチウイルス抗体の種類で区別した患者の症状の比較

抗体の種類	人数	症状を示した人の割合 (%)				
		下痢	腹痛	嘔吐	嘔気	発熱
IgM	7	57	86	86	100	100
IgA	11	46	64	73	91	46
IgG	6	83	100	50	50	33
合計	24	58	79	70	83	58

考えられた³⁵⁾。

血清疫学

愛知ウイルスに対する抗体保有率について、愛知県血清バンク事業で1989年に集められた血清773検体を用いて、その中和抗体の測定を行った。年齢別抗体保有状況は4歳以下が7% (9/125)、5～9歳が18% (18/101)、10～14歳が32% (15/47)、15～19歳が50% (30/60) と、加齢とともに増加し、30歳以上では各年齢層60名ずつ調べて80%近い人が愛知ウイルスに対する抗体を保有していた³²⁾。この、抗体保有状況はエンテロウイルス²⁵⁾やA型肝炎ウイルス³⁰⁾のそれとは異なり、ノーウォーク様ウイルスの抗体保有状況¹⁸⁾と似ている。この傾向は、1998年に採取された血清でも同様であった (図5)。また、関東地方、広島県、および愛媛県で採取された血清でも同様な傾向が認められた (長谷川斐子、福田伸治、大瀬戸光明：私信)。アイチウイルスに感染する機会はかなり多いと思われる。

胃腸炎の集団発生で、ベア血清に有意な抗体価上昇がみられた患者の特異抗体の種類を調べた。IgM抗体が高く検出されたものが24名中7名、IgA抗体価の高かったものが11名であった。残り6名はIgG抗体の反応によるものと思われ、この内5名は急性期血清中にも特異抗体が検出されたことから、再感染によるものと考えられた。初感染と思われる高いIgM抗体が検出された7名は、全員が発熱と嘔気を、6名が嘔吐と腹痛を訴えたのに対し、下痢症状は4名のみであった。これに対し、再感染が疑われた6名は全員が腹痛を、5名が下痢症状を訴えたが、発熱は2名で嘔吐は3名のみであった。IgA抗体の反応が顕著であった11名はほぼ中間の割合をとった (表2)。抗体の反応の違いにより症状にも変化がみられることから、アイチウイルスのヒトに対する病原性が示唆された (山下他：投稿準備中)。

おわりに

アイチウイルスがピコナウイルス科に属することから、本ウイルスによる感染がエンテロウイルスによる感染と同様に不顕性感染の多い多様な臨床像を示すのか興味のあるところである。ELISAによるウイルス抗原の検査では、日本の小児患者は、下気道炎の1名のみ陽性であったが、抗体保有率は4歳以下で7%、5～9歳で18% (1989年) と少なからず陽性者が存在し、感染は受けていると思われる。不顕性感染の多さが窺われるが、患者の排泄するウイルス量が少ないために検出できない可能性も否定できない。集団発生で得られたベア血清による検査法と比べればELISAによる抗原検出にも感度の点で問題があることも事実である。RT-PCR法を用いて、各種疾患との関わりを調べることで、本ウイルスの病原性が明らかになると考える。

アイチウイルスは現在1属1種のウイルスであるが、電子顕微鏡による検査でウシのカリシウイルスとされていたウイルスの遺伝子がアイチウイルスのそれに近い配列を示したとの報告がある (N. Knowles：私信)。著者もウシの血清に中和反応を示すアイチウイルスに近縁のウイルスを分離している³⁷⁾。コブウイルス属に属する別のウイルスがヒトを含む色々な宿主から分離される可能性がある。

謝 辞

本研究は愛知県衛生研究所、国立感染症研究所、札幌医科大学、名古屋大学、カラチ市民病院、および名古屋空港検疫所との共同で行われた。関係者各位に感謝します。また、執筆の機会を与えて下さった名古屋大学の西山幸廣教授にお礼申し上げます。

引用文献

- 1) Ashley, C. R., Caul, E. O. and Paver, W. K. (1978). Astrovirus-associated gastroenteritis in children. *J. Clin. Pathol.* **31**, 939-943.
- 2) Auvinen, P. and T. Hyypia. (1990). Echoviruses include genetically distinct serotypes. *J. Gen. Virol.* **71**, 2133-2139.
- 3) Bazan, J. F. and R. J. Fletterick. (1988). Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**, 7872-7876.
- 4) Blacklow, N. R. (1998). Medical virology of small round gastroenteritis viruses. *In* L. M. d. l. Maza

- and E. M. Peterson (ed.) ,Medical virology, vol. 9. pp. 111-128. Plenum Press, New York.
- 5) Chen, H. H., Kong, W. P. and Roos, R. P.(1995). The leader peptide of Theiler's murine encephalomyelitis virus is a zinc-binding protein. *J. Virol.* **69**, 8076-8078.
 - 6) Cruz, J. R., Bartlett, A. V., Herrmann, J. E., Caceres, P., Blacklow, N. R. and Cano, F.(1992). Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. *J.Clin. Microbiol.* **30**, 1140-1144.
 - 7) Cubitt, W. D.(1987). The candidate caliciviruses. *Ciba Found.Symp.* **128**, 126-143.
 - 8) Cukor, G. and Blacklow, N. R.(1984). Human viral gastroenteritis. *Microbiol. Rev.* **48**, 157-179.
 - 9) Dolin, R., Treanor, J. and Madore, H. P.(1987). Novel agents of viral enteritis in humans. *J. Infect. Dis.* **155**, 365-376.
 - 10) Donnelly, M. L., Gani, D., Flint, M. Monaghan, S. and Ryan M. D.(1997). The cleavage activities of aphthovirus and cardiovirus 2A proteins. *J. Gen. Virol.* **78**, 13-21.
 - 11) Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V. and Lai, M. M. (1991). Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS Lett.* **288**, 201-205.
 - 12) Haruki, K., Seto, Y., Murakami, T., and Kimura, T. (1991). Pattern of shedding of small, round-structured virus particles in stools of patients of outbreaks of food-poisoning from raw oysters. *Microbiol.Immunol.* **35**, 83-86.
 - 13) Hayashi, Y., Ando, T., Utagawa, E., Sekine, S., Okada, S., Yabuuchi, K., Miki, T. and Ohashi, M. (1989). Western blot (immunoblot) assay of small, round-structured virus associated with an acute gastroenteritis outbreak in Tokyo. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1728-1733.
 - 14) Hyypia, T., Horsnell, C., Maaronen, M., Khan, M., Kalkkinen, N., Auvinen, P., Kinnunen, L. and Stanway, G.(1992). A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**, 8847-8851.
 - 15) Jang, S. K., Pestova, T. V., Hellen, C. U., Witherell, G. W. and Wimmer, E.(1990). Cap-independent translation of picornavirus RNAs : structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme* **44**, 292-309.
 - 16) King, A. M. Q., Brown, F., Christian, P., Hovi, T., Hyypia, T., Knowles, N. J., Lemon, S. M., Minor, P. D., Palmenberg, A. C., Skern, T., and Stanway, G. (ICTV *Picornaviridae* Study Group) (1999) Picornavirus taxonomy : a modified species definition and proposals for three new genera. XI the International Congress of Virology, Sydney, Australia.
 - 17) Mayo, M.A., and Pringle, C.R.(1998) Virus taxonomy-1997. *J. Gen. Virol.* **79**, 649-657.
 - 18) Numata, K., Nakata, S., Jiang, X., Estes, M.K. and Chiba, S.(1994). Epidemiological study of Norwalk virus infections in Japan and southeast Asia by enzyme-linked immunosorbent assays with Norwalk virus capsid protein produced by the baculovirus expression system. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 121-126.
 - 19) 大石 功. (1999). カリシウイルス胃腸炎の疫学—特に Norwalk-like viruses(NLVs)について—, *臨床とウイルス*, **27**, 114-126.
 - 20) Pelletier, J. and N. Sonenberg.(1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**, 320-325.
 - 21) Piccone, M. E., Zellner, M., Kumosinski, T. F., Mason, P. W. and Grubman, M. J.(1995). Identification of the active-site residues of the L proteinase of foot-and-mouth disease virus. *J Virol.* **69**, 4950-4956.
 - 22) Poyry, T., Kinnunen, L., Hyypia, T., Brown, B., Horsnell, C., Hovi, T. and Stanway, G.(1996). Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses. *J. Gen. Virol.* **77**, 1699-1717.
 - 23) Putnak, J. R. and Philips, B. A.(1981). Picornaviral structure and assembly. *Microbiol. Rev.* **45**, 287-315.
 - 24) Ryan, M. D. and Drew, J.(1994). Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polypeptide. *Embo. J.* **13**, 928-933.
 - 25) 栄 賢司. (1992). エンテロウイルス感染に起因する疾患と年齢に関する研究—愛知県における5年間のウイルス分離と血清疫学—. *感染症学雑誌*, **66**, 1670-1681.
 - 26) Sekine, S., Okada, S., Hayashi, Y., Ando, T., Terayama, T., Yabuuchi, K., Miki, T. and Ohashi, M.(1989). Prevalence of small round structured virus infection in acute gastroenteritis outbreaks in Tokyo. *Microbiol. Immunol.* **33**, 207-217.
 - 27) Skern, T., Sommergruber, W., Blaas, D., Grundler, P., Fraundorfer, F., Pieler, C., Fogy, I. and Kuechler, E.(1985). Human rhinovirus 2 : complete nucleotide sequence and proteolytic processing signals in the capsid protein region. *Nucleic Acids Res.* **13** : 2111-2126.
 - 28) Stanway, G.(1990). Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* **71**, 2483-2501.
 - 29) Sugieda, M., Nakajima, K. and Nakajima, S.(1996).

- Outbreaks of Norwalk-like virus-associated gastroenteritis traced to shellfish : coexistence of two genotypes in one specimen. *Epidemiol. Infect.* **116**, 339-346.
- 30) 鈴木司郎, 恒矢保雄, 竹川正純, 馬場 優.(1985). A 型ウイルス肝炎. 日本臨床 (春季臨時増刊号). **43**, 619-626.
- 31) Yamashita, T., Kobayashi, S., Sakae, K., Nakata, S., Chiba, S., Ishihara, Y., and Isomura, S.(1991). Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* **164**, 954-957.
- 32) Yamashita, T., Sakae, K., Ishihara, Y., Isomura, S., and Utagawa, E.(1993). Prevalence of newly isolated, cytopathic small round virus (Aichi strain) in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2938-2943.
- 33) Yamashita, T., Sakae, K., Kobayashi, S., Ishihara, Y., Miyake, T., Mubina, A., and Isomura, S.(1995). Isolation of cytopathic small round virus (Aichi virus) from Pakistani children and Japanese travelers from Southeast Asia. *Microbiol. Immunol.* **39**, 433-435.
- 34) Yamashita, T., Sakae, K., Tsuzuki, H., Suzuki, Y., Ishikawa, N., Takeda, N., Miyamura, T., and Yamazaki, S.(1998). Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus : a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans. *J. Virol.* **72**, 8408-8412.
- 35) Yamashita, T., M. Sugiyama, H. Tsuzuki, K. Sakae, Y. Suzuki, and Y. Miyazaki (1999). Application of a Polymerase Chain Reaction for Identification and Differentiation of Aichi Virus, a New Member of the Picornavirus Family Associated with Gastroenteritis in Humans. (投稿中)
- 36) 山下照夫, 都築秀明, 小林慎一, 栄 賢司, 鈴木康元.(1999). 胃腸炎患者から分離された新型ピコルナウイルス (アイチウイルス) の RT-PCR 法による検出. *臨床とウイルス*. **27**, 127-132.
- 37) 山下照夫, 杉山 雅, 都築秀明, 栄 賢司, 鈴木康元.(1999). HeLa 細胞に感染していた血清型の異なるアイチウイルスについて. 第47回日本ウイルス学会総会.
- 38) Yu, S. F. and Lloyd, R. E. (1992). Characterization of the roles of conserved cysteine and histidine residues in poliovirus 2A protease. *Virology* **186**, 725-735.