

# 香川県下における腸管アデノウイルスの検出と その血清型推移並びに腸管アデノウイルス検出用キットの検討

山西重機・藤井康三・三木一男

## I はじめに

腸管アデノウイルスと呼ばれるアデノ40型、41型は広く分布し、ロタウイルスに次いで主要な乳幼児下痢症の起因ウイルスである<sup>1),2)</sup>。このウイルスは、培養困難性であるが、Takiffら<sup>3)</sup>によってGraham 293細胞で増殖することがわかった。しかし時間がかかることから、従来、糞便から直接抽出する方法がおこなわれている。すなわち、電子顕微鏡観察法<sup>4)</sup>や型別もできる制限酵素を用いたDNA分析<sup>5)</sup>などが用いられ、更に特異モノクローナル抗体によるラテックス凝集反応<sup>6)</sup>や酵素抗体法<sup>7),8)</sup>などが開発され検討されている。今回我々は、40型、41型に特異なモノクローナル抗体<sup>9)</sup>を用いた酵素抗体法(ELISA法)により1983年以降の香川県内での腸管アデノウイルス血清型の推移を検討すると共に、使用機会のあったAdenoclonetype 40/41EIA: Cambridge Biotech (EIAキット)との比較をおこない、その有用性と特異性について検討したので、その概要について報告する。

## II 材料と方法

### 1. 糞便材料

1983年～91年までに香川県感染症サーベイランス定点を受診した急性胃腸炎患者から採取した糞便のうち電子顕微鏡観察でアデノウイルス陽性と判定した58検体、陰性と判定した25検体および愛媛県衛生研究所から分与を受けた腸管アデノウイルス陽性糞便22検体。そのほかロタウイルス、SRV陽性糞便を用いた。

### 2. アデノウイルスの他の血清型

HEL細胞による細胞培養分離株で、1型、2型、3型、4型、5型を用いた。

### 3. 40型、41型特異モノクローナル抗体を用いたELISA法(ELISA法)

40型および41型特異モノクローナル抗体は、愛媛県衛生研究所から分与を受けた。抗アデノウイルス3型ウサギ免疫血清をCapture抗体として、40型および41型特異モノクローナル抗体を検出抗体とする2抗体、サンドイッチ法を用い高木ら<sup>8)</sup>の方法に準拠した。

### 4. Adenoclonetype 40/41 EIAを用いたEIA法(EIAキット)

抗アデノ40/41型モノクローナル抗体がコートされているウエルに検体を滴下。そして酵素標識抗IgG抗体、更に基質を加えて反応、あと1N硫酸で反応停止、そして吸光度を測定した。詳細手順はキットに添付されている指示書に従った。

## III 結果

### 1. 県内の腸管アデノウイルス40型と41型の検出と血清型推移

1983年以降、電子顕微鏡観察法(電顕法)でアデノウイルス陽性と判定した糞便58検体を対象とした。表1に示すように1985年以前はそのほとんどが40型であったが、1987年以降は41型を主流とし、これに40型が一部検出された。

58検体中26検体が40型、23検体が41型であったが9検体は両型と反応しなかった。

表1 香川県下の腸管アデノウイルス(40, 41型)の推移

年	電子顕微鏡観察による陽性数	40, 41型特異モノクローナル抗体をもちいたELISA法			Adenoclonetype 40/41 EIA Kit	
		40型	41型	反応せず	40/41	反応せず
1983	2	2			2	
1984	24	18	1	5	19	5
1985	3	3			3	
1986						
1987	6		5	1	5	1
1988	6	1	4	1	5	1
1989	4		4		4	
1990	10	2	6	2	8	2
1991	3		3		3	
計	58	26	23	9	49	9

### 2. 腸管アデノウイルスの検出法による比較

表2に示すように、電顕法で陽性と判定された糞便58検体、陰性と判定された糞便25検体を用いたELISA法では陽性糞便26検体が40型および23検体が41型に型別され

表2 腸管アデノウイルス検出方法の比較  
(3法による検討)

電子顕微鏡観察によるアデノウイルス検出		アデノウイルス40型41型特異モノクローナル抗体を用いたELISA		Adenoclone-type 40/41	
		40型	41型	40/41	(-)
陽性	58	26	23	49	0
		(-)	9	0	9
陰性	25	(-)	25	0	25

表3 腸管アデノウイルス検出方法の比較  
(2法による検討)

アデノウイルス40型41型特異モノクローナル抗体を用いたELISA法		Adenoclone-type 40/41 EIA	
40型	41型	40/41	(-)
40型	12	22	0
41型	10		

表4 その他のウイルスを用いた検出方法の比較

用いたウイルス		検体数	モノクローナル抗体 ELISA 法別		Adenoclone-type 40/41 EIA	
			陽性	陰性	陽性	陰性
細胞培養の分離株	アデノ-1	5	0	5	0	5
	アデノ-2	5	0	5	0	5
	アデノ-3	10	0	10	0	10
	アデノ-4	5	0	5	0	5
	アデノ-5	3	0	3	0	3
糞便抽出	ロタウイルス	10	0	10	0	10
	S R V	3	0	3	0	3
計		41	0	41	0	41

たが、残りの9検体と陰性25検体は反応を示さなかった。

またEIAキットで測定すると、ELISA法で型別された49検体はすべて陽性で、また他の34検体はすべて反応が陰性であり両測定法は一致した。

表3に示したのは、愛媛県衛生研究所から分与された糞便(ELISA法による型別で40型12検体、41型10検体)を用いたEIAキットによる測定結果で、22検体すべてが陽性となり、両測定法で一致した。

表4は、非特異反応の検討を目的として、アデノウイルス1型、2型、3型、4型、5型あわせて28株、糞便由来のロタウイルス10株、SRV 3株について両法で測定した結果は全例陰性で一致した。

ELISA法で同定した40型の糞便10%乳剤を2倍階段希釈して両法で測定し、検出感度を比較した結果、図1のように、ELISA法では1倍(原液)OD値2.94で2,048倍希釈およびEIAキットでは1倍(原液)2.08で256倍

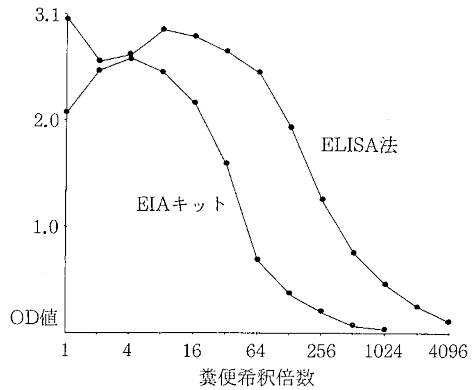


図1 抗原希釈による検出感度の比較(40型)

希釈までがそれぞれ陽性とされた。

ELISA法で同定した41型糞便10%乳剤を2倍階段希釈して両法で測定し、検出感度を比較した結果、図2のように、ELISA法では1倍(原液)2.40で、2,048倍希釈およびEIAキットでは、1倍(原液)2.909で64倍希釈までがそれぞれ陽性と確認できた。

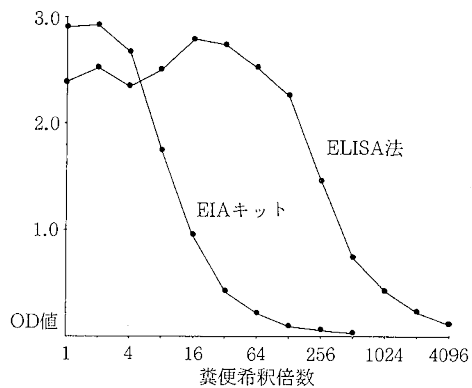


図2 抗原希釈による検出感度の比較(41型)

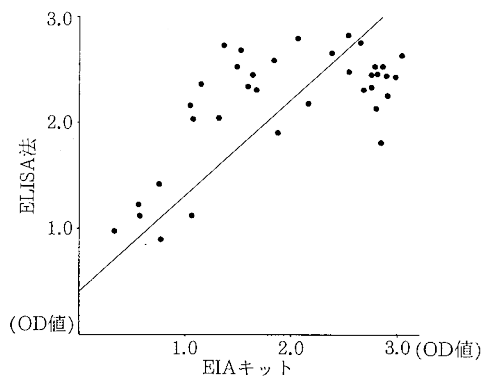


図3 アデノウイルス40型の検出方法による比較

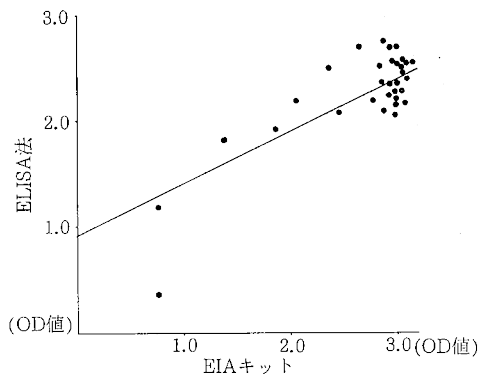


図4 アデノウイルス41型の検出方法による比較

また40型36検体, 41型32検体を両法で測定し, その吸光度を比較すると相関係数はそれぞれ0.78, 0.87となった(図3, 図4)。

#### IV 考 察

糞便中のアデノウイルスの検出方法としては, 急性期下痢便中に多数のウイルス粒子の排泄がみられることから, 従来, 電顕法による形態学的同定<sup>9)</sup>がおこなわれてきた。同時に40, 41型別できる方法として制限酵素を用いた電気泳動法<sup>3), 9)</sup>, 培養細胞(HEK細胞を形質転換したGraham 293細胞)による分離<sup>3), 10)</sup>, ラテックス凝集反応<sup>6)</sup>, 酵素抗体法<sup>7), 8)</sup>等抗原抗体反応による種々の検出方法が開発されて用いられている。

今回我々は腸管アデノウイルスの各型の県内への浸淫状況, また年度による相違等ELISA法, EIAキットを用いて測定し, 両法を比較し, 併せてEIAキットの有用性と特異性について検討した。

1983年以降の県下での電顕法陽性58検体についてELISA法で型別をおこなった。

1985年以前では40型が大部分を占めたが, 1987年以降では41型が主流となり現在も続いている。

1983年千葉ら<sup>11)</sup>は札幌市内の施設での40型流行例を国内で始めて報告した。また荒木ら<sup>12)</sup>は東京地域で1984年~87年の7年間で40型が多いことを報告している。

一般的に1985年以前では40型の検出事例の報告<sup>13), 14)</sup>が多くみられる。

一方, 高木ら<sup>8)</sup>の松山地域の調査では1986年~89年の4年間において40型が11例, 41型25例が検出され, 41型が多く検出された。また大阪府下での加瀬ら<sup>15)</sup>の調査では1981年~84年は40型が優位であったが, 1988年は41型のみと報告している。

40型から41型への変遷は, 世界的傾向であり<sup>16), 17)</sup>, 一

地域の長期観察例としての県内の調査でも, 同様に, 腸管アデノウイルスの推移は, 1986年を境として大きく変化していることを示唆している。

また電顕法陽性58検体のうち, 49検体がELISA法とEIAキットの両法で陽性であったが, 9検体は両法に反応しなかった。これは咽頭からの通過ウイルスで, 40型, 41型以外の血清型アデノウイルス, 或は, 粒子表層の型別を認識する抗原部分の破損や糞便中のウイルス粒子数が少ない場合等があったことを示していると考えられる。

しかし両法の吸光度OD値からみると電顕法で粒子が確認される糞便では全て1.0以上の高OD値陽性となり, 陰性限界付近には存在しなかった。また粒子数によってOD値も相関して変動することがわかった。

今回EIAキットを用いる機会があり, この有用性と特異性の検討も併せておこなった。

腸管アデノウイルス陽性, 陰性糞便, またこれ以外のアデノウイルス血清型株, ロタウイルス, SRVについての両法の結果は完全に一致した。

また両法の吸光度について比較した。40型36検体についてみると相関係数0.78であり, 41型32検体では相関係数0.87であった。このことから両法間には高い相関があることがわかった。

また40型についてはELISA法が高く反応したが, 41型についてはEIAキットが糞便の低希釈倍数において高く反応する傾向にあった。

しかし40型, 41型の糞便を2倍階段希釈して, 両法で比較すると, ELISA法では両型とも2,048倍希釈まで陽性が確認できたが, EIAキットでは256~64倍であり, 希釈すると感度の低下がみられた。

一方, 電顕法陽性糞便58検体中49検体(84.5%)が両法で陽性であったが, 加瀬ら<sup>15)</sup>の報告でも電顕法陽性23例中22例(95.6%)がEIAキットで陽性であり, 我々の傾向に一致した。

また荒木<sup>12)</sup>, 篠崎<sup>18)</sup>らが, 急性胃腸炎の糞便中からのアデノウイルス検出にEIAキットが優れた方法であることを指摘しているように, 電顕法等に較べると簡便であり, また感度においても優れ, 細胞培養等に較べても迅速であった。また, 40型41型を型別できない難点があるが, 吸光度0.15以上を陽性とする判断基準では目視による陽性判定が可能であり, 従って機器を必要としないことから, 糞便から直接抗原検出の方法として, また大量処理のスクリーニング法としても有効であると考えられる。

#### V ま と め

1. 電顕法でアデノウイルス陽性と判定した糞便58検体をELISA法で型別すると, 22検体が40型, 23検体が41型

で、残り9検体は反応しなかった。

2. 1985年以前は、そのほとんどが40型で、1987年以降は41型が多くを占めた。
3. ELISA法とEIAキットの両法で陽性検体、陰性検体を測定すると、全例で一致した。
4. ELISA法とEIAキット両法の吸光度を比較すると相関係数は、40型0.78, 41型0.87であった。
5. ELISA法とEIAキットの検出感度を比較すると、40型では、それぞれ2.048倍, 256倍希釈, また、41型では、それぞれ2.048倍, 64倍希釈まで確認できた。

## 文 献

- 1) Uhnod I, Wadell G, Svensson L, Johansson ME: Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol* **20**: 365~372, 1984.
- 2) Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Arrobio JO, Jeffries BC, Stallings EP, Lewis C, Miles AJ, Gardner MK, Parrott RH: Adeno viruses and pediatric gastroenteritis. *J Infect Dis* **151**: 437~443, 1985.
- 3) Takiff HE, Straus SE, Garon CF: Propagation and in vitro studies of previously non-cultivable enteral adenoviruses in 293 cells. *Lancet* **2**: 832~834, 1981.
- 4) 山西重機: 香川県におけるウイルス性下痢症とその疫学. *感染症学雑誌* **58**: 774~783, 1984.
- 5) 荒木和子, 牛島廣治, 小林正明, 白石裕昭, 篠崎立彦, 阿部敏明, 藤田靖子: 腸管アデノウイルス (Ad40, Ad41) の分子疫学的研究. *ウイルス* **38**: 59~68, 1988.
- 6) 荒木和子, 篠崎立彦, 牛島廣治, 藤井良知: 糞便材料および感染細胞からのラテックス凝集法によるアデノウイルス抗原の検出成績. *臨床とウイルス* **15**: 87~89, 1987.
- 7) Herrmann JE, Perron-Henry DM, Stobbs-Walro DS, Blacklow NR: Preparation and characterization of monoclonal antibodies to enteric adenovirus types 40 and 41. *Arch Virol* **94**: 259~265, 1987.
- 8) 高木賢二, 山下育孝, 井上博雄, 大瀬戸光明, 桑原広子, 西尾 治, 磯村思元: 単クローン抗体を用いた酵素免疫吸着法による糞便からの腸管アデノウイルス (アデノ40型, 41型) 血清型別, *感染症学雑誌* **65**: 552~557, 1991.
- 9) 牛島廣治, 本間 仁, 荒木和子, 篠崎立彦, 小林正明, 向山淳司: ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による糞便中のアデノウイルスの検出. *臨床とウイルス* **15**: 527~529, 1987.
- 10) 荒木和子: 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. *ウイルス* **36**: 273~282, 1986.
- 11) Chiba S, Nakata S, Nakamura I, Taniguchi K, Urasawa S, Fujinaga K, Nakao T: Outbreak of infantile gastroenteritis due to type 40 adenovirus. *Lancet* **2**: 954~957, 1983.
- 12) 荒木和子, 小林正明, 阿部敏明, 藤田靖子, 篠崎立彦, 佐藤 隆: モノクローナル抗体をもちいたEIAキットによる腸管アデノウイルスの検出成績. *臨床とウイルス* **16**: 556~558, 1988.
- 13) Kidd AH, Berkowitz FE, Blaskovic PJ, Schoub BD: Genome variants of human adenovirus 40 (Subgroup F). *J Med Virol* **14**: 235~246, 1984.
- 14) de Jong JC, Wigand R, Kidd AH, Wadell G, Kapfenberg JG, Muzerie CJ, Wermenbol AG, Firtzclaff RG: Candidate adenoviruses 40 and 41: Fastidious adenoviruses from human infant stool. *J Med Virol* **11**: 215~231, 1983.
- 15) 加瀬哲男, 前田章子, 大石 功, 峰川好一: 1980~1988年の大阪府下における腸管系アデノウイルス (Ad40, 41) の検索-特にAd40/41検出用EIAキットを用いての検討. *臨床とウイルス* **19**: 168~172, 1991.
- 16) Herrmann JE, Taylor DN, Echeverria P, Blacklow NR: Astroviruses as a cause of Gastroenteritis in children. *N Engl J Med* **324**: 1757~1760, 1991.
- 17) Wadell G, Allard A, Johansson M, Svensson L, Uhnod I: Enteric adenoviruses. *Ciba Found Symp* **123**: 63~91, 1987.
- 18) 篠崎立彦, 荒木和子, 阿部敏明, 牛島廣治: 単クローン抗体酵素免疫法による糞便中のアデノウイルスの検出成績. *臨床とウイルス* **16**: 85~88, 1988.