

## アデノウイルス 8 型の分子疫学的解析：札幌と高雄における 分離株の同定と解析

藤井 伸一

札幌医科大学内科学第3講座 (主任 鈴木 明 教授)

山下 利春

札幌医科大学癌研究所分子生物学部門 (主任 藤永 蕙 教授)

### Molecular Epidemiology of Adenovirus Type 8: Analysis and Identification of Viral Isolates Recovered in Sapporo and in Kaohsiung

Shin-ichi FUJII

Department of Internal Medicine (Section 3), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. A. Suzuki)

Toshiharu YAMASHITA

Department of Molecular Biology, Cancer Research Institute, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. K. Fujinaga)

Enzymatic cleavage patterns of viral DNAs of adenovirus type 8 (Ad8), 25 isolates recovered in Sapporo, Japan and 20 isolates recovered in Kaohsiung, Taiwan from epidemic keratoconjunctivitis (EKC), were examined with five kinds of restriction endonucleases (*Pst*I, *Hind*III, *Bam*HI, *Sal*I and *Sst*I).

Sufficient variations of DNA cleavage patterns were observed among them, indicating that at least six subtypes of Ad8 isolates in total were prevalent in both cities.

On the basis of the cleavage patterns, the isolates were divided into two subtypes in Sapporo and into four subtypes in Kaohsiung, respectively, (designated Ad8A and Ad8B in Sapporo, Ad8C, Ad8D, Ad8E and Ad8F in Kaohsiung). In Sapporo, Ad8A was prevalent in the period from 1975 to 1978, while Ad8B was prevalent in the period from 1976 to 1981. Ad8A has not been detected since 1979, and thereafter only Ad8B has been detected. In Kaohsiung, however, four subtypes Ad8C-F were prevalent from 1980 to 1981. (Received October 31, 1983 and accepted November 28, 1983)

**Key words:** Adenovirus type 8, Ad8 subtypes, EKC, Cleavage pattern analysis, Molecular epidemiology

#### 1 緒 言

ヒトアデノウイルス群には、血清型の異なる多くのウイルスが含まれており、それらのアデノウイルス(Ad)の同定に関しては、共通の抗原を検出するために補体結合反応および蛍光抗体法が、そして型別の決定には、赤血球凝集阻止反応および中和反応が用いられている。しかしながら、赤血球凝集阻止反応および中和反応では、同一血清型の strain 間の鑑別同定が不可能である

ため、正確な流行伝播の調査が把握困難である。

最近、分子生物学的方法がウイルス感染症の疫学的研究に応用されるようになった。これらの方法は、通常行なわれている血清学的方法より、より簡単に、なおかつ明確にウイルスの同定ができ、分離株間の同定を遺伝子レベルで明確に分類することができる。

精製したウイルス DNA もしくは、部分的に精製した DNA を用いて、制限酵素による切断パターンによる解析は、ヒトアデノウイルス 7 型 (Ad7)<sup>1,2)</sup>, Ad19<sup>3)</sup>,

Ad37<sup>4)</sup>などの株間の差についての解析に利用されている。

ヒトアデノウイルス8型(Ad8)は、よく知られているように、流行性角結膜炎(EKC)の重要な病原体であり、日本、台湾において、現在年間を通じて、特に夏にそのピークはあるが、Ad8によるEKCは、よくみかけられる眼科疾患の一つである<sup>5,6,7)</sup>。しかしながら、Ad1-Ad7等と比較して、ウイルスの増殖が遅く、Ad8分離株の解析は困難を伴う場合が多かった。

しかしながら、最近、鈴木ら<sup>8)</sup>は感染細胞DNAを使用してウイルスDNAの制限酵素切断パターンを同定する方法を開発した。この方法は迅速かつ簡単であるためウイルス性疾患の疫学および臨床的研究に実用的である。そこで我々は、上記の方法により、1975年から1981年の7年間の札幌での分離株と、1980年から1981年の札幌と台湾高雄市の分離株の比較研究を行った。その結果、疫学的に興味深い知見が得られた。

## 2 実験材料と実験方法

### 2.1 ウイルス株

解析した分離株は全部で45株で、札幌において1975年から1981年の7年間に分離された25株、台湾高雄市で1980年から1981年の2年間に分離された20株である。分離株の選択については、1年に4株以下の場合、全ての分離株を解析し、5株以上の場合、3~7株をランダムに抽出した。これらの株全ては、青木ら<sup>5-7)</sup>によって報告されたように、ヒトアデノウイルスの血清型に特異的な抗血清を用いた中和反応によってAd8と同定されたものである。EKCの患者により分離された年度と、そのサンプルナンバーは、Table 1に示した。1976年の76-88と76-90は同一患者から分離されたものであり、後者はEKC患者の便より分離されたもので、その他の株全ては、EKC患者の結膜擦過物より分離したものである。

制限酵素切断DNA断片の分子量マーカーとして、Ad12(Huie strain)<sup>9)</sup>、Ad5(Adenoid 75)<sup>9)</sup>およびCharon4A DNA<sup>9)</sup>を用いた。

### 2.2 ウイルス感染細胞

HeLa細胞もしくは、ヒト胎児腎(HEK)細胞をRoux bottle(底面積160 cm<sup>2</sup>)に5%仔牛血清を含むEagle's minimum essential medium(MEM)を用いて単層培養しウイルス材料を感染させ、明瞭な細胞変性効果を認めるまで37°Cで培養した。

### 2.3 ウイルスDNAの精製

Green and Pinaの方法<sup>10,11)</sup>に基づき、ウイルス感染細胞を破壊、フェノールで細胞由来の蛋白を変性除去

**Table 1** Isolation of Ad8 subtypes and isolation numbers.

	Sapporo	Kaohsiung
1975	75-10, 75-11, 75-12, 75-74	
1976	76-71, 76-88, 76-90	
1977	77-85, 77-110, 77-111, 77-134	
1978	78-41, 78-60	
1979	79-19, 79-119, 79-127	
1980	80-157, 80-172, 80-190, 80-118, 80-251, 80-428, 80-504	81-009, 81-350, 80-375, 81-034
1981	81-120, 81-150	81-400, 81-418, 81-428, 81-264, 81-268, 81-282, 81-460, 81-330, 81-420, 81-425, 81-248, 81-476, 81-286, 81-318, 81-468, 81-272

した後、塩化セシウム密度勾配平衡遠心により、ウイルス粒子を精製し、フェノール法で、ウイルスDNAの抽出精製を行なった。

### 2.4 感染細胞DNAの精製

藤永らの方法<sup>12,13)</sup>に基づき、ウイルス感染細胞より抽出した。すなわち、sodium dodecylsulfate(SDS)およびpronaseで細胞を処理し、フェノール法によってDNAを抽出し、さらにエタノール沈殿後、RNaseとpronase処理およびフェノール抽出を行なって感染細胞DNAを精製した。

### 2.5 制限酵素

HindIIIは、Lai and Nathansの方法<sup>14)</sup>により精製した。PstI, EcoRI, SalI, SstI, BamHIは、市販(宝酒造株式会社)のものを使用した。

### 2.6 制限酵素によるDNAの消化とアガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動と、制限酵素による切断パターンの解析は、基本的には、鈴木らの方法<sup>8)</sup>に従った。感染細胞DNA 1μgに対して、1単位の制限酵素を加え、37°Cで3~5時間反応させた。用いた反応緩衝液は以下の通りである。EcoRI [100mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl], BamHI [6 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, 6 mM 2-mercaptoethanol (2-ME)], HindIII

[20mM Tris-HCl (pH 7.4), 7mM MgCl<sub>2</sub>, 60 mM NaCl, 2mM 2-ME], *Sal*I [50 mM Tris-HCl (pH 8.1), 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, 2 mM 2-ME], *Pst*I [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 μg/ml bovine serum albumin], *Sst*I [14 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 90 mM NaCl, 6 mM 2-ME]. 反応終了後, 0.9%アガロース垂直平板ゲル(3×160×220 mm)を用いて, 泳動用緩衝液(36 mM Tris-HCl, 32 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, pH 7.7) 中で, 50 V 12 時間電気泳動を行ない, ethidium bromide (0.5 μg/ml) で, 30 分間染色し, 紫外線照射下で切断パターンを観察, 写真撮影を行なった.

### 3 実験成績

#### 3.1 札幌の流行株 (79-119) のウイルスゲノム DNA の分子量の測定

各分離株を解析するために, 基準になる株の一つ選んだ(isolation No.79-119).この基準となる株の DNA 分子量を算出し, 他の分離株との比較検討を行なう際の指標とした. この分離株 79-119 の 5 種類の制限酵

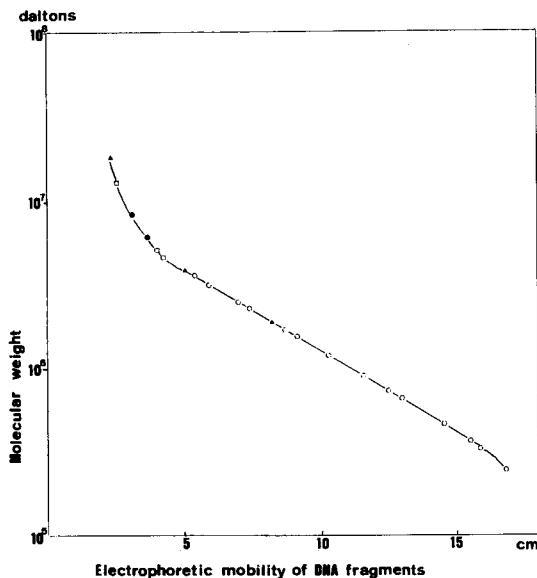


Fig. 1 Relationship between molecular weight and electrophoretic mobility of Ad12 *Hind*III, Ad12 *Eco*RI, Ad5 *Eco*RI and Charon 4A *Eco*RI fragments.

- : Ad12 *Hind*III fragments,
- : Ad12 *Eco*RI fragments,
- : Ad5 *Eco*RI fragments,
- ▲: Charon 4A *Eco*RI fragments.

素による切断 DNA 断片の各々の分子量は, Ad12 (Huie strain) の *Hind*III と *Eco*RI 断片<sup>15)</sup>, Ad5 の *Eco*RI 断片<sup>16)</sup>, および高分子量域のマーカーとして Charon4A DNA の *Eco*RI 断片<sup>9)</sup>を分子量のマーカーに置き, 相対移動度と分子量の関係 (Fig. 1) から算出し, Table 2 にまとめた. これより 79-119 株のゲノム DNA の分子量の合計は,  $22.7 \times 10^6$  ダルトンであった.

#### 3.2 Ad8 分離株 45 株の制限酵素による切断パターン

##### 3.2.1 制限酵素 *Pst*I による切断パターン

Ad8 分離株は, *Pst*I で切断すると Fig. 2 に示すように 12 本の DNA 断片が生じ, 分離株の全てが同一の切断パターンを示した. 各 DNA 断片の分子量を Table 2 にまとめた.

##### 3.2.2 制限酵素 *Hind*III による切断パターン

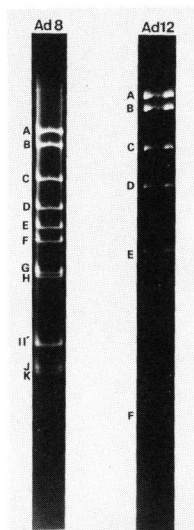
*Hind*III 切断パターンから, Ad8 分離株 45 株は, 札幌株 25 株と台湾高雄市の 20 株の 2 つのグループに大別できる. Fig. 3 の lane 1 は, 札幌株の切断パターンであり, lane 2 は, 高雄株の切断パターンである. Fig. 3 に示すように, 札幌株と, 高雄株の切断パターンの異なる点は, lane 1 の band D が消失し, lane 2 には, lane 1 に検出されない 2 つの band が認められることである. lane 1 の各 DNA 断片の分子量を Table 2 にまとめた.

Table 2 Molecular weights (dalton) of DNA fragments cleaved with five kinds of restriction endonucleases<sup>a)</sup>.

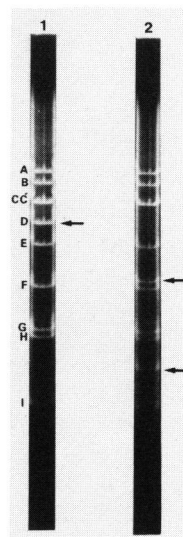
	<i>Pst</i> I	<i>Hin</i> dIII	<i>Bam</i> HI	<i>Sal</i> I	<i>Sst</i> I
A	4.48	A 3.97	A 14.08	A 8.96	A 4.99
B	3.71	B 3.46	B 4.48	B 5.76	B 4.16
C	2.75	C 2.89	C 3.07	C 2.05	C 2.94
D	2.18	C' 2.89	D 1.22	D 1.79	C' 2.94
E	1.95	D 2.50		E 1.66	D 2.30
F	1.79	E 2.18		F 1.54	E 2.24
G	1.41	F 1.54		G 0.70	F 1.34
H	1.34	G 1.12		H 0.45	G 0.96
I	0.83	H 1.06			H 0.70
I'	0.83	I 0.64			I 0.32
J	0.70				
K	0.67				
Total <sup>b)</sup>	22.6	22.3	22.9	22.9	22.9
				(×10 <sup>6</sup> daltons)	

a) Molecular weights of DNA fragments were estimated from their electrophoretic mobilities using Ad12 *Hind*III, Ad12 *Eco*RI, Ad5 *Eco*RI and Charon 4A *Eco*RI fragments as size markers (Fig. 1).

b) Average: 22.7

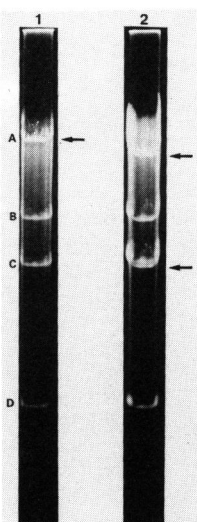


**Fig. 2** Cleavage pattern of Ad8 isolates with *Pst* I. Ad8-infected cell DNAs (10  $\mu$ g) were cleaved with *Pst* I. The digestion products were electrophoresed in a 0.9% agarose slab gel (3 $\times$ 160 $\times$ 220mm) at 50 V for 12 hours. After electrophoresis, the gel was photographed under UV light. Ad12 DNA cleaved with *Eco*RI was used as the molecular weight reference.



**Fig. 3** Cleavage patterns of Ad8 isolates with *Hind*III. Ad8-infected cell DNAs (10  $\mu$ g) were cleaved with *Hind*III. The digestion products were electrophoresed, stained and photographed as described in the legend for Fig. 2.

Lane 1: Ad8 isolates recovered in Sapporo.  
Lane 2: Ad8 isolates recovered in Kaohsiung. Differences in cleavage patterns between lane 1 and lane 2 are indicated by arrows.



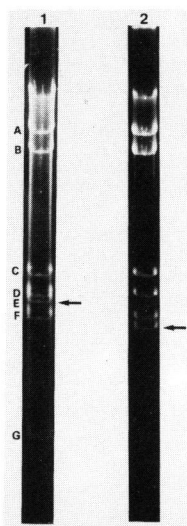
**Fig. 4** Cleavage patterns of Ad8 isolates with *Bam*HI. Ad8-infected cell DNAs (10  $\mu$ g) were cleaved with *Bam*HI. The digestion products were electrophoresed, stained and photographed as described in the legend for Fig. 2.  
Lane 1: All the Ad8 isolates recovered in Sapporo and six Ad8 isolates recovered in Kaohsiung (81-330, 81-420, 81-425, 81-248, 81-476, 81-286).  
Lane 2: The other Ad8 isolates recovered in Kaohsiung. Differences in cleavage patterns between lane 1 and lane 2 are indicated by arrows.

### 3・2・3 制限酵素 *Bam*HI による切断パターン

*Bam*HI 切断は、Ad8 分離株を 2 つのグループに大別し、Fig. 4 の lane 1 に示す切断パターンは、札幌株 25 株と高雄株 6 株 (81-330, 81-420, 81-425, 81-248, 81-476, 81-286) において認められる。他の高雄株は、Fig. 4 の lane 2 に示す切断パターンであった。lane 1 と lane 2 の切断パターンの違いは、lane 1 の band A が lane 2 において消失し、lane 1 に検出されない 2 つの band が認められる点である。lane 1 の各 DNA 断片の分子量を、Table 2 にまとめた。

### 3・2・4 制限酵素 *Sal*I による切断パターン

*Sal*I 切断により札幌株を 2 つに分けることができた。すなわち、高雄株 20 株と、札幌株 8 株 (75-10, 75-11, 75-12, 75-74, 76-71, 77-134, 78-41, 78-60) は、同一の切断パターンを示し (Fig. 5 lane 2)、他の札幌株 17 株はこれとは異なる切断パターンであった (Fig. 5 lane 1)。基準として用いた株 79-119 は、後者の切断パターンであった。lane 1 と lane 2 の切断パターンの差は、lane 1 の band E が消失し、lane 1 に検出されなかった band が lane 2 に 1 本認められる点である。lane 1 の各 DNA 断片の分子量を Table 2 にまとめた。



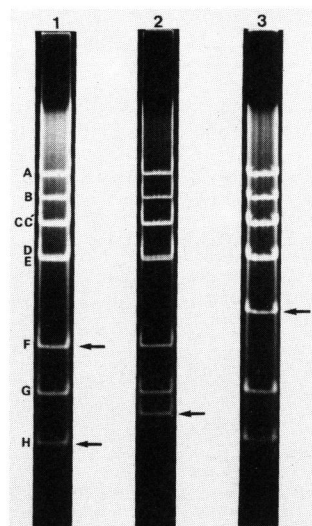
**Fig. 5** Cleavage patterns of Ad8 isolates with *Sal*I. Ad8-infected DNAs (10  $\mu$ g) were cleaved with *Sal*I. The digestion products were electrophoresed, stained and photographed as described in the legend for Fig. 2.

Lane 1: Seventeen Ad8 isolates recovered in Sapporo (76-88, 76-90, 77-85, 77-110, 77-111, 79-19, 79-119, 79-127, 80-157, 80-172, 80-190, 80-118, 80-251, 80-428, 80-504, 81-120, 81-150).

Lane 2: The other Ad8 isolates recovered in both cities. Differences in the cleavage patterns between lane 1 and lane 2 are indicated by arrows.

### 3・2・5 制限酵素 *Sst*I における切断パターン

*Sst*I の切断パターンによって、Ad8 分離株は、3つのグループに分かれた。札幌株 25 株と、高雄株 20 株のうち 8 株(81-282, 81-460, 81-330, 81-420, 81-425, 81-248, 81-476, 81-286)は同一の *Sst*I 切断パターンを示し (Fig. 6 lane 1), 高雄株 20 株のうち 9 株(81-009, 80-350, 80-375, 81-034, 81-400, 81-418, 81-428, 81-264, 81-268)は、これと異なる *Sst*I 切断パターンを示した (Fig. 6 lane 2). 高雄株の残り 3 株(81-318, 81-468, 81-272)は、前 2 者とは異なる切断パターンを示した (Fig. 6 lane 3). 3つの切断パターンの差は、lane 2 では、lane 1 の band H が消失し、新たな band が 1 本検出され、lane 3 では、band F が消失し、lane 2 とも異なる新たな band が 1 本検出された。lane 1 の各 DNA 断片の分子量を、Table 2 にまとめた。



**Fig. 6** Cleavage patterns of Ad8 isolates with *Sst*I. Ad8-infected cell DNAs (10  $\mu$ g) were cleaved with *Sst*I. The digestion products were electrophoresed, stained and photographed as described in the legend for Fig. 2.

Lane 1: All the Ad8 isolates recovered in Sapporo and Ad8 isolates in Kaohsiung (81-282, 81-460, 81-330, 81-420, 81-425, 81-248, 81-476, 81-286).

Lane 2: Ad8 isolates recovered in Kaohsiung (81-009, 80-350, 80-375, 81-034, 81-400, 81-418, 81-428, 81-264, 81-268). Lane 3: Ad8 isolates recovered in Kaohsiung (81-318, 81-468, 81-272). Differences between lane 1 and lane 2 or lane 3 are indicated by arrows.

### 3・3 制限酵素切断パターンによる Ad8 分離株サブタイプの同定

前項でのべた制限酵素 *Pst*I, *Hind*III, *Bam*HI, *Sal*I, *Sst*I 切断パターンより、Ad8 に 6 種類のサブタイプが存在し、札幌で 2 種類、高雄で 4 種類のサブタイプが同定された。それぞれのサブタイプを Ad8A Ad8B Ad8C Ad8D Ad8E Ad8F と命名した (Table 3). 制限酵素切断パターンとこれらのサブタイプをまとめると次の通りである。

1) *Pst*I 切断では、Ad8A~Ad8F 全て同一切断パターンを示した。

2) *Hind*III 切断では、Ad8A と Ad8B が同一の切断パターンで、Ad8C~Ad8F が同一切断パターンを示し両者の切断パターンは異なる。

3) *Bam*HI 切断では、Ad8A, Ad8B, Ad8E が同一切断パターンを示し、Ad8C, Ad8D, Ad8F が同一切断パターンを示し両者は異なる。つまり *Bam*HI 切断によってのみ、Ad8D と Ad8E とを区別できる。

**Table 3** Subtypes of Ad8 isolates recovered in Sapporo and Kaohsiung.

Sapporo			Kaohsiung			
Ad8 A	Ad8 B		Ad8 C	Ad8 D	Ad8 E	Ad8 F
75-10	76-88	80-157	81-009	81-282	81-330	81-318
75-11	76-90	80-172	80-350	81-460	81-420	81-468
75-12	77-85	80-190	80-375		81-425	81-272
75-74	77-110	80-118	81-034		81-248	
76-71	77-111	80-251	81-400		81-476	
77-134	79-19	80-428	81-418		81-286	
78-41	79-119	80-504	81-428			
78-60	79-127	81-120	81-264			
		81-150	81-268			

4) *Sa*I 切断では、Ad8B だけが他の Ad8A, Ad8C ~ Ad8F のサブタイプと異なる切断パターンを示し、本酵素による切断によって札幌株を2つの群に分けることができる。

5) *Sst*I 切断では、Ad8A, Ad8B, Ad8D, Ad8E が同一切断パターンを示し、Ad8C および Ad8F はそれぞれ異なる切断パターンを示した。本酵素による切断で、Ad8C と Ad8F を区別することができる。

以上のことより、札幌株と高雄株の間に同一のサブタイプは存在せず、札幌には Ad8A と Ad8B, 高雄には Ad8C, Ad8D, Ad8E, Ad8F の4種類のサブタイプが存在することが明らかになった。

### 3・4 札幌における7年間の分離株の解析

札幌において、1975年から1981年までの7年間に

**Table 4** Isolation of Ad8 subtypes, Ad8 A and Ad8 B.

year	Ad8 A	Ad8 B
1975	4 <sup>a)</sup>	0
1976	1	2
1977	1	3
1978	2	0
1979	0	3
1980	0	7
1981	0	2

a) Numbers indicate Ad8 isolates which were recovered in Sapporo from 1975 to 1981.

**Table 5** Isolation of Ad8 subtypes, Ad8 C-Ad8 F

year	Ad8 C	Ad8 D	Ad8 E	Ad8 F
1980	4 <sup>a)</sup>	0	0	0
1981	5	2	6	3

a) Numbers indicate Ad8 isolates which were recovered in Kaohsiung from 1980 to 1981.

ける Ad8 分離株の分離状況を Table 4 にまとめた。この表から明らかなように、Ad8A は1975年から1978年まで分離されており、その後分離されていない。Ad8B は、1976年以後分離されており、この結果より札幌において7年間に、Ad8A から Ad8B を主体とした流行に変化したことがわかる。

### 3・5 高雄における1980年から1981年の分離株の解析

高雄において、1980年から1981年の2年間の Ad8 分離株の分離状況を Table 5 にまとめた。高雄ではこの2年間、Ad8C が流行の主体を成しているが、その他に Ad8D, Ad8E, Ad8F の計4種類のサブタイプの流行が認められた。このことは、札幌において、1980年から1981年の2年間で Ad8B のみ分離されているのと同様のである。

## 4 考 察

ヒトアデノウイルスは、流行性角結膜炎、咽頭結膜熱、急性気道疾患、肺炎等の疾患を起こすことでよく知られている。従来、分離されたウイルスの型の同定には、中和反応と赤血球凝集阻止反応が用いられていたが、これらの方法では、同一血清型内の分離株間の鑑別が困難であった。最近、ウイルス性疾患の疫学的研究において、分子生物学的手法が採用されるようになり、同一血清型内の分離株間の差が鑑別できるようになった。なお、ウイルス DNA の精製は複雑であり、特殊な装置を必要とする面があったが、感染細胞 DNA<sup>13,14)</sup>を使用することで、迅速かつ簡便なものとなった。感染細胞 DNA の切断パターンによる解析法<sup>9)</sup>を用いて、札幌市および高雄市で分離された45株を解析した。5種類の制限酵素 *Pst* I, *Hind*III, *Bam*HI, *Sa*II, *Sst*I における切断パターンの解析によって、少なくとも札幌に2種類のサブタイプ、高雄に4種類のサブタイプ、計6種類のサブタイプが存在することが確認されたことは今回が初めてである。札幌株25株についてみると、Ad8A と Ad8B の2つのサブタイプの流行が認められるが、Table 4 に示したように、Ad8A は1975年から分離され1978年まで分離されており、それ以後分離されていない。Ad8B は1976年より分離されており、その後も分離されている。これらの結果より、札幌において1975年から1981年の7年間で、Ad8A から Ad8B への移行が認められ、今後 Ad8B が、EKC の流行の主流となることも考えられる。

高雄市における分離株20株を解析した結果1980年の分離株は Ad8C のみであり、1981年度株は Ad8C, Ad8D, Ad8E, Ad8F 共に分離されており、札幌株が

この2年間単一のサブタイプのみが分離されている事と対照的に、4つのサブタイプが混在していた。今後、これらの4つのサブタイプのうち、いずれか一つのサブタイプが主流になり得るのか、もしくは混在状態で流行するのかが興味あることである。

以上のことから、Ad8 分離株間には、経年的(札幌：1975年～1981年)、地域的(札幌：高雄)な差があることが確認され、今後、韓国の分離株および札幌での1982年から1983年の分離株の解析を行なう予定である。

## 5 結 語

ヒトアデノウイルス 8 型分離株 45 株(札幌 25 株、高雄 20 株)の解析を行ない、以下の結果を得た。

1) Ad8 分離株には、5 種類の制限酵素 *Pst*I, *Hind*III, *Bam*HI, *Sal*I, *Sst*I を用いる限り少なくとも 6 種類のサブタイプ Ad8A～Ad8F が存在することが確認された。

2) Ad8 分離株のサブタイプ間の差の比較検討を行なうために、Ad8B を基準を定め、その一株である 79-119 株の DNA 分子量を算出し、 $22.7 \times 10^6$  ダルトンの数値を得た。

3) Ad8 分離株の分離状況において、札幌で 1975 年から 1981 年までの 7 年間に Ad8A から Ad8B への移行が認められ、1980 年から 1981 年までは Ad8B のみ分離された。高雄市ではこの 2 年間に、Ad8C～Ad8F の 4 つのサブタイプが混在し流行していた。これは同一時間における札幌での流行が Ad8B のみであるのと対照的である。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲をいただきました札幌医科大学癌研分子生物学部門、藤永蕙教授、同内科学第 3 講座、鈴木明教授ならびに北海道大学医学部公衆衛生学教室、中園直樹博士、石井慶蔵教授に深く謝意を表します。

## 文 献

1. Wadell, G., Varsanyi, T. M.: Demonstration of three different subtypes of adenovirus type 7 by DNA restriction site mapping. *Infect. Immun.* **21**, 238-246 (1978).
2. Wadell, G., de Jong, J. C., Walonitis S.: Molecular epidemiology of adenoviruses: alternating appearance of two different genome types of adenovirus 7 during epidemic outbreaks in Europe from 1958 to 1980. *Infect. Immun.* **34**, 368-372 (1981).
3. Wadell, G., deJong, J. C.: Restriction endonucleases in identification of a genome type of adenovirus 19 associated with keratoconjunctivitis. *Infect. Immun.* **27**, 292-296 (1980).
4. Wadell, G., Sundell, G., deJong, J. C.: Characterization of candidate adenovirus 37 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of virion polypeptides and DNA restriction mapping. *J. Med. Virol.* **7**, 119-125 (1981).
5. Aoki, K., Kato, M., Ohtsuka, H., Tokita, H., Obara, T., Nakazono, N., Sawada, H., and Ishii, K.: Clinical and etiological study of viral conjunctivitis 1974-1978, Sapporo, Japan. *Jpn. J. Ophthalmol.* **24**, 149-159 (1980).
6. Aoki, K., Kato, M., Ohtsuka, H., Ishii, K., Nakazono, N. and Sawada, H.: Clinical and aetiological study of adenoviral conjunctivitis, with special reference to adenovirus type 4 and 19 infections. *Br. J. Ophthalmol.* **66**, 776-780 (1982).
7. Aoki, K., Kato, M., Ohtsuka, H., Ishii, K., Nakazono, N., Chen, C. W., Lin, C. C.: Comparative studies on clinical and etiological features of viral conjunctivitis in Sapporo, Japan and Kaohsiung, R. O. C. *Acta Soc. Ophthalmol. Jpn.* **86**, 873-880 (1982).
8. Suzuki, N., Ueno, T., Yamashita, T., Fujinaga, K.: Grouping of Adenoviruses and Identification of Adenovirus and Identification of Restriction Endonucleases Cleavage Patterns of Adenovirus DNAs Using Infected Cell DNA: Simple and Practical Methods. *Microbiol. Immunol.* **25**, 1291-1301 (1981).
9. Blattner, F. R., Williams, B. G., Blechl, A. N., Denniston-Thompson, K., Faber, H., Furlong, L.-A., Grunwald, D. J., Kiefer, D. O., Moore, D. D., Schumm, J. W., Sheldon, E. L., Smithies, O.: Charon Phages: Safer Derivatives of Bacteriophage Lambda for DNA Cloning. *Science* **196**, 161-169 (1977).
10. Green, M. and Pina, M.: Biochemical studies on adenovirus multiplication. VI. Properties of highly purified tumorigenic human adenoviruses and their DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 1251-1259 (1964).
11. Green, M. and Pina, M.: Biochemical studies on adenovirus multiplication. IV. Isolation, purification, and chemical analysis of adenovirus. *Virology* **20**, 199-207 (1963).
12. Fujinaga, K., Rankin, A., Yamazaki, H., Sekikawa, K., Bragdon, J. and Green, M.: RD-114 Virus. Analysis of viral gene sequences in

- feline and human cells by DNA-DNA reassociation kinetics and RNA-DNA hybridization. *Virology* **56**, 484-495 (1973).
13. Fujinaga, K., Sawada, Y. and Uemizu, U.: A rapid screening for the specific DNA sequence. Analysis of transforming DNA segments Adenovirus-transformed cells. *Gann* **70**, 239-248 (1979).
  14. Lai, C. J. and Nathans, D.: Deletion mutants of simian virus 40 generated by enzymatic excision of DNA segments from the viral genome. *J. Mol. Biol.* **89**, 179-193 (1974).
  15. Sawada, Y., Honda, E., Yano, S. and Fujinaga, K.: Cleavage maps of highly oncogenic human adenovirus type 12 DNA with restriction endonucleases *Bam*HI, *Hind*III, *Sal*I and *Sma*I. *Tumor Res.* **15**, 35-43 (1980).
  16. Mulder, C., Arrand, J. R., Keller, U., Petersson, U., Roberts, R. J. and Sharp, P. A.: Cleavage maps of DNA from adenovirus types 2 and 5 by restriction endonucleases *Eco*RI and *Hpa*I. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **39**, 397-400 (1974).
- 

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第3講座 藤井伸一