

感染細胞 DNA の制限酵素切断によるアデノウイルス同定

第1報 Ethidium Bromide 染色

鈴木 信 敬 上野 哲 治

札幌医科大学眼科学講座 (主任 田川貞嗣 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)

Identification of Adenoviruses by Cleavage Patterns with Restriction Endonucleases using Infected Cell DNAs

I. Ethidium Bromide Staining

Nobutaka SUZUKI Tetsuji UENO

Department of Ophthalmology, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. S. Tagawa)

Toshiharu YAMASHITA

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

(Chief : Prof. K. Fujinaga)

The identification of adenoviruses by cleavage patterns with restriction endonucleases was presented. The results obtained are as follows;

1) Adenovirus type 7 (Ad7) (strain Grider) DNA and infected cell DNA were cleaved with restriction endonuclease *Hind*III, *Bam*HI, *Sal*I and *Eco*RI, and fractionated by agarose gel electrophoresis. Cleavage patterns of adenovirus DNA could be clearly observed in the presence of infected cell DNAs.

2) *Sal*I, *Hind*III and *Eco*RI cleavage patterns of Ad7 (strain Grider) DNA were identical with or very similar to those of Ad7 (strain Gomen) DNA but the differences among these DNAs were found clearly when *Bam*HI was used for cleavage.

3) Cleavage patterns of Ad3 (strain G.B) and Ad7 (strain Grider) infected cell DNAs with *Hind*III, *Bam*HI, *Sal*I and *Eco*RI were studied. By cleavage with *Bam*HI, we could distinguish between Ad3 and Ad7 DNAs. And each DNA from adenoviruses group A (Ad12 and Ad31), B (Ad3 and Ad7), C (Ad2 and Ad5), D (Ad9 and Ad13) and E (Ad4) had a specific cleavage pattern with *Bam*HI, distinguishable from each other.

These results indicate that we can identify adenovirus strains by the cleavage patterns with one or few suitable restriction endonucleases using DNA from a small amount of infected cells.

(Received July 25, 1981 and accepted August 31, 1981)

1 緒 言

ヒトマデノウイルスは現在 36 の血清型の分離の報告があり、¹⁻⁵⁾ そのうち 31 の型が一般に確認されている。¹⁾ アデノウイルス (Ad) の同定に関しては、補体結合反応

および蛍光抗体法がアデノウイルス共通の抗原を検出する目的で用いられ、一方、赤血球凝集抑制反応および中和反応が型別の決定に用いられている。しかしながら、赤血球凝集抑制反応および中和反応による同定においては、型間で交差反応を示す場合があること。^{2,6-13)}

また両方法による同定結果の不一致の例¹⁰⁾など正確な型決定は時として困難である。さらに同一血清型内の strain 間の鑑別同定が不可能なため、血清学的同定法だけでは正確な流行伝播の調査は難しい。

近年、遺伝子 DNA の解析に制限酵素切断法が導入され DNA 型ウイルス遺伝子の研究が著しく進んだ¹⁴⁾我々は、制限酵素切断法をアデノウイルスの同定に利用することを試みた結果、感染細胞 DNA を制限酵素切断パターンによって検討する正確かつ容易な同定法を確立したので報告する。

2 実験材料および実験方法

2.1 ウィルス

アデノウイルス各群¹⁵⁾から選び、次の株を実験に用いた。A 群 [Ad12 (Huie), Ad31 (1315)], B 群 [Ad3 (G.B), Ad7 (Grider)], C 群 [Ad2 (38-2), Ad5 (Adenoid 75)], D 群 [Ad9 (Hicks), Ad13 (A.A)], E 群 [Ad4 (RI-67)].

2.2 ウィルス感染細胞

KB 細胞を直径 3 cm のシャーレ又はルービン(底面積 160 cm²) に 5% 仔牛血清を含む Eagle's minimum essential medium (MEM) で単層培養し、アデノウイルスを MOI (multiplicity of infection) 1-10 PFU (plaque-forming units)/cell で接種し、明瞭な細胞変性効果を見るまで 37°C で培養した。

2.3 ウィルス DNA の精製

Green and Pina の方法^{16,17)}に基づき、ウィルス感染細胞を破壊、有機溶媒で細胞由来蛋白を変性除去し、塩化セシウム密度勾配平衡遠心により、ウィルス粒子を精製し、フェノール法でウィルス DNA の抽出精製を行なった。

2.4 感染細胞 DNA の精製

既報^{18,19)}に従って、ウィ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、フェノール法で除蛋白を行ない核酸を抽出した。さらにエタノール沈殿後、RNase 処理し、再度 pronase 処理およびフェノール抽出を行なって感染細胞 DNA を抽出精製した。

2.5 制限酵素

EcoRI, *BamHI* は Boeringer-Manheim 社, *SalI* は New England Biolabs より購入した。*HindIII* は *Hemophilus influenzae* Rd 株より Lei and Nathans²⁰⁾ の方法で精製した。

2.6 制限酵素によるウィルス DNA の切断とアガロースゲル電気泳動法による生成フラグメントの分離

基本的には、Sekikawa and Fujinaga²¹⁾の方法によった。感染細胞 DNA 1 μg に対し 1 単位の制限酵素を加え、37°C で 3-5 時間反応させた。反応混液の総量は 20-70 μl で、用いた反作用緩衝液は以下の通りである。*BamHI* [6 mM Tris-HCl (pH7.5), 6 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 6 mM 2-mercaptoethanol], *SalI* [50 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM MgCl₂], *HindIII* [20 mM Tris-HCl (pH7.4), 7 mM MgCl₂, 60 mM NaCl, 2 mM 2-mercaptoethanol], *EcoRI* [100 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl]. 反応終了後、反応混液を 1.4% アガロース平板ゲル (0.2×16×22 cm) を用いて、泳動用緩衝液 [36 mM Tris-HCl (pH8.1) 32 mM KH₂PO₄, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA)] 中で 13 時間 50 V 電気泳動を行ない、ethidium bromide (0.5 μg/ml) で 15 分間染色し、紫外線照射の下で切断パターンの観察、写真撮影を行なった。

3 実験成績

3.1 感染 KB 細胞 DNA の制限酵素切断パターン

直径 3 cm のシャーレに培養した KB 細胞(細胞数約 1.5×10⁶個) に Ad7 を接種し、3 日後感染 KB 細胞 DNA をすなわち細胞 DNA とウィルス DNA を分離することなく抽出し、各種制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動で調べたところ、Fig. 1-a に示す切断パターンが得られた。ウィルス DNA の制限酵素切断パターンは、細胞 DNA の存在で影響を受けることなく精製ウィルス DNA を用いた場合 (Fig. 1-b) と同一であった。このことは、ウィルス DNA の抽出精製を行なわなくても、感染細胞より調製した細胞 DNA を用いてウィルス DNA の制限酵素切断パターンが検討できることを示している。

3.2 Ad7 (strain Grider) DNA の制限酵素切断パターンを得るための感染細胞数

MOI 2 PFU/cell で Ad7 を接種してえられた感染細胞 DNA の量を変え、各制限酵素を用いて切断パターンを調べたところ *SalI*, *HindIII*, *EcoRI*, *BamHI* では各々 0.4 μg, 4 μg, 2 μg, 8-10 μg 以上の DNA 量で明瞭な制限酵素切断パターンが認められた。

Fig. 2 に Ad7 DNA および Ad7 感染細胞 DNA の量を変えた *HindIII* 切断パターンを例示し、これらに要する感染細胞数を算出、比較した。図に示されるように Ad7 DNA の場合 0.4 μg, Ad7 感染細胞 DNA の場合 4 μg 以上で明瞭な制限酵素 *HindIII* 切断パター

ンが認められた。本実験では直径 3 cm のシャーレに KB 細胞を単層培養し (細胞数約 1.5×10^6 個), Ad 7 を接種, これより感染細胞 DNA が約 $55 \mu\text{g}$ 抽出されたので, 感染細胞 DNA $4 \mu\text{g}$ は 1.1×10^5 個の感染細胞より

得られたことになる。一方, ウイルス DNA は, ルービン 5 本 (細胞数約 1.5×10^8 個) に Ad 7 を接種してこれより Ad 7 DNA 約 $250 \mu\text{g}$ が抽出されたので, ウイルス DNA $0.4 \mu\text{g}$ は 2.4×10^5 個の感染細胞より得られた

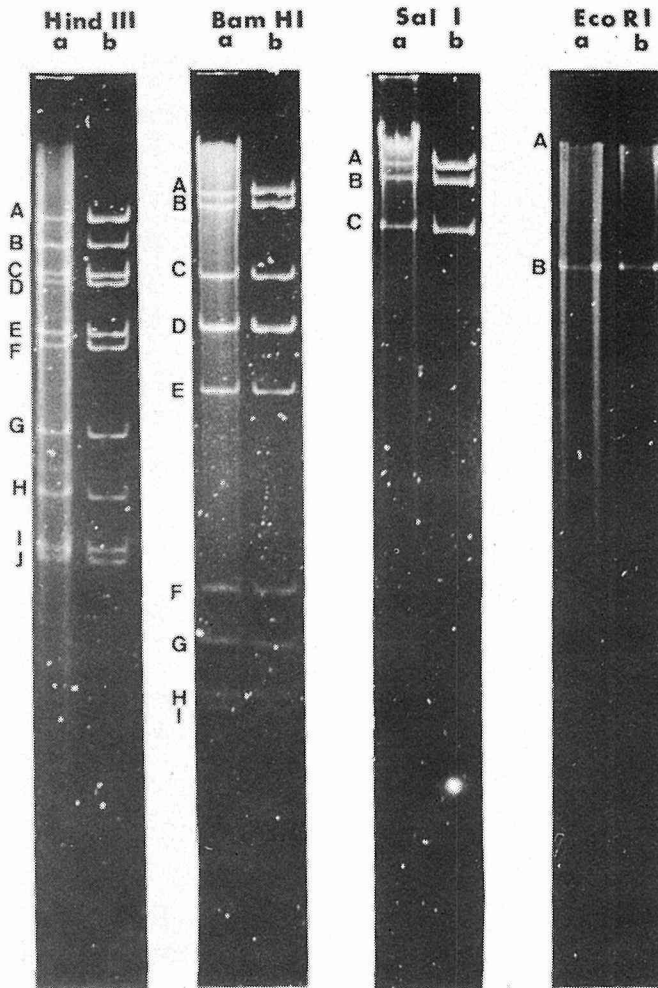


Fig. 1 Cleavage patterns of Ad7 (strain Grider) DNA and infected cell DNA with restriction endonucleases. Ad7 DNA ($1 \mu\text{g}$) and infected cell DNA ($10 \mu\text{g}$) were cleaved with *Hind*III, *Bam*HI, *Sal*I and *Eco*RI. The digestion products were electrophoresed in a 1.4% agarose slab gel ($0.2 \times 16 \times 22\text{cm}$) at 50V for 13 hrs. After electrophoresis, the gel was immersed in ethidium bromide ($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 15 min. The gel was photographed under UV light. Slot a : Ad7-infected cell DNA. Slot b : Ad7 DNA.

ことになる。しかしながら実際には、 $8\mu\text{g}$ 以上の Ad7 DNA が得られる程度のウイルス粒子がなければ、ウイルス精製のための塩化セシウム密度勾配においてその粒子バンドを見出すことが難しいので、Ad7 DNA を

精製ウイルス粒子から得るためには少なくとも 4.8×10^6 個の感染細胞が必要である。従って制限酵素 *Hind*III 切断パターンを検討する場合、精製ウイルス粒子より抽出したウイルス DNA の代わりに感染細胞 DNA を用

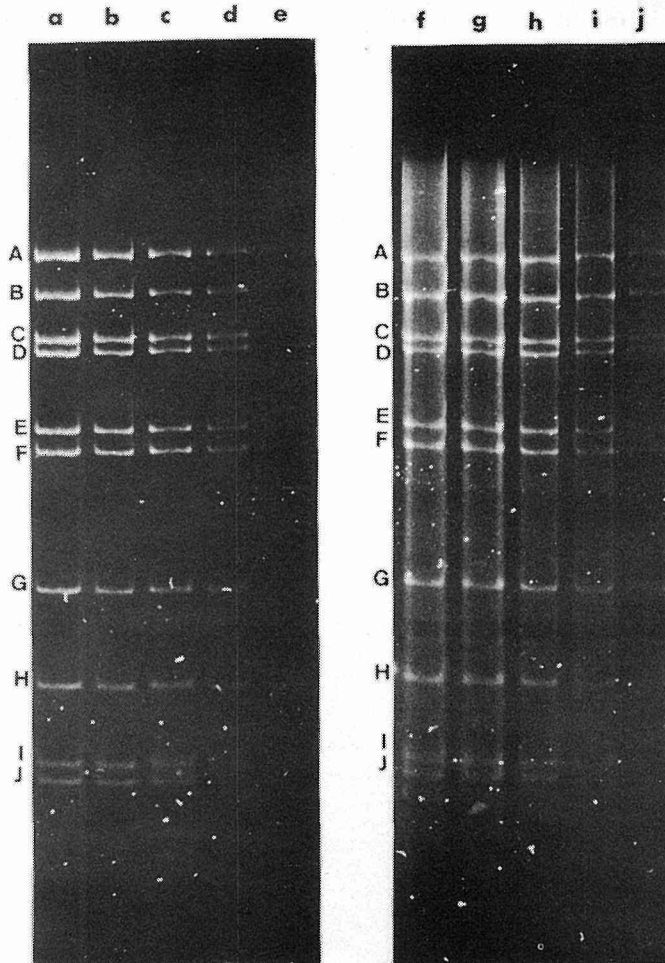


Fig 2 Cleavage patterns of various amounts of Ad7 (strain Grider) DNA and infected cell DNA with *Hind*III. Various amounts of Ad7 DNA and infected cell DNA were cleaved with *Hind*III and the digestion products were electrophoresed as described in the legend for Fig. 1.

Ad7 DNA : $1.0\mu\text{g}$ (a), $0.8\mu\text{g}$ (b), $0.6\mu\text{g}$ (c), $0.4\mu\text{g}$ (d), $0.2\mu\text{g}$ (e)

Ad7-infected cell DNA : $10\mu\text{g}$ (f), $8\mu\text{g}$ (g), $6\mu\text{g}$ (h), $4\mu\text{g}$ (i), $2\mu\text{g}$ (j)

いることによって、要する感染細胞数は概ね 1/40 以下になる。

3.3 アデノウイルス各型の各種制限酵素切断パターン

前述の実験で感染細胞 DNA を用いてウイルス DNA の制限酵素切断パターンを検討できることが明らかになったので、本方法を用いて Ad 3 (strain G.B) DNA および Ad 7 (strain Grider) DNA の各種制限酵素切

断パターンを検討し判別に都合の良い制限酵素の選択を行なった (Fig. 3). *Hind*III, *Sal*I および *Eco*RI を用いた場合 Ad 3 DNA と Ad 7 DNA は同一ないし酷似した切断パターンを示した。これはこの両者が B 群に属し DNA-DNA ホモロジーが高い¹⁵⁾ことによる。一方, *Bam*HI を用いることにより、両者は明確に判別できた。Fig. 4 にアデノウイルス各型 DNA の *Bam*HI 切

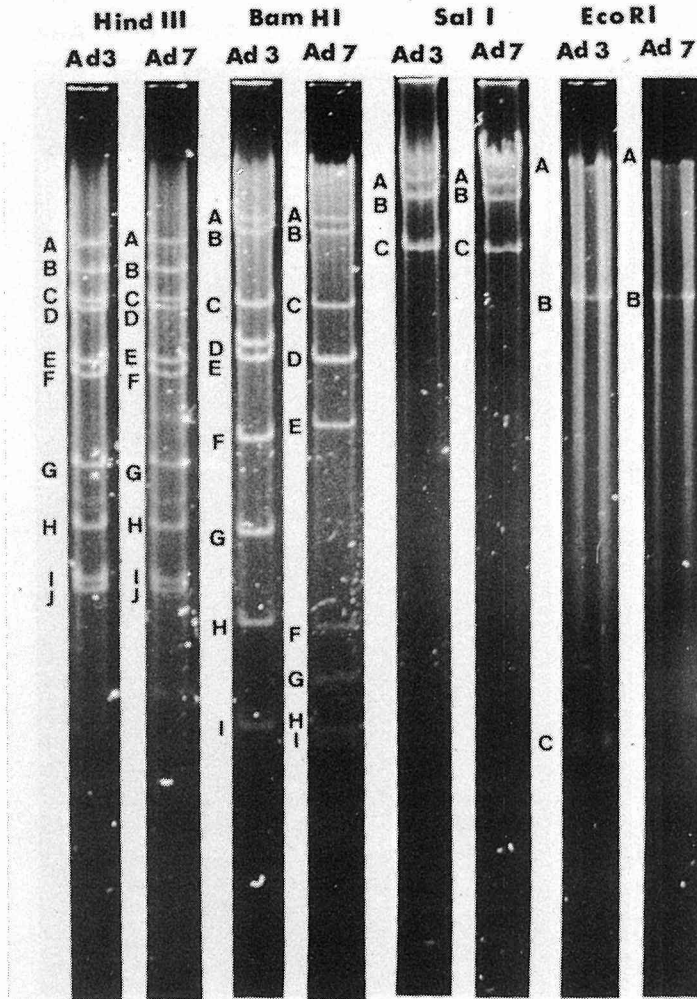


Fig. 3 Cleavage patterns of Ad3 (strain G.B)- and Ad7 (strain Grider)-infected cell DNAs with *Hind*III, *Bam*HI, *Sal*I and *Eco*RI. Ad3- and Ad7- infected cell DNAs (10 μ g) were cleaved with restriction endonucleases and the digestion products were electrophoresed as described in the legend for Fig. 1.

断パターンを示した。Ad 12で9本、Ad 31で11本、Ad 3で9本、Ad 7で9本、Ad 2で4本、Ad 5で2本、Ad 9で4本、Ad 13で4本、Ad 4で8本のウイルスDNAのバンドが、それぞれ得られた。尚、明瞭な *Bam*HI 切断パターンをうるためには0.04 μ g(Ad 5 感染細胞 DNA)-14 μ g(Ad 31 感染細胞 DNA)のDNA量が必要であった。

次に、Ad 7 DNAの *Eco*RI フラグメント²¹⁾、Ad 12 DNAの *Hind*III フラグメント²²⁾およびAd 2 DNAの *Bam*HI フラグメント²³⁾を基準として、相対移動度と分子量の関係(Fig. 5)から各型DNAのフラグメントの分子量を算出し、Table 1にまとめた。これよりえられた各型DNAの分子量は21.3-23.2 $\times 10^6$ daltonとなった。このように、各型により特異的な制限酵素切断パ

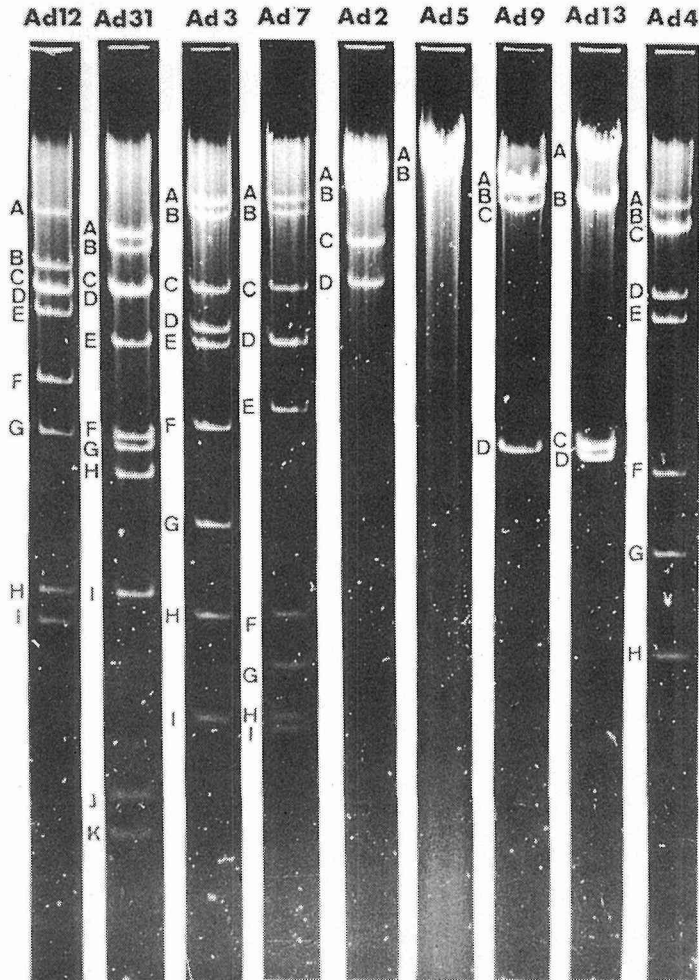


Fig. 4 Cleavage patterns of adenovirus-infected cell DNAs with *Bam*HI. Adenovirus-infected cell DNAs (10-14 μ g) were cleaved with *Bam*HI and the digestion products were electrophoresed as described in the legend for Fig. 1.

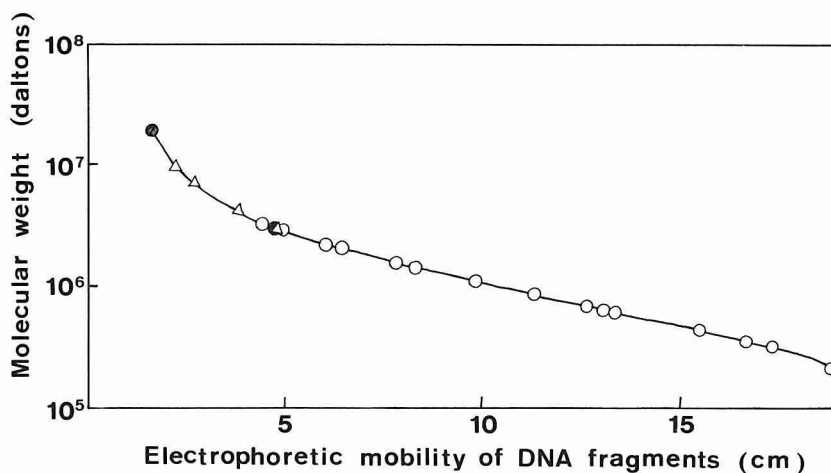


Fig. 5 Relationship between molecular weight and electrophoretic mobility of Ad12 *Hind*III, Ad7 *Eco*RI and Ad2 *Bam*HI fragments.

○ : Ad12 *Hind*III fragments;²²⁾ ● : Ad7 *Eco*RI fragments;²¹⁾
 △ : Ad2 *Bam*HI fragments;²³⁾

Table 1 Molecular weights of the *Bam*HI fragments of adenovirus DNA_s^a

Fragments	Ad 12	Ad 31	Ad 3	Ad 7	Ad 2	Ad 5	Ad 9	Ad 13	Ad 4
A	5.2	4.3	6.2	6.2	9.4	13.6	8.1	13.8	5.8
B	3.3	3.8	5.5	5.6	6.7	9.4	6.7	5.8	4.7
C	2.8	2.9	2.9	2.9	4.2		5.7	1.4	4.6
D	2.8	2.8	2.4	2.2 ^b	2.7		1.4	1.3	2.7
E	2.6	2.1	2.3	1.7					2.4
F	1.9	1.4	1.5	0.8					1.2
G	1.5	1.3	1.1	0.6					1.0
H	0.8	1.2	0.8	0.5					0.6
I	0.7	0.8	0.5	0.5					
J		0.4							
K		0.3							
Total	21.6	21.3	23.2	23.2	23.0	23.0	21.9	22.3	23.0

(X 10⁶ daltons)

^a Molecular weights of the fragments of each serotype DNA except Ad2 were estimated from their electrophoretic mobility using Ad12 *Hind*III, Ad7 *Eco*RI and Ad2 *Bam*HI fragments as size markers (Fig. 5).

^b doublet

ターンが得られ型別にも利用できることがわかる。

4 考 察

アデノウイルスは、咽頭結膜熱、急性気道疾患、肺炎、流行性角結膜炎等の疾患を起こす。従来、分離ウイルスの型別同定には赤血球凝集抑制反応および中和反応が用いられているが、前述のように、共に正確な型決定に困難が伴う場合があり、^{2,6-13)} また各型の抗血清を

準備しなければならず、実用的診断法として必ずしも簡便でない。またこれらの血清学的方法では同一血清型内の strain 間の鑑別が不可能である。

31 の型を含むヒトアデノウイルスは、ウイルス DNA の塩基配列のホモロジーから、A-E群に分類されている。¹⁵⁾ 同一群に属するウイルス DNA の DNA-DNA ホモロジーは 48-69% (A 群) から 99-100% (C 群) であるが異群間のウイルス DNA では 4-23% にすぎない。

ウイルス DNA のホモロジーによる分類は、ウイルス遺伝情報の表現型である赤血球凝集反応による分類や、物理的、化学的、生物学的性質の異同と高い類似性を示す¹⁵⁾

そこで我々は、特異的に 4-6 塩基対を認識して 2 本鎖 DNA を切断する制限酵素を用いてウイルス遺伝子 DNA を直接解析することによる簡便なアデノウイルス同定法を検討した。本研究では、咽頭結膜熱の主因である Ad 3 および Ad 7²⁴⁾ を中心に同定法の検討を行なった。制限酵素は、アデノウイルス DNA を分析可能な数の特異的フラグメントに切断する 6 塩基対認識の酵素の中から *HindIII*, *BamHI*, *SalI* および *EcoRI* を選んで用いた。既報^{21,25,26)}のごとく本実験で得られた Ad 7 (strain Grider) DNA の制限酵素切断パターンを同一血清型である strain Gomen の場合と比較すると、*SalI* 切断パターンは完全に同一であり、また *HindIII*, *EcoRI* 切断パターンは酷似しているが、*BamHI* 切断パターンによって二つの strain 間の違いが明確に区別される。このように、適当な酵素を用いることによって同一血清型内の strain 間の鑑別同定が可能であることがわかる。また B 群に属する Ad 3 (strain G.B) および Ad 7 (strain Gomen) DNA は 10 種の制限酵素による切断部位のうち 52 箇所が一致しており、14 箇所の切断部位がいずれか一方のみ認められる²⁶⁾ が、本報告に明らかなごとく *BamHI* を用いることにより Ad 3 (strain G.B) と Ad 7 (strain Grider) 間も明確に判別できる。

従来より、ウイルス遺伝子 DNA の制限酵素切断パターンの検討には、精製ウイルス DNA が用いられてきた。しかしながら、ウイルス DNA の調製のためには、精製ウイルス粒子を出発材料とするため、多量の感染細胞と労力、時間が必要である。最近、Wadell and De Jong²⁷⁾ は Hirt 法²⁸⁾ によって感染細胞からウイルス DNA を濃縮し Ad 19 の制限酵素切断パターンを検討した。しかし、ウイルス DNA の濃縮は必ずしも必要ではなく、我々は、ウイルス粒子精製を行わず、感染細胞からウイルス DNA と細胞 DNA を分離せずに抽出し、この制限酵素切断パターンを調べた。MOI 1-10 PFU/cell でウイルスを接種した感染細胞から得られた感染細胞 DNA を用いても、細胞 DNA に影響されることなくウイルス DNA の制限酵素切断パターンが得られ、またこのとき必要な感染細胞数は直径 3 cm のシャーレに培養された KB 細胞の 1/4 程度あるいはそれ以下で良いことがわかった。感染細胞 DNA の抽出は、操作が簡便で短時日に行なうことが可能であり、また感染細胞数

の多少にかかわらずこれに応じた DNA の収量が安定して得られるという利点を有している。

このように本法は多数の検体を容易に詳しく分析することが可能であり、血清学的同定法との併用によって流行 strain の同定および流行伝播の正確な把握等に大きな力を発揮するものと考えられる。さらに本法に Southern blot hybridization²⁹⁾ を利用することによりウイルス DNA の検出感度は飛躍的に向上し、極く少量の感染細胞を用いても、また低い感染価を示すウイルスの場合でも頻回の継代によるウイルスの増殖をはかることなくウイルス DNA の制限酵素切断パターンの検討が可能になると考えられ、現在実験をすすめている。

5 結 語

制限酵素切断パターンによるアデノウイルス同定法を検討した結果、以下の成績を得た。

- 1) Ad 7 (strain Grider) DNA および感染細胞 DNA の制限酵素 *SalI*, *HindIII*, *BamHI* および *EcoRI* 切断パターンを比較した結果、アデノウイルス感染細胞 DNA を用いた場合もウイルス DNA の制限酵素切断パターンを調べることができた。
- 2) Ad 7 (strain Grider) DNA の各制限酵素切断パターンを検討した結果、*SalI*, *HindIII* および *EcoRI* 切断パターンは同一血清型である strain Gomen の場合と同一もしくは酷似しているが、*BamHI* を用いることによって二つの strain 間の差異が明確に検出されることが確められた。
- 3) Ad 3 (strain G.B) および Ad 7 (strain Grider) 感染細胞 DNA の制限酵素切断パターンを *HindIII*, *BamHI*, *SalI* および *EcoRI* について検討し、判別に適当な制限酵素の選択を行なった。その結果、*BamHI* を用いることによって A 群 (Ad 12, Ad 31), B 群 (Ad 3, Ad 7), C 群 (Ad 2, Ad 5), D 群 (Ad 9, Ad 13), E 群 (Ad 4) の各型とも判別可能な制限酵素切断パターンが得られた。

これらのことから、感染細胞 DNA の制限酵素切断パターン検討することにより、比較的容易に、少量の細胞を用いてアデノウイルス strain の同定が可能であることが判明した。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただいた藤永蕙教授、田川貞嗣教授に深く謝意を表します。

尚、本研究の一部は、文部省科学研究助成金(藤永)により行なわれた。

文 献

1. Wold, W. S. M., Green, M. and Büttner, W. : Adenoviruses. In : Nayak, D. P. (ed.), *The Molecular Biology of Animal Viruses*, 673-768. Marcel Dekker, New York (1978).
2. Blacklow, N. R., Hoggan, M. D., Austin, J. B. and Rowe, W. P. : Observation on two new adenovirus serotypes with unusual antigenic characteristics. *Am. J. Epidemiol.* **90**, 501-505 (1969).
3. Hierholzer, J. C., Atuk, N. O. and Gwaltney, J. M., Jr. : New human adenovirus isolated from a renal transplant recipient: Description and characterization of candidate adenovirus type 34. *J. Clin. Microbiol.* **1**, 366-376 (1975).
4. Stalder, H., Hierholzer, J. C. and Poxman, M. N. : New human adenovirus (candidate adenovirus type 35) causing fatal disseminated infection in a renal transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* **6**, 257-265 (1977).
5. Wigand, R., Gelderblom, H. and Wadell, G. : New human adenovirus (candidate adenovirus 36), a novel member of subgroup D. *Arch. Virol.* **64**, 225-233 (1980).
6. Rowe, W. P., Hartley, J. W. and Huebner R. J. : Additional serotypes of the APC virus group. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **91**, 260-262 (1956).
7. Rowe, W. P., Hartley, J. W. and Huebner, R. J. : Serotype composition of the adenovirus group. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **97**, 465-470 (1958).
8. Uchida, S., Hoshika, T., Yamamoto, H., Koike, K., Koseki, S. and Furuno, A. : Relationships between types of adenovirus indicated by heterologous neutralization. *Jap. J. Exp. Med.* **29**, 121-129 (1959).
9. Rosen, L. : A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses. *Am. J. Hyg.* **71**, 120-128 (1960).
10. Rosen, L. : Hemagglutination-inhibition antibody responses in human adenovirus infection. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **108**, 474-479 (1961).
11. Rafajko, R. R. : Production and standardization of adenovirus types 1 to 18 reference antisera. *Am. J. Hyg.* **79**, 310-319 (1964).
12. Lucas, J. B., Johnston, J. G., Kaye, H. S., Bucca, M. A. and Robinson, R. Q. : Production of adenovirus antisera in horses. *Public Health Rep.* **80**, 647-652 (1965).
13. Stevens, D. A., Schaeffer, M., Fox, J. P., Brandt, C. D. and Romano, M. : Standardization and centrifugation of reference antigens and antisera for 30 human adenovirus serotypes. *Am. J. Epidemiol.* **86**, 617-633 (1967).
14. Nathans, D. and Smith, H. O. : Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann. Rev. Biochem.* **44**, 273-293 (1975).
15. Green, M., Mackey, J. K., Wold, W. S. M. and Rigden, P. : Thirty-one human adenovirus serotypes (Ad1-Ad31) form five groups (A-E) based upon DNA genome homology. *Virology* **93**, 481-492 (1979).
16. 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).
17. Green, M. and Pina, M. : Biochemical studies on adenovirus multiplication. IV. Isolation, purification, and chemical analysis of adenovirus. *Virology* **20**, 199-207 (1963).
18. 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).
19. Fujinaga, K., Sawada, Y. and Uemizu, U. : A rapid screening for the specific DNA sequence. Analysis of transforming DNA segments in adenovirus-transformed cells. *Gann* **70**, 239-243 (1979).
20. 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).
21. Sekikawa, K. and Fujinaga, K. : Cleavage maps of human adenovirus type 7 DNA by restriction endonuclease *HindIII* and *EcoRI*. *Virology* **82**, 509-512 (1977).
22. Sawada, Y., Honda, E., Yano, S. and Fujinaga, K. : Cleavage maps of highly oncogenic human adenovirus type 12 DNA with restriction endonucleases *BamHI*, *HindIII*, *SalI* and *SmaI*. *Tumor Res.* **15**, 35-43 (1980).
23. Flint, S. J., Berget, S. M. and Sharp, P. A. : Adenovirus transcription. III. Mapping of viral RNA sequences in cells productively infected by adenovirus. *Virology* **72**, 443-455 (1976).
24. Ginsberg, H. S. : Adenoviruses. *Am. J. Clin. Pathol.* **57**, 771-776 (1972).

25. Yoshida, K., Sekikawa, K. and Fujinaga, K.: Cleavage maps of weakly oncogenic human adenovirus type 7 DNA by restriction endonuclease *Bam*HI, and *Sal*I. *Tumor Res.* **13**, 14-19 (1979).
26. Tibbetts, C.: Physical organization of subgroup B human adenovirus genomes. *J. Virol.* **24**, 564-579 (1977).
27. Wadell, G. and De Jong, J. C.: Restriction endonuclease in identification of a genome type of adenovirus 19 associated with keratoconjunctivitis. *Infect. Immun.* **27**, 292-296 (1980).
28. Hirt, B.: Selective extraction of polyoma DNA from infectiton mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* **26**, 365-369 (1967).
29. Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517 (1975).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学眼科学講座 鈴木信敬