

Counter-immunoelectro-osmophoresis を用いたレオウイルス 様因子に対する血清沈降抗体の検出 およびその疫学的意義

浦沢 价子 秋葉 澄伯

谷口 孝喜 石沢 文彦

(札幌医科大学衛生学講座 主任 浦沢教授)

千葉 峻 三

(札幌医科大学小児科学教室 主任 中尾教授)

Detection of Serum Precipitating Antibody Against Human Reovirus-like Agent as Demonstrated by Counter-immunoelectro-osmophoresis and its Significance in Epidemiologic Studies

Tomoko URASAWA, Suminori AKIBA, Koki TANIGUCHI
and Fumihiko ISHIZAWA

Department of Hygiene and Epidemiology, Sapporo Medical College
(Chief: Prof. S. Urasawa)

Shunzo CHIBA

Department of Pediatrics Sapporo Medical College
(Chief: Prof. T. Nakao)

Human reovirus-like agent (HRLA) has recently been recognized as one of the causative agents of acute nonbacterial gastroenteritis in infants and children. The present report deals with a comparison of sensitivity of two different tests to detect antibody against this agent. The results obtained are as follows:

1. When sera from patients with this disease and their siblings were examined, the results of CF test using human reovirus-like agent as the antigen (HRLA-CF) closely agreed with those of CF test using neonatal calf diarrhea virus as the antigen (NCDV-CF); further, the presence of serum precipitating antibody to NCDV (NCDV-PT), which was detectable by counter-immunoelectro-osmophoresis developed by Middleton *et al*⁶⁾, strongly correlated with the presence of HRLA-CF antibody ($P < 10^{-8}$ by Fisher exact test).

2. In general, it was found that when sera obtained shortly after the infection were examined, antibody-positive rate by NCDV-PT test was higher than that by NCDV-CF test; on the other hand, when sera collected from persons who had contracted the disease in the remote past were tested, NCDV-PT test was found to be inferior to NCDV-CF test in the ability to detect the waning antibody.

(Received October 7, 1977 and accepted December 12, 1977)

I. 緒 言

多年ウイルス性疾患と考えられながらウイルス学的に病原体が確認されずに来た急性非細菌性胃腸炎の中で乳幼児の嘔吐下痢症は、Bishop ら^{1,2)} が電顕的に検出したヒトレオウイルス様因子 (human reovirus-like agent=HRLA) により起ることが多くの研究により確認された³⁻⁵⁾。糞便

その他の材料中の本ウイルスの存在を確認する方法としては *in vitro* の増殖系が見出されていないため電顕による直接的検出によらざるを得なかったが、最近 Middleton ら⁶⁾、Grauballe ら⁷⁾ は本ウイルス感染の迅速診断に counter-immunoelectro-osmophoresis (CIEOP) を応用し、ウイルスの検出および血清中の抗体検出を試みている。そしてウイルスの検出率は電顕に優る⁷⁾ か或いはやや

劣る程度であるが⁶⁾、抗体検出感度はCF法よりかなり劣る事⁶⁾を報告した。

現在本症の診断のための血清反応にはCF反応が最も広く用いられているが、本法の抗原に患者糞便中のウイルスを精製して使用している現状では、その量におのずから制限があり、広範囲の血清反応用の大量の抗原を用意することはかなり難しい。そこでこのヒトレオウイルス様因子と類似の形態、性状及び共通抗原を有するウシレオウイルス様因子 (Neonatal calf diarrhea virus=NCDV) が前者の代用抗原としてCF, FA, HIの各反応に用いられている。しかしながらHRLAとNCDVを用いた血清抗体価の比較検討が不十分なために、血清疫学的サーベイにNCDVを利用した報告はKapikianら⁸⁾、Blacklowら⁹⁾の報告以外見るべきものはない。

われわれは疫学的観点から乳幼児を含むより広い年齢層に本ウイルスが感染・伝播している可能性を考えて検討して来たが、本報では従来本症の診断に最も広く用いられているHRLAに対する血清中CF抗体とNCDVに対するCF、沈降抗体の比較を行い、血清中の沈降抗体の疫学的意義について考察を加えた。

II. 実験材料と方法

ウイルス: ウシレオウイルス様因子(NCDV)は家畜衛生試験所児玉道博士より分与を受けた。NCDVの増殖にはLLCMK₂細胞を用い、その感染価を高めるために維持培地(Eagle MEM, 血清無添加)に低濃度のトリプシン(1:250 Difco, 1.0 µg/ml)を加えた。ストックウイルス接種後24時間以内に完全なCPEを認めた。

ヒトレオウイルス様因子(HRLA)は臨床的に急性非細菌性胃腸炎と診断された乳児の糞便をBishopら²⁾の方法により一部精製し、電顕的にウイルス粒子の存在を確認して材料とした。

CF反応: NCDV-CF抗原は上記の細胞培養で増殖したウイルスを用いて、Kapikianら⁸⁾の方法に準じて作成し、HRLA-CF抗原は上記の部分精製ウイルスをそのまま反応に使用した。NCDVの場合通常100倍濃縮抗原ではほぼ64~128単位のCF抗原価を示した。CF反応には抗NCDV血清(後記)を用いて測定して16~32単位(ヒト回復期血清を用いて測定すると2~4倍程度低くなる傾向が認められる)になるように抗原を希釈して用いた。HRLAのCF抗原は患者回復期血清を用いた測定ではほぼ4単位になるように希釈して用いた。反応はSever¹⁰⁾の方法に従いクック製のディスパーザブルマイクロプレートを用いて行った。

抗血清: 抗NCDV血清は、8羽の家兎の試験採血によ

り得た血清についてCF抗体価を測定し、抗体活性の最も低い兎を選び、Bishopら²⁾の方法により一部精製したNCDVを兎の耳静脈より約10日間隔で3回免疫し、最終免疫後10日目に全採血した。抗HRLA血清を作成するための抗原は、上記の如くBishopらの方法で患者糞便から部分精製して得たウイルスを1.1~1.6 g/cm³のCsCl密度勾配(3.6 cc)にのせて日立RPS55ローターで35,000回転、18時間遠心した。肉眼的に認められた2本のband(11分画中、上から5~6及び7~8分画に相当し、後者には電顕的にウイルス粒子を認めた)をプール、透析し、等量のFreund complete adjuvantと混合してモルモットのfood padに初回免疫した。その後、26日目に追加免疫して、更に2週後に全採血した。

Counter-immunoelectro-osmophoresis (CIEOP):

緩衝液はVeronal-HCl buffer (pH 8.6, $\mu=0.05$)を用いMiddletonら⁶⁾の方法に準じて行った。寒天ゲルは電気泳動用アガロースを上記buffer1容と蒸留水2容の混合液に1%の濃度に溶解し、2.5×7.5 cmのスライドガラス上に1 mmの厚さに流しゲル化させて作成した。それに成績のFig. 1に示すように陰極側に抗原を、陽極側に抗体を配置してImmunophor (LKB)を用い5.6 volt/cmで60分通電した。泳動したスライドは0.85% NaClで除蛋白後、Amidoblack 10Bで染色を行い、後5%酢酸で脱色して乾燥保存した。

電子顕微鏡(EM)によるウイルスの検出: 上記のBishopの方法で部分精製した糞便材料を3% potassium phosphotungstate (pH 7.0)によりネガティブ染色して、JEM 100Bを用いて観察した。

被検血清: 1975~1976年冬期に札幌医大小児科関連病院に於て乳幼児嘔吐下痢症と診断された患者の急性期と回復期の血清、および1965~1967年にかけて同一人から一年間隔で3回採血された北海道稚内中学校生徒の血清で、4倍稀釈後56°C 30分加熱非働化して使用した。

従ってCIEOPによる沈降反応の判定は、4倍稀釈血清での沈降線形成の有無に基いて行った。

2-メルカプトエタノール(2ME)処理: Urasawaら¹¹⁾の方法によった。

III. 成績

1. HRLA, NCDV抗原と抗NCDV, 抗HRLA血清との沈降反応

NCDV抗原に対して抗NCDV血清はFig. 1に示すように、抗体側に位置する細くかつ明瞭な沈降線と、より抗原寄りに出現し前者に比しやや弱い沈降線を形成したが、免疫前の血清では沈降反応は認められなかった。ま

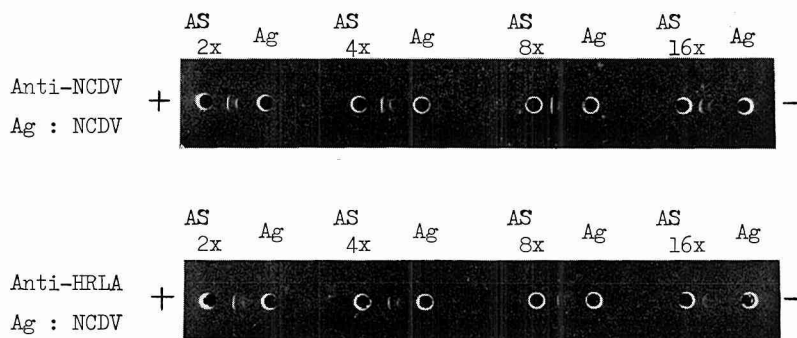


Fig. 1 Precipitin line as demonstrated by counter-immunoelectro-osmophoresis on agarose-coated microscopic slide

Cathodal wells contain antigen.
Anodal wells contain antibody.

Table 1 CF and PT Antibody Titers of Two Antisera against NCDV and HRLA

Virus	Serum antibody titers			
	anti-HRLA (guinea pig)		anti-NCDV (rabbit)	
	pre-immune	post-immune	pre-immune	post-immune
HRLA* CF	4	128	<4	64
PT	<2	16	<2	8
NCDV** CF	<4	64	16	1024
PT	<2	32	<2	128

* human reovirus-like agent

** Neonatal calf diarrhea virus

た抗 HRLA モルモット血清でも同様に 2 本の沈降線が形成されたが homologous の抗 NCDV 血清による沈降線に比し、全体にやや弱い傾向があった。免疫前血清では同様に沈降線は認められなかった。

HRLA 抗原に対する homologous の抗 HRLA モルモット血清の反応は上記の NCDV 抗原との沈降反応より弱かったが、同様に 2 本の沈降線を形成した。対して抗 NCDV 兎血清は抗体側に位置する 1 本の沈降線を形成したのみであった。免疫前血清とはいずれも沈降線は認められなかった。

Table 1 は両抗血清の CF および沈降抗体価を示したものである。CF 抗体価に比し沈降抗体価が低い傾向が見られ、特に HRLA 抗原を用いた場合に著しく低いことが注目される。これは、この反応に用いた NCDV および HRLA 抗原の CF 抗原価がそれぞれ homologous の抗血清に対して 64 単位および 32 単位であったことを考えると、HRLA の抗原量が若干低いことが関係しているのか

も知れない。しかし一方、HRLA と NCDV 両ウイルスの抗原性について、Table 1 の成績は NCDV の方が HRLA に比しより broad な抗原性を有する可能性を示しており、その反映とも考えられる。

そこで次に患者および非患者について以下血清反応の比較検討を行った。

2. ヒトおよびウシレオウイルス様因子を抗原として

測定した乳幼児下痢症患者の血清抗体価の比較

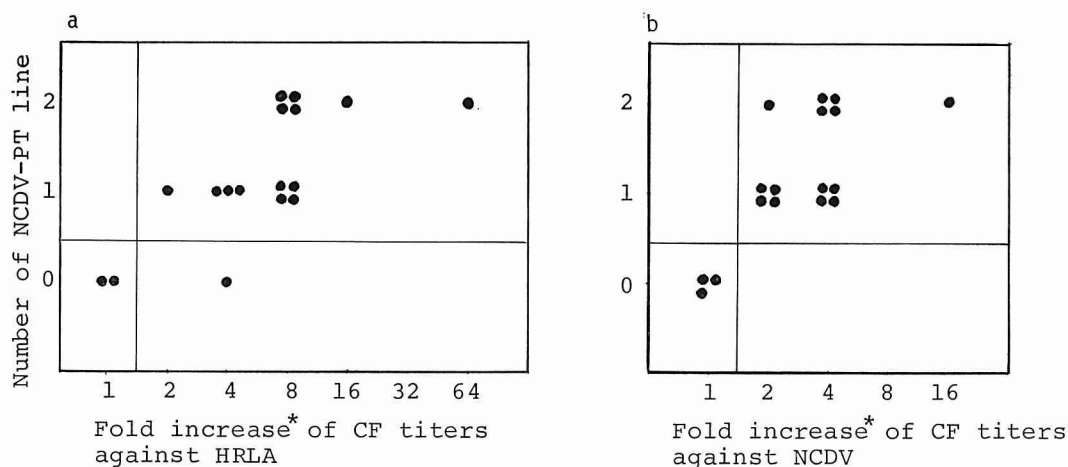
Table 2 は患者の急性期および回復期血清とその同胞の組血清について測定した CF 反応と CIEOP による沈降反応の結果を比較した成績である。表から明らかなようにヒトウイルスに対する CF (HRLA-CF) 抗体の存否と NCDV に対する CF および沈降 (NCDV-CF, NCDV-PT) 抗体の存否との間には良い相関が見られ、NCDV を用いた両反応を較べると PT 反応の方が CF 反応よりより HRLA の成績に合致するように思われる。

次に Table 2 に使用した血清の中で臨床的に患者と診

Table 2 Comparison of Prevalence of CF Antibody against HRLA with those of CF and PT Antibodies against NCDV

	CF antibody against HRLA	
	positive ($\geq 1:4$)	negative ($< 1:4$)
CF antibody against NCDV		
positive ($\geq 1:4$)	37 ^a	6
negative ($< 1:4$)	18	21
PT antibody against NCDV		
positive ($\geq 1:4$)	24 ^b	0
negative ($< 1:4$)	5	19

a Chi-square=14.73, P<0.005

b P<10⁻⁸ by Fisher exact test**Fig. 2** Relationship of CF antibody response and PT reaction (Patient sera)

$$* \text{ Fold increase} = \frac{\text{CF titer of convalescent phase serum}}{\text{CF titer of acute phase serum}}$$

断され、かつ急性期血清中の HRLA-CF 抗体が陰性の例 (これらは PT 反応においても全て陰性であった) について、急性期に対する回復期の CF 抗体価上昇倍数 (この際抗体価 4 倍以下は 2 倍として計算した) と回復期血清による沈降線の出現状況との関係を調べ Fig. 2 に示した. Fig. 2a は HRLA-CF 抗体上昇との比較であるが、回復期血清で HRLA-CF 抗体価の上昇を見なかった 2 例では沈降反応も陰性であるのに対し 2 倍以上に上昇した 15 例では内 14 例 (93%) が NCDV との反応で 1~2 本の沈降線を形成しており、CF 抗体価が高まるにつれ沈降線の数も増加する傾向が見られる. 同様に NCDV-CF 抗体上昇と PT 反応の関係を Fig. 2b に示した. 両反応はよい一致を示し、同様に CF 抗体価に平行して沈降線が 2 本になる傾向が見られる:

CIEOP による沈降反応は CF 反応に比して簡便でかつ上述のごとく本ウイルスの初感染と考えられる患者血清では HRLA-CF 反応同様に感度が高い結果を得たが、以下この方法が血清疫学的サーベイの有用な手段となり得るか否かを検討した.

3. 同一集団に対する NCDV-CF および -PT 抗体の検査成績

同一人から一年間隔で 3 回血清を採取し得た例について、NCDV-CF、-PT 反応を行い患者血清の結果と比較した. Table 3 は稚内中学生 86 名について測定した NCDV-CF 抗体価をまとめたものである. CF 抗体価の全く変動しなかった例が 54 名、多少の増減を認めたもの 32 例、その中で明らかな上昇を示したものが 6 例あった. そこでこの 2 年間で CF 抗体価に変動の認められなかった例 (少く

Table 3 Variation of CF Antibody Titers against NCDV during Two Years

CF titers not changed during two years				CF titers fluctuated during two years	
1965	1966	1967	No. of subjects	de-creased	in-creased
<4	<4	<4	19	20	12
4	4	4	12		(6*)
8	8	8	20		
16	16	16	3		

* No. of subjects with significant (four-fold or greater) increase in antibody titer

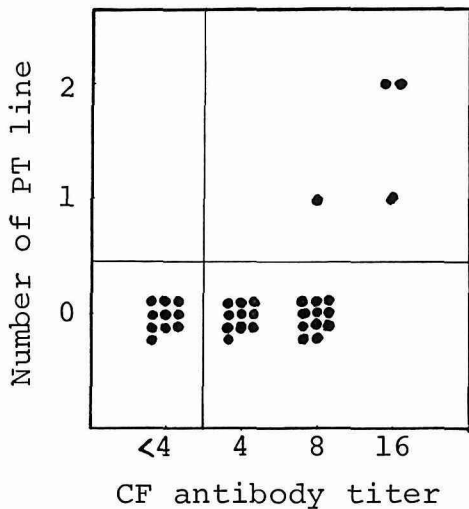


Fig. 3 Relationship of NCDV-CF antibody titer and NCDV-PT reaction

とも過去2年間 HRLA に感染しなかったと考えられる例の3回目に採血した血清の中から各 CF 抗体価毎に at random にほぼ10例 (CF 16倍は全3例) 選び PT 反応を行い、過去の感染により獲得した CF 抗体価のレベルと沈降抗体の関係を検討した (Fig. 3). CF 抗体陰性10例で PT 反応も陰性であるのは当然であるが、CF 価4倍の10例が全例陰性で、8倍の12例も1例を除く11例が陰性であった。16倍の3例は全て陽性を呈したが、この成績は先の Fig. 2b に示したように NCDV-CF 抗体陽性全例で沈降線を認めた患者血清の成績と著しく異っていた。すなわち初感染と考えられかつ感染後長期間経過していない患者例では CF 抗体と PT 抗体は平行して存在するが、感染後少なくとも2年以上経過しており、古い感染による抗体と考えられる中学生血清では、CF 抗体レベルに比して PT 抗体陽性率が著しく低下することが判明した。

次に稚内中学生で2年間に CF 反応で有意に上昇した6例について CF 反応と PT 抗体価の関係および PT 抗体の2ME感受性を調べた (Table 4). CF 抗体価の変動しない群 (Fig. 3) とは異り、患者血清に類似した関係が示された。すなわち3回の血清 CF 抗体価の変動から過去の感染と考えられる No. 92 (1965, 1966年) と No. 79 (1965, 1966) の例では CF 抗体価4倍で沈降反応は認められなかったのに対して、少くとも感染後2年以内と考えられる No. 102 (1967), No. 168 (1965, 沈降抗体の2ME感受性からつい最近の感染と考えられる) および No. 168 (1967) の血清では CF 価4倍で明瞭な沈降線の形成が認められた。さらに、最近の感染により8倍の抗体価を示した例も全て Fig. 3 とは異り沈降反応陽性を呈した。

沈降反応で検出される抗体の2ME感受性の成績は、2MEに感受性の沈降抗体と非感受性の沈降抗体の存在を示している。

Table 4 NCDV-CF and -PT Antibody in Sera from six Junior High School Students and 2-mercaptoethanol Sensitivity of PT Antibody

	CF antibody against NCDV	Number of PT line produced against NCDV not treated	2ME treated
Wakkanai junior high school			
student No. 92 (1965)	4	0	ND
	(1966)	4	0
	(1967)	16	1
No. 79 (1965)	4	0	ND
	(1966)	4	0
	(1967)	16	1
No. 82 (1965)	<4	1*	ND
	(1966)	8	1
	(1967)	8	1
No. 102 (1965)	<4	0	0
	(1966)	8	2
	(1967)	4	1
No. 168 (1965)	4	2*	0
	(1966)	16	2
	(1967)	4	2
No. 169 (1965)	<4	0	0
	(1966)	<4	0
	(1967)	16	2

* weak line

IV. 考 察

ヒトレオウイルス様因子が乳幼児、学童^{12,13)}、および成人^{14~16)}の急性非細菌性胃腸炎の病因の一つである事が、次々と確認されて来ると同時に多くのウイルス学的研究が報告されて来たが、本ウイルスの侵淫状況を疫学的に調査した報告は小規模な前述の二報告以外見るべきものはない。その原因としては第一に本ウイルスの *in vitro* での増殖系が未だ確立していないこと、第二にヒトウイルスと共通抗原を有する各種動物レオウイルス様因子^{17~19)}の中で主に CF 反応でヒトウイルスの代用抗原として用いられて来た NCDV 自身も従来の方法では継代細胞で増殖しにくく、このため、HRLA 抗体の検出に関する基礎実験が充分行われていないことが挙げられる。第二の問題に関して最近 Matsuno ら²⁰⁾は MA-104 (株化細胞)の系で培養液にトリプシン、DEAE Dextran を加えることにより、NCDV のプラーク形成に成功し、ヒトの患者血清中の NCDV に対する中和抗体測定法を報告した。我々も独自に LLCMK₂ (株化細胞)に 1 μg/ml のトリプシンを添加することにより、NCDV による明瞭な細胞変性効果の観察、明瞭なブラックの形成および大量の高い感染価のウイルス抗原の作成に成功しており²¹⁾、さらにこのようにして作成した NCDV 抗原を用いて中和反応により、HRLA の侵淫状況を検討している²²⁾。

レオウイルス様因子の抗原性については、最近 Kapikian ら¹⁷⁾は、ヒト、ウシ、サル、マウス、ヒツジ由来のレオウイルス様因子間の抗原的関連性を CF 反応を用いて検討し、これらの各ウイルスに対する特異抗血清の CF 抗体価はどの抗原を用いてもその差は 2~8 倍以内におさまり、特にウシ由来 NCDV とサル由来 SA-11 を抗原に用いた場合に各抗血清の力価は若干高くなること、しかし人患者血清中の抗体の検出率は 0 agent を抗原に用いた場合にほぼ HRLA 抗原に匹敵する成績が得られ、0 agent が broad な抗原性を有する可能性を示唆した。

一方原ら²³⁾は白痢 (乳幼児の白色便性下痢症) 型患者由来の HRLA、学童の下痢症患者からの HRLA と NCDV とを比較して、HRLA 内における抗原性の差異を指摘している。また Spence ら²⁶⁾は NCDV 抗原を用いて患者血清について HI 反応を試み、ヒトウイルス間には NCDV との共通抗原性で差異のあることを述べている。患者血清を用いて行った我々の実験成績²²⁾では NCDV を抗原に用いた CF 反応では HRLA に比して 1~4 倍程度抗体価が低くなる傾向が認められたが、更に詳細な抗原性の差異に関しては、HRLA-中和反応の確立など、今後の研究が必要と考えられる。

CIEOP による沈降反応の結果、抗 HRLA、抗 NCDV 血清と NCDV 抗原間で 2 本の沈降線が形成されたが、Middleton ら⁶⁾の成績も全く同様で彼らはこの中の一本の沈降線に電顕的にウイルス粒子を認めている。ウイルス粒子の認められない沈降線中に含まれる抗原は、ウイルスのサブユニットと考えられる。Mathan ら²⁴⁾はゲル内沈降反応の結果から両ウイルスには共通抗原を有するウイルスのサブユニットが存在することを示唆している。

ヒト血清の場合、患者血清と遠い過去に感染を経験した人の血清とでは、沈降抗体の存否と CF 抗体価の比較で相異が認められたことは興味深い。すなわち感染後間もない患者例では両抗体とも HRLA 感染をよく反映しているが、古い感染例では沈降反応の感度は CF 反応のそれに及ばない。われわれの最近の研究によると、NCDV を用いる場合、中和抗体の測定が過去における HRLA 感染の最も良い指標であることを示す成績が得られている²²⁾。

Table 4 に示したように沈降反応に関する抗体には、2 ME 感受性の点から IgM、IgG の両抗体が含まれることが考えられるが、沈降抗体は産生後、他の血清抗体に比して速やかに減少、消失してしまう。この理由は、沈降抗体は感染によく反応するがそのレベルが低いためにすぐ消失するのか、或いは HRLA の沈降抗体を産生するウイルス抗原部位が他の反応にあずかる抗原部位と異なるためなのか不明である。HRLA が成人に不顕性の再感染を起すという他の成績¹⁵⁾から考えて、少量の再感染による抗原刺激が booster effect となり中和抗体は大量に産生されるが、この際の CF 抗体産生は幾分悪く、沈降抗体産生は最も悪いためとも考えられる。

このように CIEOP による沈降反応は、血清疫学的サーベイへの使用にあたっては他の反応に比しやや不適当な面があるが、感染直後の免疫状況を知る手段として、特に乳幼児の初感染における本症の血清学的診断法としては CF 反応より鋭敏ですぐれた方法であることがわれわれの成績から明らかとなった。Middleton ら⁶⁾は CIEOP による沈降反応は抗体検出感度が CF 反応より鈍いことを示しているが、これは以上述べて来たような感染時期とは無関係に年齢分布を検討している結果であろう。

ウイルス抗原の検出法として CIEOP の方が EM より感度が良いとする成績を Grauballe ら⁷⁾、Tufvesson ら²⁵⁾は報告しているが、これは本反応により virion 以外の抗原性を有するウイルスのサブユニットの検出が可能であること²⁴⁾を考えると、当然の結果と考えられる。われわれも現在、本法を利用して 1976~1977 年冬期に発生した患者材料について検討中である。

本法は簡単で、一度に多くの検体を処理出来、かつ短時

間で結果を判定出来ることは大きな利点であり、本ウイルスの伝播様式の検索等に大いに利用出来る方法と考えられる。

V. 結 語

急性非細菌性胃腸炎の病原の一つとして最近注目されて来たレオウイルス様因子に対するヒト血清中の抗体の検出法を比較検討した結果以下の成績を得た。

1) 患者およびその同胞の組血清について、ヒトレオウイルス様因子を抗原に用いた CF 反応 (HRLA-CF) とウシレオウイルス様因子を抗原に用いた CF, Counter-immunoelectro-osmophoresis (CIEOP) による沈降反応 (NCDV-CF, NCDV-PT) の比較から、両抗原で検出される抗体の存否の間には良い相関が見られた。

2) 患者血清あるいは感染後長期間経過していない感染血清の場合、NCDV-PT 反応の方が NCDV-CF 反応による抗体検出率より優れており、HRLA-CF 反応の成績に合致するように思われた。

3) 古い感染血清では NCDV-CF 反応による抗体陽性率が NCDV-PT 反応のそれに優る成績が得られた。

以上の成績から CIEOP による沈降反応は、血清疫学的サーベイへの使用にあたっては他の反応に比し不適當な点があるが、感染直後の免疫状況を知る手段として、特に乳幼児の初感染における血清学的診断法としてすぐれていることが判明した。

本研究の一部は文部省科学研究助成金 (鈴木班)、北海道科学研究助成金に負うた。また一部患者便材料を採取下さった北医院院長北 和男博士に感謝致します。

References

- 1) Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H. and Ruck, B. J.: Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* **2**, 1281-1283 (1973).
- 2) Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H. and Ruck, B. J.: Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet* **1**, 149-151 (1974).
- 3) Kapikian, A. Z., Kim, H. W., Wyatt, R. G., Rodrigues, W. J., Ross, S., Cline, W. L., Parrott, R. H., and Chanock, R. M.: Reoviruslike agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science* **185**, 1049-1053 (1974).
- 4) Flewett, T. H., Bryden, A. S., Davis, H., Woode, G. H., Bridger, J. C. and Derrick, J. M.: Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* **2**, 61-63 (1974).
- 5) Konno, T., Suzuki, H. and Ihida, N.: Reovirus-like agent in Japanese infants with gastroenteritis. *Lancet* **1**, 918-919 (1975).
- 6) Middleton, P. J., Petric, M., Hewitt, C. M., Szymanski, M. T. and Tam, J. S.: Counter-immunoelectro-osmophoresis for detection of infantile gastroenteritis virus (orbi-group) antigen and antibody. *J. Clin. Path.* **29**, 191-197 (1976).
- 7) Grauballe, P. C., Genner, J., Meyling, A. and Hornsleth, A.: Rapid diagnosis of rotavirus infections: Comparison of electron microscopy and immunoelectro-osmophoresis for detection of rotavirus in human infantile gastroenteritis. *J. Gen. Virology* **35**, 203-218 (1977).
- 8) Kapikian, A. Z., Cline, W. L., Mebus, C. A., Wyatt, R. G., Kalica, A. R., James, H. D. Jr., Van Kirk, D., Chanock, R. M. and Kim, H. W.: New complement-fixation test for the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis-Nebraska calf diarrhea virus used as antigen. *Lancet* **1**, 1056-1061 (1975).
- 9) Blacklow, N. R., Echeverria, A. and Smith, D. H.: Serological studies with reoviruslike enteritis agent. *Infect. Immunity* **13**, 1563-1566 (1976).
- 10) Sever, J. L.: Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.* **88**, 320-329 (1962).
- 11) Urasawa, S., Urasawa, T., Chiba, S. and Kanamitsu, M.: Studies on poliovirus inhibitors in sera of domestic animals. III. A comparison of physico-chemical properties of poliovirus inhibitors and specific antibodies. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* **21**, 173-183 (1968).
- 12) Hara, M., Mukoyama, J., Tsuruhara, T., Saito, Y. and Tagaya, I.: Duovirus in schoolchildren with gastroenteritis. *Lancet* **1**, 311 (1976).
- 13) 佐伯義人, 堀野清孝, 小賀坂良一: 年長小児の Reovirus-like agent による急性胃腸炎. *医学のあゆみ* **100**, 798-799 (1977).
- 14) Zissis, G., Lambert, J. P., Fonteyne, J. and de Kegel, D.: Child-mother transmission of rotavirus? *Lancet* **1**, 96 (1976).
- 15) Kapikian, A. Z., Kim, H. W., Wyatt, R. G., Cline, W. L., Arrobo, J. O., Brandt, C. D., Rodriguez, W. J., Sack, D. A., Chanock, R. M., and Parrott,

- R. H.: Human reovirus-like agents as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *New Engl. J. Med.* **294**, 965-972 (1976).
- 16) Kariwoldhaug, I. and Sovde, A.: Rotavirus-associated gastroenteritis in two adults—probably caused by virus reinfections. *Scand. J. Infect. Dis.* **8**, 277-278 (1976).
- 17) Kapikian, A. Z., Cline, W. L., Kim, H. W., Kalica, A. R., Wyatt, R. G., Vankirk, D. H., Chanok, R. M., James, H. D. Jr. and Vaughn, A. L.: Antigenic relationship among five reovirus-like (RVL) agents by complement fixation (CF) and development of new substitute CF antigens for the human RVL agent of infantile gastroenteritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **152**, 535-539 (1976).
- 18) Woode, G. N., Bridger, J. C., Jones, J. M., Flewett, T. H., Bryden, A. S., Davies, H. A. and White, G. B. B.: Morphological and antigenic relationship between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice and foals. *Infect. Immunity* **14**, 804-810 (1976).
- 19) Schoub, B. D., Lecatsas, G., and Prohzesky, O. W.: Antigenic relationship between human and simian rotaviruses. *J. Med. Microbiol.* **10**, 1-6 (1976).
- 20) Matsuno, S., Inoue, S. and Kono, R.: Plaque assay of neonatal calf diarrhea virus and the neutralizing antibody of human sera. *J. Clin. Microbiol.* **5**, 1-4 (1977).
- 21) 浦沢正三, 秋葉澄伯, 浦沢价子, 小賀坂良一: 冬期乳幼児下痢症. —昭和50~51年の調査成績を中心に—. *小児科* **18**, 981-987 (1977).
- 22) 浦沢价子, 浦沢正三, 秋葉澄伯, 谷口孝喜, 千葉峻三, 小賀坂良一: ヒトおよびウシ Reovirus-like agent を用いて測定した乳幼児下痢症患者並びに非患者の血清抗体価の比較. 第25回日本ウイルス学会総会. (1977).
- 23) 原 稔, 向山淳司, 齋藤芳子, 鶴原 喬, 多ヶ谷勇: 小学生を中心に流行した急性嘔吐下痢症と duovirus. *臨床とウイルス* **5**, 51-57 (1977).
- 24) Mathan, M., Almeida, J. D. and Cole, J.: An antigenic subunit present in Rotavirus infected feces. *J. Gen. Virology* **34**, 325-329 (1977).
- 25) Tufvesson, B. and Johnsson, T.: Immunoelectrophoresis for detection of reo-like virus: methodology and comparison with electron microscopy. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **84**, 225-228 (1976).
- 26) Spence, L., Fauvel, M., Petro, R. and Bloch, S.: Haemagglutinin from Rotavirus. *Lancet* **2**, 1023 (1976).