

↓ 15,000rpm で20分間遠心し,

15) 上清を完全に除いた後, 乾燥させる (完全に乾燥させない)。

16) Nuclease-free Water 30 μ l 加えたのち, 70 $^{\circ}$ C に 5 分間置き, RNA を溶解させる。

これを抽出 RNA とし PCR に用いる。保存は -20 $^{\circ}$ C 以下で行う。

4. RT 反応法

1) はじめに 0.5ml のチューブに A 混合液を, 次いで B 混合液を作製する。

A 混合液

1. Primer	
Oligo (dt) (12-18) (0.5 μ g)	1 μ l
35' (25 μ M)	1 μ l
SB2-R1 (25 μ M)	1 μ l
2. DDW	1 μ l
3. 抽出 RNA	5 μ l

B 混合液

1. 5X Strand buffer	4 μ l
2. 0.1 M DTT	1 μ l
3. 2.5mM dNTPs	4 μ l
4. M-MLVRT (200unit/ μ l)	1 μ l
5. RNase inhibitor (38unit/ μ l)	1 μ l

A 混合液

↓ 70 $^{\circ}$ C に 10 分間置いた後, on ice。

2) 次いで B 混合液を加える。

↓ 37 $^{\circ}$ C に 1 時間, 次いで 98 $^{\circ}$ C に 5 分間, 直ちに on ice。

3) cDNA の作製終了

作製された cDNA を用いて PCR を行う。

5. 1st PCR

1) 1st PCR はカリシとポリオの 2 つの混合液を作製する。

A) カリシウイルス

1. DDW	34 μ l
2. 10X Ex Taq TM buffer	5 μ l
3. dNTPs (2.5mM)	4 μ l
4. 35' primer (25 μ M)	0.75 μ l
5. 36 Primer (25 μ M)	1 μ l
6. cDNA (Template)	5 μ l
7. EX Taq (5unit/ μ l)	0.25 μ l
Total	50 μ l

B) ポリオウイルス

1. DDW	34 μ l
2. 10X Ex Taq TM buffer	5 μ l
3. dNTPs (2.5mM)	4 μ l
4. SB2-R1 primer (25 μ M)	0.75 μ l
5. SB2-F1 Primer (25 μ M)	1 μ l
6. cDNA (Template)	5 μ l
7. EX Taq (5unit/ μ l)	0.25 μ l
Total	50 μ l

A と B の混合液を作製し、以下の条件で増幅を行う。

↓

2) PCR 反応

(以下の条件で行う)

94℃ 3分 — 1回
94℃ 1分 —
48℃ 1分 — 40回
72℃ 2分 —
72℃ 15分 — 1回
4℃ hold

患者糞便材料のときにはさらに NV81.82, SM82, Yuri22R/22F のプライマーを用いるとよい。陽性コントロールは NV81, 82, SM82 のプライマーで行う。

↓

3) 1st PCR 産物の電気泳動

↓ (PCR 産物 8 μ l と 6 倍 loading buffer 2 μ l を混合し泳動する。1.5 から 2 % のゲルを用い、泳動 buffer は TAE が良い)

4) 染色

(TAE 溶液 100ml にエチジウムブロマイド 10mg/ml を 10 μ l 加えたもの)

5) UV 照射で写真撮影, バンドの確認 (写真撮影)

食品では 1st PCR でバンドが見られなかった時には Nested PCR を行う

6. Nested PCR 法

1) Nested PCR の調整

以下の混合液を作製する。(可能であれば Yuri22R/22F のプライマーも行う)

1. DDW	35.75 μ l
2. 10X Ex Taq buffer	5 μ l
3. dNTPs (2.5mM)	4 μ l
4. NV81 primer (25 μ M)	1 μ l
5. NV82 primer (25 μ M)	1 μ l
6. SM82 primer (25 μ M)	1 μ l
7. 1st PCR 産物	2 μ l
8. EX Taq	0.25 μ l
Total	50 μ l

↓

2) PCR 反応

(増幅は以下の条件で行う)

94℃	3分	—	1回
94℃	1分	┌	35回
48℃	1分		
72℃	2分		
72℃	15分	—	1回
4℃	hold		

↓

3) Nested PCR 産物の電気泳動

↓ (1st PCR 産物と同様)

4) 染色 (1st PCR と同様)

5) UV 照射下で写真撮影, バンドの確認

7. PCR 結果の判定

(1) PCR 法では RNA 抽出のコントロールとして入れた, ポリオ Sabin 株 2 型 (粒子数 10^4 から 10^5 個) の PCR で目的とするバンドが認められること (RNA の抽出に問題はない)。

(2) 検査材料の代わりに DDW を入れた陰性コントロールでバンドが見られない (遺伝子の混入が無い)。

(3) 陽性コントロールで目的とするバンドが見られる (PCR がうまく行われた)。

以上の条件が満たされた時に PCR の判定を行う。

なお上記条件が満たされないときには再試験を行う。

PCR 陽性と判定されたときに確認試験としてハイブリダイゼーションあるいは遺伝子配列を調べる。

ハイブリダイゼーションで陽性, あるいは遺伝子配列で既知のカリシウイルスと類似の配列が認められた時にカリシウイルス陽性とする。

IV. マイクロトレイハイブリダイゼーション

ここではプローブにビオチン標識したものをを用いる時の方法を示す (但しこの時にはプローブの長さは 100bp 以上を必要とする)。

1. 器具および試薬

ELISA用マイクロプレートリーダー、恒温槽、ヒートブロック、ELISA用マイクロプレート、マイクロピペット(2, 20, 200, 1,000 μ l)、マイクロチューブ(0.5, 1.5ml), 10ml, 100ml, 500ml ガラス瓶、プレートシール、ゲル写真撮影装置

DNA分子量マーカー、GenElute™ Minus EtBr Spin Columns (SUPELCO, Cat. No.56501)、電気泳動用 Agarose、フナゲルチップ、T₁₀E₁ (10mM Tris, 1mM EDTA 2Na), NaCl, リン酸2Na, EDTA 2Na, トリス, HCl, Tween20, DDW, サケ精子 DNA, ホルムアミド, ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ, ウシ血清アルブミン(BSA), TMB (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine), DMSO (Dimethyl Sulfoxide), Citric acid, 30%H₂O₂, H₂SO₄.

2. ゲルからの DNA 抽出法 (GenElute™ Minus EtBr Spin Columns を用いる方法)

0.8%アガロースゲルを用い(ゲル濃度が低い方がDNAの回収率が良い)、泳動 Buffer は TAE が良い)、PCR産物を泳動し、ゲルをラップに乗せ、目的とするバンド(1st PCR では470bp, 2nd は330bp)をUV照射下で切り出す(フナコシのフナゲルチップを用いると良い)。

- 1) Spin Columnを1.5mlのチューブに乗せ、それに100 μ lのT₁₀E₁ (pH8.0)を入れる。
↓12,000xg で5秒間遠心、チューブに溜まった液をすてる。
- 2) Spin Columnに切り出したゲルを入れる。
↓12,000xg で10分間遠心し、Spin Columnを取り除く。
- 3) チューブに溜まった液の中に抽出DNAが含まれている。これをハイブリに用いる。

3. ハイブリダイゼーション法

- 1) 抽出DNA33 μ lを0.5mlのチューブに取り、3倍濃度の1.5M NaCl buffer #1 16.5 μ lを加える。(DNA量は200ng/ml程度の濃度とする。通常のG1PC98のPCRで得られ、本法で得られた抽出DNAは20倍から100倍希釈して用いる。そのまま用いると陰性となることがある)
↓98℃, 5分間加熱処理, 直ちに on ice する。

- 2) マイクロトレイに固定化液#2を85 μ l入れ、それに加熱処理したDNAを15 μ lずつ1検体当たり3ウェルに入れる。

#1: 3倍1.5M NaCl buffer: 4.5M NaCl, 30mM リン酸2ナトリウム, 30mM EDTA 2Naを加え、精製水で1,000mlに、pH7.0

*2: 固定化液: 3倍濃度1.5M NaCl buffer 3.0ml, DDW 6.0ml

		1	2	3	4	5	6	7
			N*	G	G	検	検	検
			C	1	2	体	体	体
						1	2	3
Probe con	A	○	○	○	○	○	○	○
	B	○	○	○	○	○	○	○
G1 probe	C	○	○	○	○	○	○	○
G2 probe	D	○	○	○	○	○	○	○
	E	○	○	○	○	○	○	○
	F	○	○	○	○	○	○	○

- NC: 陰性コントロール
- G1: G1 陰性コントロール
- G2: G2 陰性コントロール

トレイのレイアウト

↓プレートをシールし, 37°C恒温槽に重しをして沈めて2時間以上置く。

3) PBS-Tでプレートを3回洗浄する。

4) プレートにハイブリ液^{#3}を各ウェルに80μlあて入れる。

5) 1検体当たり, プローブコントロール, G1プローブ, G2プローブを各22μlずつ作製する。

*3: 3倍1.5M NaCl buffer 1.35ml, DDW1.26ml, ホルムアミド4.5ml, 10% Tween20 0.09mlを混合したもの。

プローブの調整 (1検体当たり)

プローブコントロール	T ₁₀ E ₁ 11μl+サケ精子 DNA11μl*
G1 プローブ	probe G1 11μl+サケ精子 DNA11μl
G2 プローブ	probe G2 11μl+サケ精子 DNA11μl

* サケDNA: DNA量10mg/mlのものをT₁₀E₁で100μg/mlに希釈し, それに2倍濃度の1.5M NaCl bufferと混合したもの。

6) 上記混合液(プローブ)を98°C, 5分間加熱処理, 直ちにon iceし, プローブコントロール, G1プローブ, G2プローブを20μlあてそれぞれの列に入れる。

↓42°C 恒温槽に重しをして沈め, 6時間以上あるいは1夜置く。

7) シールを剥がし, PBS-Tで3回洗浄する。液が飛び散らない様にする。PBS-T

は42℃に暖めておく。

- 8) ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ (1%BSA+PBS-Tで適宜希釈したもの) を全てのウェルに100 μ l入れる。

↓室温1時間置く (弱く振動させるとよい)。

- 9) プレートをPBS-Tで4回洗浄する。

- 10) 全てのウェルに発色液^{#4}を100 μ l入れる。

^{#4}: TMB 1 mg, DMSO 1 ml, phosphate-citrate buffer 9 ml (0.2M 磷酸 2Na25.7ml, 0.1M クエン酸24.3ml, 精製水50ml, pH5.0), 30% H_2O_2 2 μ l(使用直前に作る)。

↓室温15分間 (プレートは遮光しておく)。

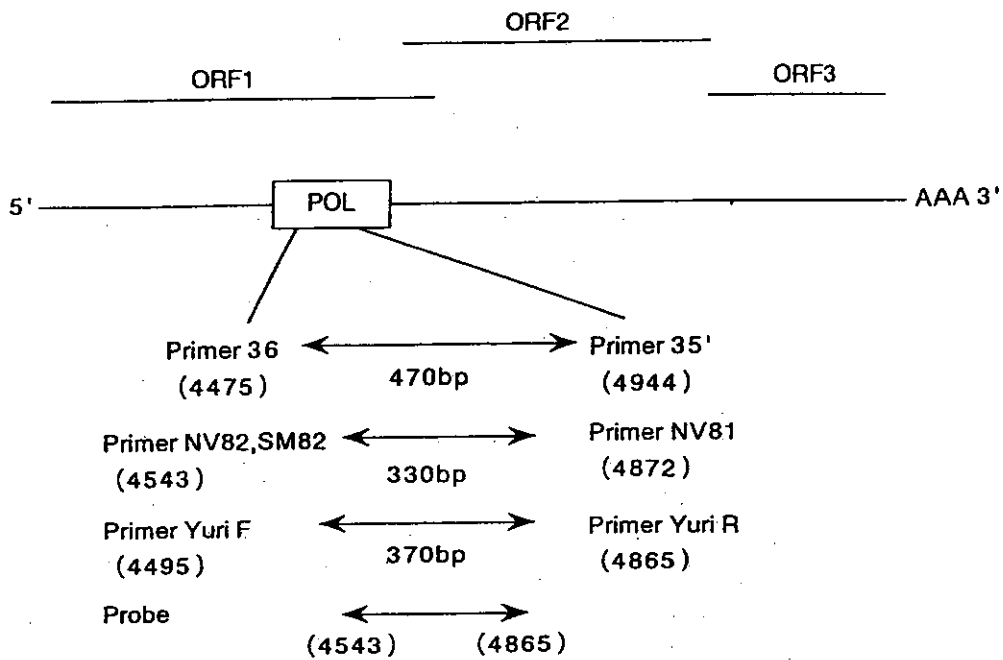
- 11) 停止液 (4N H_2SO_4) を50 μ l入れる。

- 12) 450nmで吸光度を測定する。

- 13) 判定 コントロールに比べOD値が2倍以上,かつ0.2以上の差が認められた時に陽性とする。

4. 注意点

DNAの汚染を避けるため,プレートのシールを剥がす時,プレートの洗浄時には液を飛び散らさないこと。プレートの洗浄液は予め次亜塩素酸ナトリウム2,000PPM程度を入れた容器に捨てること。実験台等が汚染されたときには次亜塩素酸ナトリウム1,000PPMで拭く。



Primer 35'	5'-CTT GTT GGT TTG AGG CCA TA-3'	20 mer
Primer 36	5'-ATA AAA GTT GGC ATG AAC A-3'	19 mer
Primer NV81	5'-ACA ATC TCA TCA TCA CCA TA-3'	20 mer
Primer NV82	5'-TCA TTT TGA TGC AGA TTA-3'	18 mer
Primer SM82	5'-CCA CTA TGA TGC AGA TTA-3'	18 mer
Primer Yuri 22 F	5'-ATG AAT GAG GAT GGA CCC AT-3'	20 mer
Primer Yuri 22 R	5'-CAT CAT CCC CGT AGA AAG AT-3'	20 mer
Primer SB2/F1	5'-AGC AAG CAC CGT ATT GAG CC-3'	20 mer (4468-4487)
Primer SB2/R1	5'-GTT TCA TGT CTG CTC CGT CTG-3'	21 mer (4687-4667)

Primer の Sequence と位置

アデノウイルス

ヒトアデノウイルスは現在51血清型が存在している。主に乳幼児の下痢症を起こすのは腸管アデノウイルス (enteric adenovirus) と呼ばれている40型および41型であり、これらのウイルスは年間を通して見られる。

アデノウイルス検出用キットとしては「ロターアデノドライ」(第一科学薬品 KK) が市販されており、ラテックス凝集法によるふん便中のロタウイルス及びアデノウイルス検出用試薬である(これは全てのアデノウイルスを検出できる)。「アデノクロン E」(TFB 社) は ELISA 法によるふん便中のアデノウイルス40/41型検出を行うものである。参考までに、「アデノクロン」(TFB 社) があり、これは ELISA 法による結膜上皮細胞中のアデノウイルス抗原検出キットである。

アデノウイルス40, 41型の検査にはまず始めに市販の「アデノクロン E」で40/41型の検出を行うのがよい。腸管アデノウイルスの診断を行ったのち、必要に応じ型別試験は40型および41型特異モノクローナル抗体を用いた ELISA 法で、あるいは組織培養による中和試験で行う。また電子顕微鏡でアデノウイルスが大量に見られるもの、抗原検出用 ELISA で高い価を示したものは制限酵素切断パターンから型別もある程度可能である。

I. アデノクロン[®]E によるアデノウイルス40型と41型の検出

このキットはアデノウイルス40型と41型に対応する特異モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法で、ふん便から直接アデノウイルス40と41型を検出することができる。検出感度は 2.5×10^5 ウイルス粒子/ml で明らかに陽性となる。判定までに要する時間は標準法で行うと遠心時間を含め1時間半、短縮法で30分程度である。しかし40型か41型かの型別は行えない。

1. 器具および試薬

冷却遠心器 (10,000回転/分), プレートミキサー, マイクロプレート用洗浄装置 (無くても良い), マイクロプレートリーダー(波長450nm), マイクロピペット (100 μ l), 100 μ l 用チップ (フィルター付きとなしの両方), 精製水, 吸い取り紙, ペーパータオル。

2. 検体の調整

10～20%ふん便乳剤を添付されている希釈液（PBS）で作る。

添付マニュアルには遠心操作が不要とされている。しかしこのキットには各ふん便の陰性コントロールウエル（非特異反応を見るウエル）がないので、予め10～20%ふん便乳剤を10,000回転、20分間遠心して、その上清を用いると成績がより確実となる。

3. 操作法

- 1) 検体と試薬は使用前に室温（20～30℃）に戻しておく。
 - 2) 検体数、コントロール数にあわせて抗体固相化ウエルを取り出し、マイクロウエルホルダーにセットする。但し12連になっているので注意する。
 - 3) 陰性コントロール（添付されている希釈液、PBS）陽性コントロール（添付）および検体を2滴（100 μ l）それぞれのウエルに入れる。
 - 4) 酵素標識抗体（添付）を各ウエルに2滴（100 μ l）滴下し、静かに混和する。
 - 5) 室温（20～30℃）で60分間置く、または30分間プレートミキサーで振とうする。
 - 6) 反応液を廃液容器に捨て、ホルダーを逆さにして吸い取り紙の上で勢いよくたたき、水分を十分に取り除く。
 - 7) 各ウエルに精製水200 μ l以上入れ、6)と同様に洗浄液を捨てる。この操作を5回行う。
 - 8) 洗浄後、水分を除いた後基質緩衝液（添付）を2滴（100 μ l）各ウエルに入れる。
 - 9) 発色液（添付）を2滴（100 μ l）各ウエルに滴下し、静かにゆする。
 - 10) 室温に10分間静置する（遮光する）。
 - 11) 反応停止液（添付）を2滴（100 μ l）入れる。
 - 12) マイクロプレートリーダーで吸光度（470nm）を測定する。
 - 13) OD値が0.150以上の時に陽性とする。但し陽性コントロールが0.3以下となった時には、その試験を無効として再検査を行うこと（通常陽性コントロールは1/10量を用いたときでもOD値が0.3以上となる。）
- # 目視で判定する時には反応停止液を加えないで、陰性コントロールと比較して判定する。

本試験には陽性コントロールとしてアデノウイルス41型が用いられている。可能であればアデノウイルス40型を陽性コントロールとして加えることが望ましい。

4. 文 献

- 1) Herrmann J.E., 1987, Arch. Virol. 94, : 259-265
- 2) 荒木和子 他, 1988, 臨床とウイルス, 16 : 556-558

II. ELISA によるアデノウイルス40, 41型の型別試験

アデノウイルス検出用 ELISA あるいはラテックス, アデノウイルス40/41型検出用 ELISA で検出されたもの, 組織培養法で分離培養したものについて40型, 41型の型別を特異モノクローナル抗体を用いた ELISA 法で行う方法である。

1. 器具および試薬

高速冷却微量遠心器, ELISA 用マイクロプレート, プレートカバー, 連続分注ピペット, マイクロチューブ, マイクロプレート洗浄器, マイクロプレートリーダー (波長492nm), PBS, 炭酸緩衝液{無水炭酸ナトリウム1.49g, 炭酸水素ナトリウム2.93gを蒸留水で1,000mlにする (pH9.6)}, 0.05% Tween 加 PBS (PBS-T), prtho-phenylenediamine dihydrochloride (OPD), 30%過酸化水素, クエン酸, リン酸, 硫酸, ウシアルブミン。

抗アデノウイルス40型および41型ウサギ血清 (他のアデノウイルス血清型の抗血清でも使用できる。但し OD 値が若干低くなる。)

モルモット正常血清 (G.P. cont)

抗アデノウイルス41型モルモット血清 (anti-Ad 41G.P.), 正常マウス血清 (M.A.F. cont), アデノウイルスグループ特異モノクローナル血清 (MoAb Ad-grp)

アデノウイルス40型特異モノクローナル血清 (MoAb Ad40)

アデノウイルス41型特異モノクローナル血清 (MoAb Ad41)

アフィニティ精製ペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG 抗体 (HRP-G.P., Zymed)

アフィニティ精製ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 (HRP-Mouse, Zymed)

2. 検体の調整

発病初期のふん便を採取する。PBS あるいは MEM を用いて10~20%乳剤とし, 10,000rpm. 20min 遠心して, その上清を試料とする。

		1	2	3	4	5	6
		G.P.cont	Anti-Ad41G.P.	M.A.F. Cont.	MoAb Ad group	MoAb Ad 40	MoAb Ad 41
A	陰性対象						
B	陽性対象 Ad40						
C	陽性対象 Ad41						
D	検体 1						
E	検体 2						
F	検体 3						
G	検体 4						
H	検体 5						

— HRP-G.P — — HRP-Mouse —

図1. マイクロトレイのレイアウトの例

3. 検査方法

- 1) 抗アデノウイルス40型および41型ウサギ血清（抗アデノウイルス抗体で有れば他の型でも良い。使用希釈は5,000倍以上が望ましい）を炭酸緩衝液で、それぞれ適宜希釈（5,000から20,000倍）し混合する。それをELISAプレートの各ウェルに100 μ lずつ分注する（図1にトレイのレイアウトを示しているのを参考）。
- 2) プレートにカバーをして4℃に一夜置く。
- 3) プレートをPBS-Tで3回洗う。
- 4) 全てのウェルにPBS-Tを75 μ l入れる。
- 5) A列, A1, A2, A3, A4, A5, A6 (A1~A6)のウェルにPBSを25 μ l入れる（陰性コントロール）。
- 6) B列, B1~B6にアデノウイルス40型あるいはアデノウイルス40型抗原陽性ふん便試料を25 μ l入れる（40型陽性コントロール）。C列, C1~C6にアデノウイルス41型あるいはアデノウイルス41型抗原陽性ふん便試料を25 μ l入れる（41型陽性コントロール）。
- 7) 検体1をD列, D1~D6に25 μ l入れる。以後検体をE列からH列に（E1~E6からH1~H6）25 μ l入れる。
- 8) プレートにカバーをして2時間室温に置く（プレートをゆっくり振とうさせると反応が促進される）、あるいは4℃に一夜静置する。
- 9) プレートをPBS-Tで3回洗う。

- 10) モルモット正常血清を1%BSA+PBS-T(希釈液)で5,000~10,000倍(抗血清の希釈倍数と同じにする)に適宜希釈し1列のA1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1(A1~H1)および7列のA7~H7に100 μ l入れる(検体対象)。
- 11) 抗アデノウイルス41型モルモット血清を希釈液で正常モルモット血清と同様の希釈倍数に希釈して, 2および8列(A2~H2, A-8~H-8)に100 μ l入れる(特異アデノ抗原の検出)。
- 12) 正常マウス腹水を希釈液で5,000~10,000倍に希釈して, 3および9列(A3~H3, A9~H9)に100 μ l入れる(モノクローナル抗体の非特異反応の検出)。
- 13) アデノウイルスグループ特異モノクローナル抗体を希釈液で正常マウス腹水と同様に希釈し, 4および10列(A4~H4, A10~H10)に100 μ l入れる。
- 14) アデノウイルス40型特異モノクローナル抗体を希釈液で正常マウス腹水と同様に希釈し, 5および11列(A5~H5, A11~H11)に100 μ l入れる。
- 15) アデノウイルスグループ特異モノクローナル抗体を希釈液で正常マウス腹水と同様に希釈し, 6および12列(A6~H6, A12~H12)に100 μ l入れる。
- 16) プレートカバーをして室温に1時間置く(プレートをゆっくり振とうさせるとよい)。
- 17) プレートをPBS-Tで3回洗う。
- 18) アフィニティ精製ペルオキシダーゼ標識抗モルモットIgG抗体を希釈液で2,000倍に希釈して, 1, 2, 7, 8列に100 μ l入れる。
- 19) アフィニティ精製ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を希釈液で2,000倍に希釈して, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12列に100 μ l入れる。
- 20) プレートカバーをして室温に1時間置く(プレートをゆっくり振とうさせるとよい)。
- 21) プレートをPBS-Tで4回洗う。
- 22) H₂O₂-OPD溶液を作る。OPD10mgに0.1Mクエン酸溶液6.1ml, 0.2Mリン酸溶液6.4ml, 蒸留水12.5mlを加え溶解し, 使用直前に30%H₂O₂を10 μ l加え, 全てのウェルに100 μ l入れる。(H₂O₂-OPD溶液は使用直前に作ること)。
- 23) プレートを遮光して室温に30分間静置する。
- 24) 4N硫酸を全てのウェルに50 μ l入れる。
- 25) 波長492nmで吸光度を測定する。
- 26) 判定: 特異アデノウイルス抗原は, 正常モルモット血清と抗アデノウイルス41型に比べて吸光度が0.2以上の差を示したもの(1列と2列の差)を陽性とする。

アデノウイルスグループ抗原は、正常マウス腹水とアデノウイルスグループ特異抗体に比べて吸光度が0.2以上の差を示したもの（3列と4列の差）を陽性とする。

アデノウイルス40型、41型の判定は、正常マウス腹水に比べて吸光度が0.2以上で、かつ40型および41型のモノクローナル抗体に比べて吸光度がそれぞれの倍以上の価が認められた時、その血清型とする。

注意：正常モルモット血清および正常マウス腹水はそれぞれに対する抗体の希釈倍数と同様にする。

アフィニティ精製ペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG 抗体とアフィニティ精製ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体はメーカーによって最適希釈倍数は異なるので、それぞれの希釈倍数で行うこと。

アデノウイルス40型および41型特異モノクローナル抗体は市販されていないので、保有している研究機関（愛媛県衛生研究所 大瀬戸光明，国立公衆衛生院 西尾 治）へ分与を依頼する。

4. 文 献

- 1) Nishio, O. et al, 1990, Microbiol. Immunol. 34: 871-877.
- 2) 高木賢二 他, 1991, 感染症学雑誌, 65: 552-558

III. Graham293細胞による腸管アデノウイルスの分離と同定

腸管アデノウイルスの分離は難しいものの、41型は40型に比べやや容易である。ふん便中に含まれるウイルス量が少ないと分離はさらに困難となる。

1. 器具および試薬

孵卵器，冷却高速微量遠心器(10,000rpm)，組織培養用チューブ，ボトル，0.45 μ m フィルター，ダルベッコ MEM，ウシ胎児血清(FCS)，トリプシン(1:250)，PBS，EDTA-2Na

2. Graham293細胞の継代

腸管アデノウイルスの分離には一般的に Graham293細胞（293細胞，ヒト胎児腎臓細胞にアデノウイルス5型の EIA 部分の遺伝子が組み込まれているもの）が用いられている。培養後2～3日間は剥がれ易いので，培養液を強く揺すらないようにする。

1) 細胞の増殖

細胞の増殖には 8 から 10%FCS+ダルベッコ MEM (DMEM) (イーグル MEM より DMEM の方が良い) を用いる。細胞の維持には 2 %FCS+DMEM を用いる。

3. 腸管アデノウイルスの分離方法

- 1) 培養している 293細胞を PBS+0.02%EDTA+0.02%トリプシン (1:250) で 2 回洗浄 (静かに行う) する。
- 2) 直ちに培養瓶を立てて 0.02%EDTA+0.02%トリプシンを除く, 2 から 5 分後に細胞が完全に剥がれ落ちる。少量の DMEM を用い 2 ~ 3 回ピペッティングを行い細胞の固まりをなくし, その後細胞をピペットで集め, 遠心管に入れる。
- 3) DMEM (血清-) で細胞数を 2×10^6 個/ml に調整する。
- 4) 上記細胞液 0.2ml に 10%ふん便乳剤上清 (10,000回転, 20分間遠心, 可能であれば $0.45\mu\text{m}$ のフィルター濾過したもの) を 0.1ml 加え, 混合する。
- 5) 36°C に 90分間静置する。
- 6) 800回転, 5分間遠心し, 上清を除く。
- 7) 8 %FCS+DMEM 1ml で細胞を再浮遊させ, 試験管あるいはマイクロトレイで培養する。
- 8) 2 から 3 日後に培養液を替える。その際に細胞が 60%以上に増殖したときには 2 %FCS+DMEM にする。以後 3 日毎に液替えを行う。CPE が完全にきたもの, 及び細胞が古くなり (2 週間は観察可能) 維持が困難となったときには, 細胞を剥がし, 遠心管に取り, 2,000回転, 5分間遠心する。上清を捨て, 少量の DMEM で再浮遊させる。
- 9) 再浮遊させた細胞は凍結融解を 4 から 5 回行い, CPE が見られないときはその 1/3 量を, CPE が認められたものは適時希釈し, 細胞が 50 から 60%程度に増殖した時に接種する。但し, CPE の出現が殆ど見られない時にはその細胞を継代培養しても良い。

また CPE が弱い時にはその細胞を 1/10量, 新しい細胞を 9/10量加え, 継代しても良い。

注意: 細胞に接種する際に, 予め培養しておいた細胞に直接行っても良いが, 分離がやや悪くなる。

初代ではアデノウイルス 40型, 41型共に CPE (アデノウイルスの特徴的な形態) が見られることが多い。しかし 2 代目になると CPE が現れなくなるか弱くなる。

3代目以降でCPEが見られた時には以後消失することは殆どない。293細胞で培養可能になったものは他の細胞（HeLa, Hep2細胞等）での継代も可能となる。しかし増殖するウイルス量は一般的に少ない。

4. 中和試験

アデノウイルス40, 41型の中和試験には抗血清4から5単位を用いる。アデノウイルス40型と41型の間には中和交叉反応があり, 抗血清の高いものを用いると判定に困難を来すので, 抗血清は必ず同じ価にする。分離ウイルス力価は $16\sim 100\text{TCID}_{50}/0.025\text{ml}$ で行う。

1) 96ウェルトランスファープレートに分離ウイルス $16\sim 100\text{TCID}_{50}/0.025\text{ml}$ に調整したものを $25\mu\text{l}$ と抗血清 $25\mu\text{l}$ を混合する。なおウイルス力価確認のため同定に用いたウイルス液を0, 10, 100, 1,000倍に希釈し, 各2ウェルに $25\mu\text{l}$ ずつ入れ, 抗血清の代わりにDMEM $25\mu\text{l}$ を混合する。中和は 37°C で1時間行う。

2) 96ウェルマイクロプレートに用意しておいた293細胞の培地を2%FCS+DMEM $150\mu\text{l}$ に換える。それにトランスファープレートの混合液を移す。

トランスファープレートの代わりに, マイクロプレート (U底が良い) でウイルスと抗血清を混合し, その後細胞を加えても良い。この時にはウイルス希釈倍数が低いと細胞毒性が現れ, 細胞が増殖しないことがあるので観察時に注意する。

3) ウイルスコントロールの 10^1 のところからCPEが認められた時から, またはCPEが50%程度の細胞に認められた時から観察をし, 片方が100%近くにCPEが認められた時に判定を行う。片方の抗血清を抑えていても数日後には両方にCPEが見られるので, 判定まで観察を毎日行う。

5. 文献

- 1) 荒木和子 他, 1986, ウイルス36: 273-282

IV. 腸管アデノウイルスの制限酵素切断パターン

制限酵素切断パターンからアデノウイルス40型と41型の型別がほぼ行える。但し, アデノウイルス40型は変化が少ないが, アデノウイルス41型は変異株が多いので, 同じ時期で血清型が中和試験あるいは型別ELISAで同定できたものをコントロールとして加えることが望ましい。

25cm^2 での細胞培養瓶からの抽出方法を記す。量的な関係はそれぞれの細胞数によ

て異なるので、この方法の量を参考に適宜変更して行って頂きたい。腸管アデノウイルスはふん便中に大量のウイルスが含まれていることが多く、このようなふん便では細胞増殖しなくても直接行うことができる。

1. 器具と試薬その調整

低速遠心器, 高速微量冷却遠心器, マイクロチューブ振とう機, 高温槽, アガロース, マイクロピペット (20, 100, 1,000 μ l), マイクロチップ (20, 100, 1,000 μ l, フィルター付きとなしの両方)

TES buffer : {10mM Tris (pH7.4), 10mM EDTA-2Na (pH8.0), 50mM NaCl, 6% SDS} 高压滅菌する。または: 2M トリス (pH7.4) 0.1ml, 0.2M EDTA-2Na (pH7.8) 0.1ml, 5M NaCl 0.04ml を蒸留水で 1 l に調整し高压滅菌する。

5M NaCl buffer : NaCl 29.2g, T₁₀E₁ (10mM トリス, 1mM EDTA) で 100ml に調整し高压滅菌する。

Protease K (5mg/ml) : Proteinase K 10mg を T₁₀E₁ (pH7.4) で 2ml とする。

Phenol solution : Phenel (核酸抽出用) を T₁₀E₁ で 3 回洗い, 飽和にしておく。

クロロホルム・イソアミルアルコール (24 : 1) : Chloroform 24ml に Isoamyl Alcohol を 1ml 加える。

フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) : Phenol solution とクロロホルム・イソアミルアルコール (24 : 1) を等量で混合したもの。

酵素 : BamH I, EcoR I, Sma I, Hind III, Kpn I 等。

Reaction mixture : 酵素によってそれぞれ異なるので, 酵素に添付されている使用説明書に従う。現在は多くのメーカーで添付されている。

1%ウシ血清アルブミン (BSA, 加熱処理済みのものがよい) : BSA 1mg を滅菌蒸留水 1ml に溶解する (制限酵素に添付されているものもある)。

停止液 (6 倍 conc.) : Sucrose 40%, Bromophenol blue 0.2% を混合したもの。

10倍泳動用緩衝液 (10倍 TAE buffer) : トリス 48.4g, 酢酸ナトリウム 6.8g, EDTA 2Na 3.7g, 酢酸 14ml を蒸留水で 1,000ml にする。

染色液 : TAE buffer 100ml に ethidium bromide 10mg/ml を 10 μ l 加えたもの。

2. ふん便からの DNA 抽出

1) 電子顕微鏡観察で大量のウイルス粒子が見られる材料や, ELISA で抗原価の高い時には 10% 乳剤をそのまま用いることができる。ウイルス量が充分で無いときには

以下の様に行う。

- 2) ふん便0.3~1.0g を10ml の DW に浮遊 (激しく混合) させる。
- 3) 10,000回転, 20分間遠心する。
- 4) 上清を30%シュークロースに重曹する
- 5) 35,000回転, 150分間遠心する。

以下は細胞の項の11)から行う。

3. 感染細胞からの DNA 抽出

- 1) 80%以上の細胞に CPE が認められたら, 細胞を含む培養液を全て回収する(細胞は少し強く揺する事によって剥がれる)。
- 2) 1,000回転, 2分間遠心する。
- 3) 上清を除去する(細胞を集める)。
- 4) PBS(-)を10ml 加え, 細胞を再浮遊させる。
- 5) 2,000回転, 2分間遠心する。
- 6) 上清を除去する。
- 7) PBS(-)を1.8ml チューブに入れ, 細胞を再浮遊させる。
- 8) 2.0ml チューブに移す。
- 9) 2,000回転, 2分間遠心する。
- 10) 上清を除去する。
- 11) チューブを Vortex する。高圧滅菌済み TES を800 μ l 入れる。
- 12) 室温に15分間置く(細胞を溶解させる。この状態で4℃保存可能, 15分後に細胞が溶解して透明にならない時には10%EDTA を50 μ l 程度加え, 完全に溶解させる)。
- 13) 5M NaCl を200 μ l (Final 1M) 入れる。
- 14) Protease K (5mg/ml) を40 μ l 加える (1/25量)。
- 15) 50℃, 1時間置く。
- 16) 直ちに冷却する。
- 17) on ice 3時間以上または一夜置く。
- 18) 20,000回転, 30分間あるいは15,000回転, 40分間遠心する。バランスは{10mM TE (10mM Tris, 1mM EDTA)} で5M NaCl を1M NaCl にしたもので取る。
- 19) 上清を2ml のチューブに取る。
- 20) フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) を1ml 加える。

- 21) 10分間上下攪拌する。
- 22) 10,000回転, 20分間遠心する。(このフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール操作を2回行うと良い)。
- 23) 上層を新しい2.0mlのチューブに取る。
- 24) クロロホルムを1ml入れる。
- 25) 10,000回転, 20分間遠心する。
- 26) 上層を新しい2.0mlチューブに取る。
- 27) 2-プロパノール(等量)あるいは99.5%エタノール(2.5倍量)を入れ, 上下攪拌20回する。
- 28) -20°C に一夜あるいは -80°C に1時間置く。
- 29) 15,000回転, 30分間遠心する。
- 30) 上清を除去する。
- 31) 70%エタノールを1ml加える。
- 32) 15,000回転, 20分間遠心する。
- 33) 上清を除去する。
- 34) 乾燥させる(風燥あるいは真空ポンプを用いた減圧乾燥)が, 完全に乾燥させない。
- 35) $T_{10}E_1$ を $50\mu\text{l}$ 入れる。
- 36) 56°C に10分間置き, その後冷却し, 4°C で保存する。
- 37) 抽出DNAで制限酵素切断あるいはPCRに用いる。

4. 抽出 DNA の制限酵素切断

1) 調整

	Sample No	DDW	10XRB	制限酵素*1	BSA	RNase*2	DNA	Total
		X μ l	2.5 μ l	Y μ l	2.5 μ l	1 μ l	Z μ l	251 μ l
1	A-1	13 μ l	2.5 μ l	1 μ l	2.5 μ l	1 μ l	5 μ l	25 μ l
2								
3								
4								
5								
6								

*1: 10~20単位を用いる。

*2: (A: 0.025mg/ml+T1: 50unit/ml), RNA ウイルスを取り扱っている研究機関では RNase の取り扱いに注意する。例えば, Rnase 専用のマイクロピペットを用意し, かつ高圧滅菌できるものがよい。また実験終了後実験台等は市販されている RNase 阻害剤で拭いておく。

表では25 μ l の量を参考に示している。

- 2) 使用酵素の最適温度で水浴 (2~6時間) させる。
- 3) 65°Cに5分間置く。
- 4) on ice する。
- 6) 停止液を入れる。
- 7) 1から2%アガロースを用い電気泳動を行う。
- 8) Ethidium bromide 染色を行う。
- 9) UV 照射下で写真撮影を行い, アデノウイルス40型および41型と比較し判定する。

この時 DNA パターン比較を容易にするため, 分子量マーカーや1~6型の標準株を対照として加えたほうがよい。

電気泳動による DNA パターンがはっきりしない時には, フェノールによる抽出から再度同じ操作を行う。またふん便中のアデノウイルス DNA 量が少ない時には, ふん便材料を感受性細胞に接種して, ウイルスを増殖させてから行ったほうがよい。

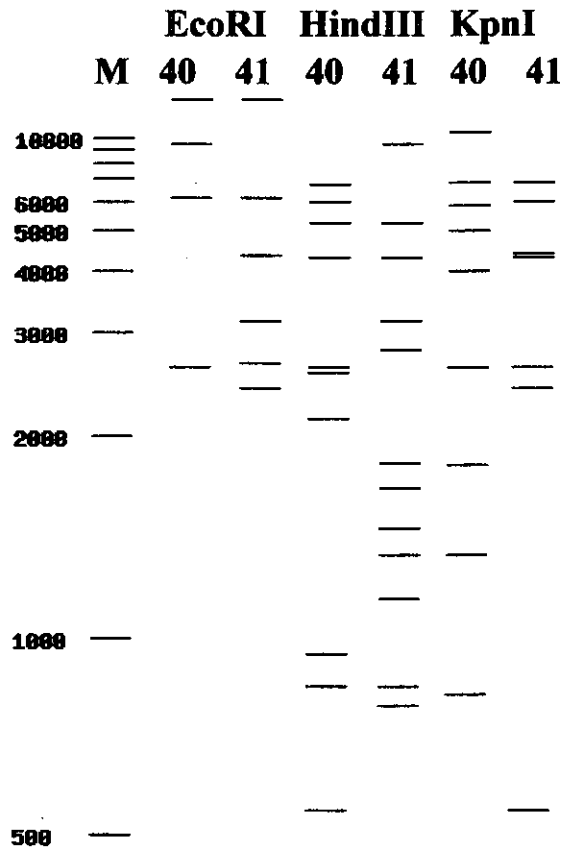


図1. アデノウイルス40, 41型の制限酵素切断パターン

V. PCR 法

ふん便材料からウイルス DNA を抽出して、PCR で診断する方法も行われている。ふん便からのウイルス DNA 抽出はアデノウイルスの制限酵素切断項の DNA 抽出法と同様に行うか、あるいは DNA 抽出キットが市販されているのでそれに従って行う。

ここでは subgenus F 検出と全てのアデノウイルスを検出する PCR 法を示す事になっている。

A : アデノウイルス F 群 (40/41型) の検出法

1. 器具および試薬

サークルサイクラー, マイクロミキサー, 電気泳動装置, UV 照射写真撮影装置, ヒートブロック, マイクロピペット (2, 20, 200 μ l), マイクロチューブ, マイクロチップ (2, 20, 200, 1,000 μ l, フィルター付きとなし), 電気泳動用アガロース, 分子量マーカー, EDTA, PCR 用精製水, dNTPs, Taq DNA polymerase, Tris, HCl, ホウ酸, ethidium bromide